

Phosphat und Vanadat in biologischen Systemen: chemische Verwandtschaft oder mehr?

Winfried Plass*

Die biologische Funktion von Vanadium ist bekannt und in mehreren Übersichtsartikeln ausführlich dargestellt worden.^[1, 2] Von besonderer Bedeutung sind hierbei der Befund, daß dieses Element einen Einfluß auf Phosphat-metabolisierende Systeme hat, und die Entdeckung, daß es auch ein aktives Zentrum von Enzymen sein kann. Beide heute bekannten Vanadoenzyme, die Haloperoxidasen und die Nitrogenasen aus dem stickstofffixierenden Bakterium *Azotobacter*, haben mit den eisenabhängigen Peroxidasen bzw. den konventionellen Nitrogenasen mit molybdänhaltigem Cofaktor deutlich weiter verbreitete und effizientere funktionelle Analoga. Daraus ergibt sich die Frage, wie die Evolution dieser Enzymsysteme verlaufen ist und ob es sich bei den heute noch Vanadium im aktiven Zentrum enthaltenden Beispielen um tradierte, dem Evolutionsdruck nicht gewichene Funktionsträger handelt. Neue Erkenntnisse über Analogien im Zusammenhang mit Vanadat und Phosphat in biologischen Systemen könnten zur Beantwortung dieser Frage von Bedeutung sein.

Die weitreichenden physiologischen Wirkungen von Vanadium werden im wesentlichen der Ähnlichkeit der Vanadat(v)-Ionen mit Phosphat-Ionen zugeschrieben. Es gibt jedoch auch wichtige Unterschiede zwischen diesen beiden Anionen. So liegt das Monovanadat bei physiologischen pH-Werten als zweifach protonierte $[\text{VO}_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})]^-$ -Spezies vor, das Phosphat hingegen in der monoprotonierten Form HPO_4^{2-} . Dies ist nicht zuletzt im Zusammenhang mit möglichen Ionentransportmechanismen beider Anionen von Bedeutung.^[3–5] Ein weiterer Unterschied besteht in der unter physiologischen Bedingungen leichten Reduzierbarkeit des Vanadats und dem damit verbundenen Übergang zu kationischen Spezies. Der dritte Unterschied liegt in der ausgeprägten Neigung von Vanadiumzentren, höhere Koordinationszahlen einzunehmen, und läßt sich gezielt zur strukturellen Untersuchung Phosphat-metabolisierender Enzyme einsetzen.

Im Zusammenhang mit der Isolierung von stabilen Enzymkomplexen mit Vanadat als Übergangszustandsanalogon des Phosphats wurde in jüngster Zeit über die Kristallstrukturen einiger derartiger Komplexe von Phosphatasen berichtet. Ein interessantes Beispiel sind die Protein-Tyrosin-Phosphata-

sen.^[6, 7] Dies sind Enzyme, die an Signalübertragungen beteiligt sind (z.B. beim Insulinrezeptorsystem) – hier sei auch auf den insulinmimetischen Effekt von Vanadiumkomplexen hingewiesen.^[8] Dabei ist das Vanadiumzentrum trigonal-bipyramidal umgeben und über einen axial koordinierenden Cysteinliganden an das Protein gebunden, während die Sauerstoffzentren der Vanadateinheit über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein wechselwirken. Prinzipiell ähnlich aufgebaut ist auch das aktive Zentrum einer sauren Phosphatase aus der Prostata von Ratten mit angelagertem Vanadat^[9] (Abbildung 1, oben). Allerdings wird das Protein in diesem Fall über einen Histidinrest gebunden, der ebenfalls eine axiale Koordinationsstelle am Vanadiumzentrum besetzt.

Das aktive Zentrum des bisher einzigen strukturell charakterisierten vanadiumabhängigen Enzyms, der Chloroperoxidase aus dem Pilz *Curvularia inaequalis*, weist eine frappierende Ähnlichkeit zu dem der eben beschriebenen sauren Phosphatase auf (Abbildung 1, unten).^[10–12] Das Vanadat ist auch hier durch die Koordination eines Histidinrests direkt an das Protein gebunden und über ein ausgeprägtes Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen in das Protein eingebettet.

