

# Wie funktioniert die Tyrosinase? Neue Einblicke aus Modellchemie und Strukturbiochemie\*\*

Heinz Decker,\* Renée Dillinger und Felix Tuczek\*

## Einleitung

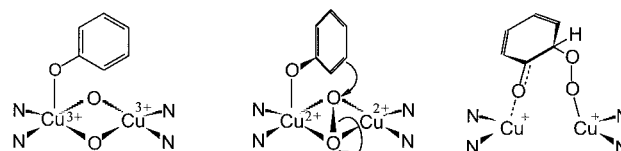
Die Katalyse von Oxygenierungs- und Oxidationsreaktionen durch Tyrosinase und Catechol-Oxidase ist zurzeit eines der aufregendsten Forschungsgebiete der bioanorganischen Chemie. Diese Enzyme gehören zur Familie der Typ-3-Kupferproteine, die eine Vielzahl biologischer Funktionen erfüllen. Hämocyanine dienen als Sauerstofftransportproteine im Blut von Arthropoden und Mollusken,<sup>[1]</sup> Catechol-Oxidase (COasen) oxidieren *ortho*-Diphenole zu *ortho*-Chinonen (Diphenolase-Aktivität),<sup>[2]</sup> und Tyrosinasen sind verantwortlich für die Hydroxylierung von Mono- zu *ortho*-Diphenolen sowie für die nachfolgende Oxidation zu *ortho*-Chinonen (Monophenolase-Aktivität).<sup>[3]</sup> Trotz über einhundertjähriger Forschung sind weder diese Reaktionen noch die beobachteten funktionellen Unterschiede auf molekularem Niveau verstanden.

Außer von Tyrosinase sind inzwischen von allen Klassen der Typ-3-Kupferproteine Kristallstrukturen bekannt: die Desoxy-Form des Hämocyanins aus *Panulirus interruptus*,<sup>[4]</sup> die Oxy- und Desoxy-Form des Hämocyanins des Pfeilschwanzkrebses (*Limulus polyphemus*),<sup>[5]</sup> die Oxy-Form des Hämocyanins aus *Octopus dofleini*<sup>[6]</sup> und die Desoxy-, Met- und inhibitor gebundenen Formen einer COase aus Süßkartoffeln (*Ipomoea batatas*).<sup>[7]</sup> Wie erwartet enthalten alle diese Proteine weitgehend identische aktive Kupferzentren, welche in ihrer Desoxy-Cu<sup>I</sup>-Cu<sup>I</sup>-Form reversibel Sauerstoff binden, wobei eine zweikernige Cu<sup>II</sup>-Einheit mit side-on verbrückend ( $\mu$ - $\eta^2$ : $\eta^2$ ) gebundenem Peroxidliganden entsteht. Basierend auf diesen Strukturdaten scheint ein mechanistisches Verständnis der entsprechenden biochemischen Reaktionen nun in greifbare Nähe gerückt. Von besonderem Interesse ist dabei die kürzliche Entdeckung von Mono- und Diphenolase-Aktivität in aktivierten Hämocyaninen.<sup>[8]</sup> Sie liefert Informationen über die Orientierung monophenolischer Substrate innerhalb der Proteintasche, die das aktive Kupferzentrum enthält.

Der wachsende strukturelle Einblick in die Grundlagen der COase- und Tyrosinase-Aktivität wird durch eine beachtliche Menge an chemischen und mechanistischen Informationen aus der Erforschung synthetischer, niedermolekularer Modellkomplexe ergänzt.<sup>[9]</sup> Die elektronisch-strukturelle, spektroskopische und chemische Charakterisierung der Cu<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zentren, welche in diesen anorganischen Modellen vorkommen, ist bereits für sich genommen ein faszinierendes Gebiet der bioanorganischen Forschung und wird höchstwahrscheinlich entscheidend für das weitere Verständnis der von Tyrosinase katalysierten Oxygenierungsreaktionen sein. Hier beschreiben wir zunächst Schlüsselergebnisse dieser Modellstudien, welche dann den mechanistischen Vorschlägen, die aus strukturell charakterisierten Proteinen abgeleitet werden können, gegenübergestellt werden.

## Cu<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Modellchemie: Was ist das hydroxylierende Agens?

Der mechanistisch anspruchsvollste Schritt der Tyrosinase-Aktivität ist die Einführung einer zweiten OH-Gruppe in den aromatischen Ring eines Monophenols (z. B. Tyrosin) in *ortho*-Position, die mit der Zwei-Elektronen-Oxidation des entstehenden Brenzcatechins zum entsprechenden Chinon (z. B. Dopachinon) gekoppelt ist. Von besonderer Bedeutung für ein Verständnis dieser Reaktion ist, ob die O-O-Bindung *vor*, *gleichzeitig mit* oder *nach* dem Angriff des Sauerstoffs auf den aromatischen Ring gespalten wird (Schema 1).<sup>[3a]</sup> Im ersten Fall würde die Hydroxylierung durch ein Bis( $\mu$ -oxo)-



Schema 1. Mögliche Reaktionsmechanismen der Oxygenierung von Phenolen durch Cu<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zentren.

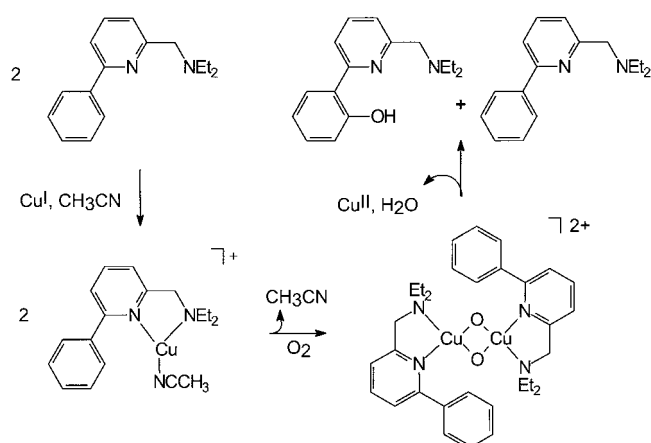
Zentrum erfolgen (siehe unten). Das letzte Szenario würde zu einer Aryl-Peroxo-Zwischenstufe führen, die zum Diphenol (Chinon) weiterreagierte. Im zweiten Fall (Schema 1, Mitte) wäre der Hydroxylierungsschritt eine elektrophile aromatische Substitution (S<sub>E</sub>) durch Peroxid, wobei das  $\pi$ -System durch die erste OH-Gruppe für diese Reaktion aktiviert ist. Der elektrophile Charakter des side-on verbrückend gebundenen Peroxidliganden wird durch eine große Ladungsdonierung in die Cu<sup>II</sup>-Zentren erklärt, die dazu führt, daß dies die am wenigsten negativ geladene Form von Peroxid ist.<sup>[3b, 10]</sup>

Ein prototypisches Beispiel für diese Reaktivität ist der zweikernige Kupferkomplex [Cu<sub>2</sub>(R-XYL)]<sup>2+</sup> (Schema 2). In dem eine zweikernige Konstitution induzierenden Liganden R-XYL-H werden zwei dreizählige Bis[2-(2-pyridyl)ethyl]-

[\*] Prof. Dr. H. Decker  
Institut für Molekulare Biophysik  
Johannes Gutenberg Universität  
Jakob Welder Weg 26, 55128 Mainz (Deutschland)  
Fax: (+49) 6131-3923557  
E-mail: decker@biophysik.biologie.uni-mainz.de  
Prof. Dr. F. Tuczek, Dipl.-Chem. R. Dillinger  
Institut für Anorganische Chemie  
Christian Albrechts Universität  
Olshausenstraße 40, 24098 Kiel (Deutschland)  
Fax: (+49) 431-8801520  
E-mail: ftuczek@ac.uni-kiel.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Naturwissenschaftlich-Medizinischen Forschungszentrum der Universität Mainz (H.D.) und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (F.T., R.D.) gefördert. Die Autoren danken M. Möller für die Hilfe beim Erstellen der Graphiken.