Vanadiumabhängige Haloperoxidasen (V-HPO) katalysieren die Zweielektronenoxidation von Halogenidionen (X^-) zur entsprechenden Monooxohalogenensäure [Gl. (1)].^[13] Dabei kann die gebildete Monooxohalogenensäure unter Bildung



von halogenierten Produkten mit vielen nucleophilen Akzeptoren weiterreagieren. Der Name der Haloperoxidase ergibt sich aus dem elektronegativsten Halogenidion, dessen Oxidation katalysiert wird. Daher ist eine vanadiumabhängige Chloroperoxidase (V-CPO) in der Lage, sowohl Chlorid- als auch Bromid- und Iodidionen zu oxidieren.

Aus den inzwischen publizierten Kristallstrukturen der nativen sowie der Apoform und der Peroxid- sowie der Azid-gebundenen Derivate dieser Chloroperoxidase^[10–12] ergeben sich auch einige interessante Fragen: 1) Welche elektronische Struktur weist die Vanadateinheit des aktiven Zentrums auf, d.h., liegt eine Mono- oder eine Dioxovanadium(v)-Spezies vor (VO^{3+} oder VO_2^+)? 2) Wie sind das Peroxo- und das Chloridion an das aktive Zentrum gebunden? 3) Welchen Einfluß hat die Proteinumgebung auf die Struktur des aktiven Zentrums und den Mechanismus? 4) Weist das Apoprotein dieser Chloroperoxidase die wegen seiner Struktur analogie zu Phosphatasen erwartete Enzymaktivität auf?

[*] Priv.-Doz. Dr. W. Plass
Fakultät für Chemie der Universität
Postfach 100131, D-33501 Bielefeld
Fax: (+49) 521-106-6146
E-mail: winfried.plass@uni-bielefeld.de

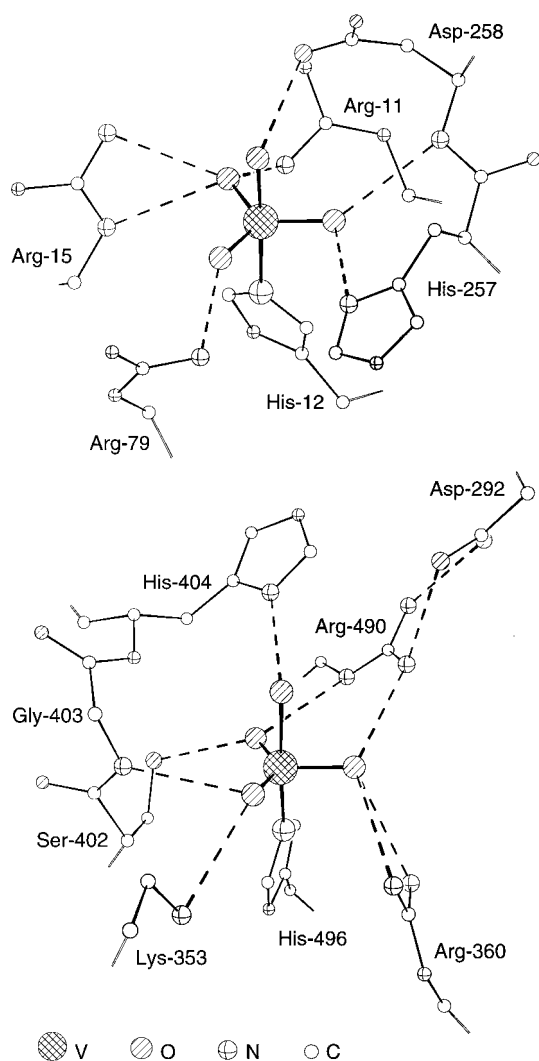


Abbildung 1. Oben: Struktur des aktiven Zentrums der sauren Phosphatase aus der Prostata von Ratten mit einem gebundenen Vanadat-Ion.^[9] Unten: Struktur des aktiven Zentrums der vanadiumabhängigen Haloperoxidase aus dem Pilz *Curvularia inaequalis*.^[11] Die Wasserstoffbrückenbindungen sind jeweils als gestrichelte Linien dargestellt.