Schema 4. Ablauf der Ligandenhydroxylierung im Modellsystem von Tolman. Die Hydroxylierung verläuft über ein Bis( $\mu$ -oxo)dikupfer(III)-Intermediat.

ersetzt werden, welche als „exogene“ Liganden koordiniert und eventuell umgesetzt werden? Mögliche Antworten auf diese Frage liefert das Studium von  $\text{Cu}_2\text{O}_2$ -Modellsystemen, die mit externen Phenolen reagieren. Allerdings entstehen in fast allen bekannten Fällen bei einer solchen Reaktion unphysiologische Radikalkopplungsprodukte.<sup>[20]</sup> Erklärt wird dieser Sachverhalt mit der primären Bildung von Phenoxyradikalen durch H-Atom-Abstraktion aus den entsprechenden Phenolen, welche durch das  $\text{Cu}_2\text{O}_2$ -Zentrum vermittelt wird. Sowohl Komplexe mit side-on koordiniertem Peroxid<sup>[20a-c]</sup> als auch solche mit einem Bis( $\mu$ -oxo)-Zentrum<sup>[20e,f]</sup> zeigen diese Reaktivität. Inzwischen ist aber auch ein Modellsystem bekannt, welches externe Phenole im Sinne einer Tyrosinase-Reaktion hydroxyliert.<sup>[21]</sup>

Alternativ zum Studium von Modellkomplexen wird die Bindung von Substraten oder Substratanaloga (Inhibitoren usw.) an die aktiven Zentren von strukturell charakterisierten Typ-3-Kupferproteinen untersucht. Ein prominentes Beispiel für diesen zweiten Ansatz ist die kürzlich mit röntgenographischen Methoden gelöste Struktur einer 39-kDa-COase aus Süßkartoffeln, die einen offenen Zugang zum aktiven Zentrum zeigt (Abbildung 1 a).<sup>[7]</sup> In der Met-Form ist nur CuB für die Koordinierung durch ein phenolisches Substrat zugänglich. Wichtig ist, dass die strukturelle Charakterisierung der inhibitor gebundenen Form dieses Enzyms einen genauen Vorschlag für die Koordination von *ortho*-Diphenolen erlaubte. Vergleichbare strukturelle Einblicke zur Bindung von Monophenolen wurden aus der Untersuchung „aktivierter“ Hämocyanine erhalten. Besonders interessant ist hier die Entdeckung von Mono- und Diphenolase-Aktivität in Spinnen-Hämocyanin nach begrenzter Proteolyse mit Trypsin oder Chymotrypsin.<sup>[8c]</sup> Dieser Aktivierungsmechanismus wurde auf der Basis des strukturell eng verwandten Hämocyanins von *Limulus polyphemus*<sup>[5]</sup> erklärt: Das N-terminale Peptid, welches Phe49 enthält, einen streng konservierten Rest in Hämocyaninen und Phenol-Oxidasen aus Arthropoden, wird aus einer Kavität herausgezogen und zurück bleiben eine Tasche sowie ein freier Zugang zum aktiven Kupferzentrum für Sauerstoff und potentielle Substrate (Abbildung 1 b). Ein raumfüllend dargestelltes Tyrosin-Substrat, welches exakt wie Phe49 in diese Tasche gesetzt ist, zeigt, dass keine großen