Wie Wever et al. kürzlich zeigten, kann das Apoprotein der Chloroperoxidase aus dem Pilz *Curvularia inaequalis* tatsächlich die Spaltung von Phosphorsäureestern katalysieren.^[14] Auch wenn den kinetischen Daten zufolge dieses aktive Zentrum eindeutig nicht für eine Phosphataseaktivität optimiert ist, so können in ein und derselben supramolekularen Umgebung dennoch zwei derart unterschiedlich katalysierte Reaktionen wie die einer Haloperoxidase und die einer Phosphatase ablaufen. Das Strukturmotiv sollte daher auch Grundlage für die aktiven Zentren anderer V-HPOs und Phosphatasen sein. Diese Strukturanalogie sollte sich auch genetisch widerspiegeln. Wie ein Sequenzvergleich entsprechender Enzyme zeigt, sind nahezu alle am Aufbau des aktiven Zentrums der V-CPO aus *Curvularia inaequalis* beteiligten Aminosäuren (Lys 353, Arg 360, Ser 402, Gly 403, His 404, Arg 490 und His 496, siehe Abbildung 1, unten) sowohl in den bisher sequenzierten V-HPOs als auch in drei Gruppen saurer Phosphatasen konserviert (Abbildung 2).^[14] Hierbei spielen die beiden vollständig konservierten Histi-

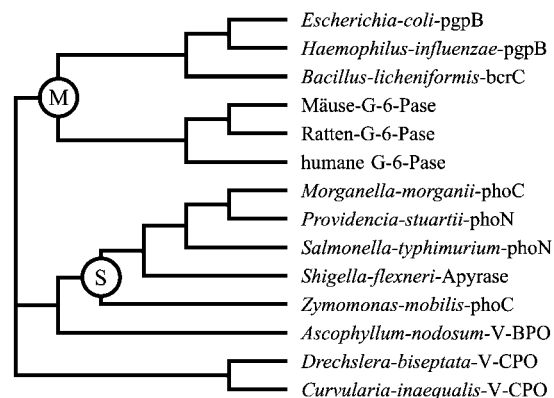


Abbildung 2. Dendrogramm für 14 Phosphatasen und vanadiumabhängige Haloperoxidasen (nach Lit. [14]). Die Gruppe der membrangebundenen Phosphatasen ist mit einem M und die Gruppe der löslichen Phosphatasen mit einem S gekennzeichnet. Abkürzungen: pgpB = Phosphatdiyl-Glycerophosphat-Phosphatase-B; bcrC = Genprodukt von *Bacillus licheniformis*, dem bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte; G-6-Pase = Glucose-6-Phosphatase; phoC und phoN = bakterielle saure Phosphatasen der Klasse A; Apyrase = ATP-Diphosphohydrolase; V-BPO = vanadiumabhängige Bromoperoxidase; V-CPO = vanadiumabhängige Chloroperoxidase.

dinreste eine besondere Rolle, da His 496 das Vanadat kovalent bindet und His 404 vermutlich als Säure-Base-Acceptor für die katalytische Funktion essentiell ist. Angesichts der festgestellten Phosphataseaktivität des Apoproteins der V-CPO deutet dies darauf hin, daß die aktiven Zentren von V-HPOs und sauren Phosphatasen sehr ähnliche Strukturen aufweisen.