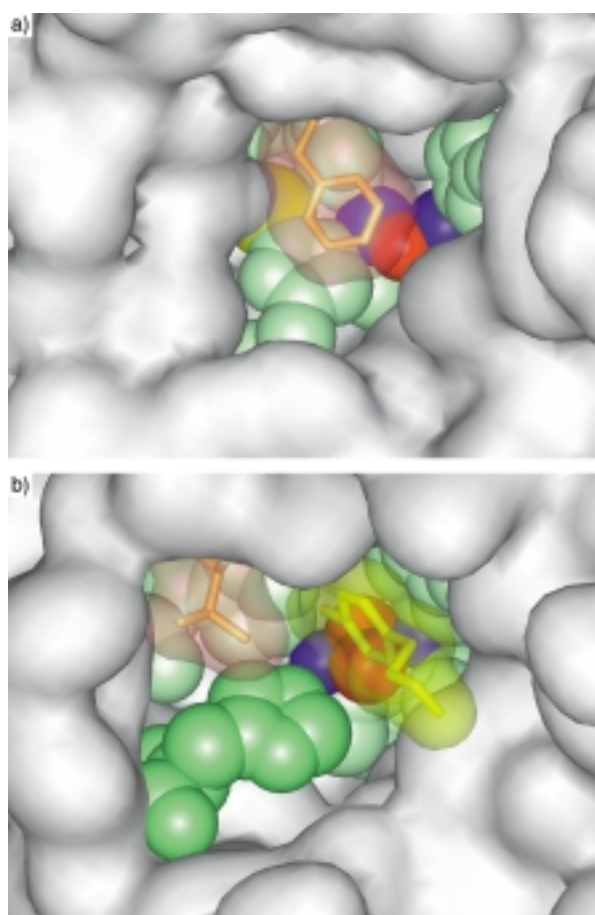


Abbildung 1. a) Blick auf das aktive Zentrum der Catechol-Oxidase in der Met-Form. Die zwei Kupferatome (blau) werden durch sechs Histidinreste (grün) koordiniert. Ein stabilisierender Cysteinrest (dunkelgelb) ist mit Van-der-Waals-Radius gezeigt. CuA wird durch einen Phenylalaninrest (orange) abgeschirmt. Diphenole binden vermutlich an CuB (siehe Text). b) Substratbindungstasche und Orientierung eines hypothetischen phenolischen Substrats (Tyrosin) in Hämocyaninen. Blick auf ein hypothetisches Tyrosin-Substrat (gelb), welches Phe49 der nativen Struktur ersetzt (siehe Text), in der Proteintasche von *Limulus*-Oxyhämocyanin. Raumfüllende (transparente) Atome zeigen, dass das Substrat perfekt passt. Sauerstoff ist in einer  $\mu$ - $\eta^2$ -Koordination gebunden.

Freiheiten für andere Orientierungen bestehen. Das lässt sich auf sterische Einschränkungen durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Benzolring des Substrats und dem axialen His328 an CuB (grün) und einem Thr351 neben CuA (orange, transparent) zurückführen. Es resultiert eine Koordinationsgeometrie des Substrats, in der der Benzolring fast senkrecht zur Cu-O<sub>2</sub>-Cu-Ebene steht und enge Kontakte (unter 4 Å) der Hydroxygruppe zu CuA (blau) und der *ortho*-Position zu einem der beiden Sauerstoffatome des Peroxids bestehen (rot, Abbildung 2).<sup>[8c]</sup> Das deutet auf Bindung an CuA hin, in Übereinstimmung mit früheren Konzepten, die eine direkte Koordination des phenolischen Substrats an ein Kupferzentrum, bevorzugt CuA, annahmen.<sup>[3a]</sup> Weiterhin sollte die Nähe der *ortho*-Position des aromatischen Rings zum Peroxidliganden essentiell für die Hydroxylierungsreaktion sein (siehe unten). Der Vergleich mit dem aktiven Zentrum der COase (Abbildung 1 a) ergibt, dass CuA in ihr durch einen Phenylalaninrest (orange) abgeschirmt ist. Dies