Ein Dendrogramm (Abbildung 2), basierend auf den bei einem Sequenzvergleich festgestellten Homologien zwischen den Aminosäuresequenzen von 14 Phosphatasen und V-HPOs, deutet auf eine divergente Evolution dieser Enzyme ausgehend von gemeinsamen Vorfahren hin. In Kombination mit der für die V-CPO aus *Curvularia inaequalis* beobachteten Stabilität auch gegenüber hohen Konzentrationen des Substrats H_2O_2 und des Reaktionsprodukts HOX, die Hämhaltige HPOs sofort inaktivieren würden, spricht dies gegen die eingangs formulierte Vermutung, V-HPOs seien lediglich tradierte, dem Evolutionsdruck nicht gewichene Funktionsträger. Auch die kürzlich postulierte, gewissermaßen optimierte Funktion der V-CPO aus *Curvularia inaequalis*, die zur Synthese der Vorstufe einer chemischen Waffe – dem Hydroxylradikal – führt [Gl. (2)], weist darauf hin. Die Hydroxylradikale werden von diesen Pilzen zur Zerstörung der Ligninschutzhülle ihrer potentiellen Wirte (Nährstofflieferanten) verwendet.^[15]



Hier sei angemerkt, daß eine andere Gruppe von sauren Phosphatasen, zu der auch die saure Phosphatase aus der Prostata von Ratten gehört (Abbildung 1, oben), keine Sequenzhomologie zu den im Dendrogramm aus Abbildung 2 enthaltenen Phosphatasen und V-HPOs aufweist. Interessanterweise spricht die dennoch vorhandene Strukturanalogie des aktiven Zentrums, die aus Abbildung 1 ersichtlich wird, für eine konvergente Evolution dieser Enzymsysteme.

Neben den interessanten Aspekten hinsichtlich der Evolution dieser Enzyme ergeben sich auch wichtige Folgen für die Forschung auf dem Gebiet der V-HPOs und der sauren Phosphatasen. Ein besonders aus anthropozentrischer Sicht bemerkenswertes erstes Beispiel dafür ist die Struktur der Glucose-6-Phosphatase (G-6-Pase) von Säugetieren. Dieses Enzym katalysiert den letzten Schritt der Gluconeogenese/Glycogenolyse und ist somit ein Schlüsselenzym für die Regulierung des Blutzuckerspiegels. Das Fehlen der G-6-Pase-Aktivität ist die Ursache für die Glycogen-Speicherkrankheit Typ1 (von-Gierke-Krankheit) und führt zu klinischen Symptomen, wie erhöhtem Blutzuckerspiegel, Nierenvergrößerung oder Wachstumshemmung, die in der Regel zum frühen Tod dieser Patienten führen.

Das kürzlich publizierte Modell für die Membrantopologie der humanen G-6-Pase^[16] steht mit den hier beschriebenen neuen Erkenntnissen nicht in Einklang und mußte, wie in Abbildung 3 gezeigt ist, grundlegend modifiziert werden.^[17] Die aufgrund der Sequenzhomologie als konstituierende Bestandteile des aktiven Zentrums identifizierten Aminosäuren der G-6-Pase befinden sich im neuen Modell alle auf einer Seite der Membran und sind im Bereich der Helices II–V lokalisiert. Hierbei sollte der Histidinrest His176 als Nucleophil die Anknüpfung des Substrats an das Enzym ermöglichen, das über Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Lys76, Arg83 und Arg170 weiter fixiert werden kann. In Analogie zum aktiven Zentrum der V-CPO können auch Ser117 und Gly118 zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen bilden. Das für die Freisetzung des Glucosemoleküls benötigte Proton stammt im neuen Modell vom Histidinrest His119.

Wie dieses erste Beispiel zeigt, ergeben sich aus der beobachteten gemeinsamen Architektur der aktiven Zentren von vanadiumabhängigen Peroxidasen und den sequenzhomologen sauren Phosphatasen wichtige Konsequenzen, die bis in vermeintlich unabhängige Forschungsgebiete hineinreichen.

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 909–912

Stichwörter: Bioanorganische Chemie • Haloperoxidasen • Phosphatasen • Phosphor • Vanadium

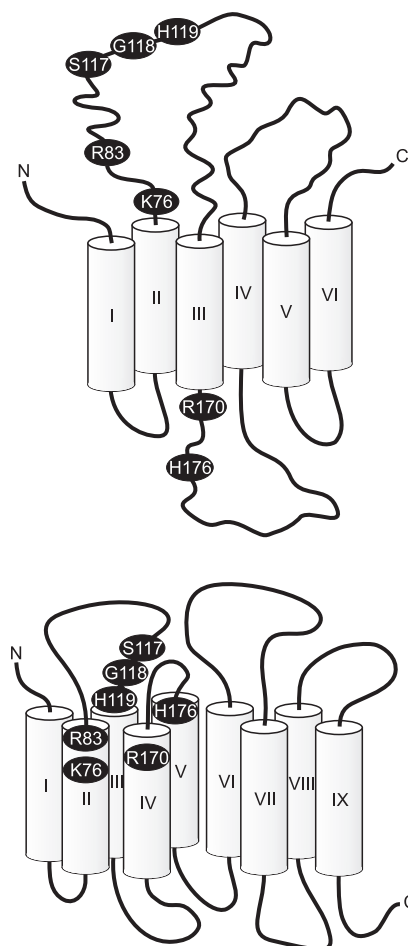


Abbildung 3. Modelle der Membrantopologie von Glucose-6-Phosphatase. Oben: bisheriges Modell mit sechs Transmembranhelices.^[16] Unten: neues Modell mit neun Transmembranhelices.^[17] Die vermutlich am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligten Aminosäuren sind als schwarze Ovale dargestellt.

- [1] C. Slebodnick, B. J. Hamstra, V. L. Pecoraro, *Struct. Bonding* **1997**, 89, 51–108.
- [2] „Vanadium and Its Role in Life“: *Metal Ions in Biological Systems, Vol. 31* (Hrsg.: H. Sigel, A. Sigel), Marcel Dekker, New York, **1995**.
- [3] F. A. Quijcho, P. S. Ledvina, *Mol. Microbiol.* **1996**, 20, 17–25.
- [4] H. Luecke, F. A. Quijcho, *Nature* **1990**, 347, 402–406.
- [5] O. Herzberg, P. Reddy, S. Sutrina, J. M. H. Saier, J. Reizer, G. Kapadia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 2499–2503.
- [6] J. M. Denu, D. L. Lohse, J. Vijayalakshmi, M. A. Saper, J. E. Dixon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 2493–2498.
- [7] M. Zhang, M. Zhou, R. L. van Etten, C. V. Stauffacher, *Biochemistry* **1997**, 36, 15–23.

- [8] „Vanadium and Its Role in Life“: C. Orvig, K. H. Thompson, M. Battell, J. H. McNeill in *Metal Ions in Biological Systems, Vol. 31* (Hrsg.: H. Sigel, A. Sigel), Marcel Dekker, New York, **1995**, S. 575–594.
- [9] Y. Lindqvist, G. Schneider, P. Vihko, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 221, 139–142.
- [10] A. Messerschmidt, R. Wever, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 392–396.
- [11] A. Messerschmidt, L. Prade, R. Wever, *Biol. Chem.* **1997**, 378, 309–315.
- [12] A. Messerschmidt, R. Wever, *Inorg. Chim. Acta* **1998**, 273, 160–166.
- [13] S. L. Neidleman, J. Geigert, *Biohalogenation: Principles, Basic Roles and Applications*, Ellis Horwood, Chichester, **1986**.
- [14] W. Hemrika, R. Renirie, H. L. Dekker, P. Barnett, R. Wever, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 2145–2149.
- [15] P. Barnett, D. L. Kruitbosch, W. Hemrika, H. L. Dekker, R. Wever, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1352, 73–84.
- [16] K.-J. Lei, C.-J. Pan, J.-L. Liu, L. L. Shelly, J. Y. Chou, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 11882–11886.
- [17] W. Hemrika, R. Wever, *FEBS Lett.* **1997**, 409, 317–319.