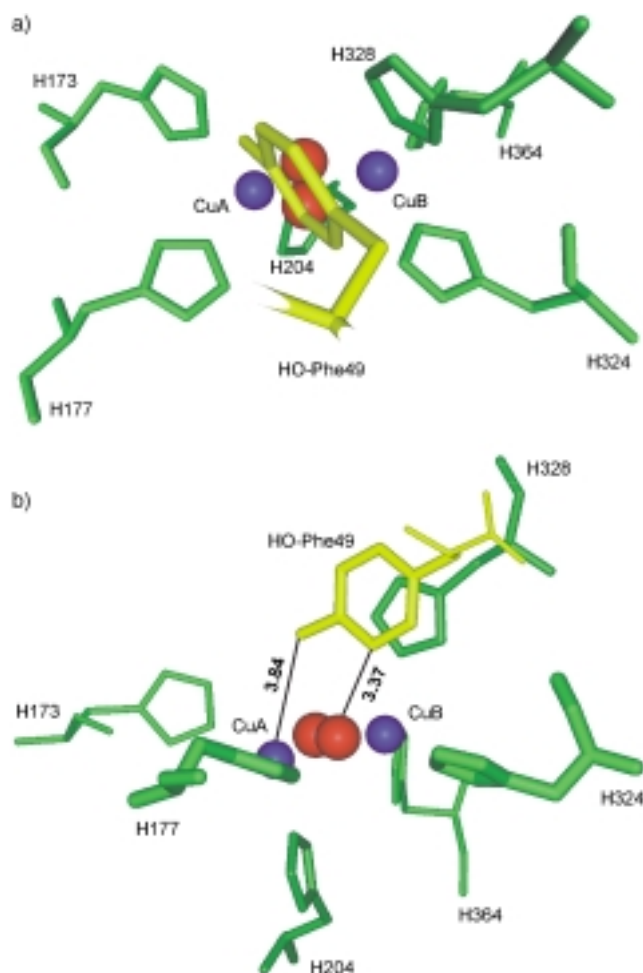


Abbildung 2. Blick von oben (a) und von der Seite (b) auf die Koordinationsgeometrie des hydroxylierten Phe 49, nach Decker und Rimke<sup>[8c]</sup> ein hypothetisches Substrat, am aktiven Zentrum. Die Abstände zwischen der Hydroxygruppe und CuA sowie der *ortho*-Position des Benzolrings und dem Peroxidliganden sind in Å angegeben.

könnte der Grund für die fehlende Monophenolase-Aktivität des Enzyms sein.

Rückblickend auf das Modell von Karlin wird nun klar, dass von den beiden Reaktionspfaden in Schema 3 nur der erste (A,  $\pi$ -Donierung in das LUMO der side-on gebundenen Peroxo-Einheit) mit der Substratorientierung in Abbildung 2 in Einklang zu bringen ist. Bei der Möglichkeit B dagegen ist anzunehmen, dass die Ebene des aromatischen Rings nicht in die Tasche mit dem aktiven Zentrum passen würde. Zum gleichen Schluss kamen Karlin et al. für das oben diskutierte Modellsystem.<sup>[12]</sup> Mit der vorgeschlagenen Bindungsgeometrie erhebt sich die Frage nach der zeitlichen Reihenfolge von Hydroxylierung (Angriff von O<sub>2</sub>) und möglicher Bindung an CuA: Wird das Phenol nämlich zuerst an dieses Zentrum gebunden, kommt es zum Ligand  $\rightarrow$  Metall-Charge-Transfer, der die Aktivierung des aromatischen Rings für einen elektrophilen Angriff schwächen würde. Darüber hinaus würde bei Koordination des phenolischen Substrats die Ladungsdonierung vom Peroxidliganden zu Kupfer abnehmen, was zu einem weniger elektrophilen O<sub>2</sub>-Liganden führte. Beide Faktoren würden somit einer *elektrophilen* Substitution (Hydroxylierung) entgegenwirken. Zusätzlich zu der oben

diskutierten Frage nach dem hydroxylierenden Agens (side-on gebundener Peroxidligand oder Bis( $\mu$ -oxo)-Spezies) muss also geklärt werden, ob phenolische Substrate überhaupt an ein Cu-Zentrum der Cu<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Einheit binden, und wenn ja, *vor*, *nach* oder *gleichzeitig* mit der Hydroxylierung.<sup>[3a, 22]</sup> Schließlich sollte noch erwähnt werden, dass auch radikalische Reaktionswege für Tyrosinase diskutiert wurden, z.B. in einem mechanistischen Vorschlag von Kitajima und Morooka.<sup>[20c]</sup> Eine aktuelle theoretische Arbeit über Tyrosinase-Aktivität von Lind, Siegbahn und Crabtree kommt ebenfalls zu dem Ergebnis, dass ein radikalischer Mechanismus eine denkbare Alternative zur elektrophilen Substitution ist.<sup>[23]</sup> Eine Antwort auf die Frage zu finden, welcher dieser Reaktionswege tatsächlich für Tyrosinase gültig ist (oder ob mehrere Mechanismen für die Hydroxylierung von Monophenolen existieren), wird auch in den nächsten Jahren eine große Herausforderung für die bioanorganische Chemie sein.

- [1] a) K. E. van Holde, K. I. Miller, *Adv. Protein Chem.* **1995**, *47*, 1–81; b) B. Salvato, M. Beltramini, *Life Chem. Rep.* **1990**, *8*, 1–47.
- [2] C. Eicken, F. Zippel, K. Büldt-Karentzopoulos, B. Krebs, *FEBS Lett.* **1998**, *436*, 293–299.
- [3] a) E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2563–2605; b) E. I. Solomon, F. Tuzcek, D. E. Root, C. A. Brown, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 827–856; c) A. Sanchez-Ferrer, J. N. Rodriguez-López, F. Garcia-Cánovas, F. Garcia-Carmona, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1247*, 1–11.
- [4] a) W. P. J. Gaykema, W. G. J. Hol, J. M. Vereijken, N. M. Soeter, H. J. Bak, J. J. Beintema, *Nature* **1984**, *309*, 23–29; b) A. Volbeda, W. G. J. Hol, *J. Mol. Biol.* **1989**, *209*, 249–279.
- [5] a) B. Hazes, K. A. Magnus, C. Bonaventura, J. Bonaventura, Z. Dauter, K. H. Kalk, W. G. J. Hol, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 597–619; b) K. A. Magnus, B. Hazes, H. Ton-That, C. Bonaventura, J. Bonaventura, W. G. J. Hol, *Proteins* **1994**, *19*, 302–309.
- [6] M. E. Cuff, K. I. Miller, K. E. van Holde, W. A. Hendrickson, *J. Mol. Biol.* **1998**, *278*, 855–870.
- [7] T. Klabunde, C. Eicken, J. C. Sacchettini, B. Krebs, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 1084–1090.
- [8] a) B. Salvato, M. Santamaria, M. Beltramini, G. Alzuet, L. Casella, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14065–14077; b) T. Zlateva, P. di Muro, B. Salvato, M. Beltramini, *FEBS Lett.* **1996**, *384*, 251–254; c) H. Decker, T. Rimke, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25889–25892.
- [9] P. L. Holland, W. B. Tolman, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *190–192*, 855–869, zit. Lit.
- [10] P. K. Ross, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3246–3259.
- [11] a) K. D. Karlin, J. C. Hayes, Y. Gultneh, R. W. Cruse, J. W. McKown, J. P. Hutchinson, J. Zubieta, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2121–2128; b) K. D. Karlin, M. S. Nasir, B. I. Cohen, R. W. Cruse, S. Kaderli, A. D. Zuberbühler, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1324–1336.
- [12] E. Pidcock, H. V. Obias, C. X. Zhang, K. D. Karlin, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7841–7847.
- [13] W. B. Tolman, *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 227–237, zit. Lit.
- [14] a) V. Mahadevan, Z. Hou, A. P. Cole, D. E. Root, T. K. Lal, E. I. Solomon, T. D. P. Stack, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11996–11997; b) J. L. DuBois, P. Mukherjee, A. M. Collier, J. M. Mayer, E. I. Solomon, B. Hedman, T. D. P. Stack, K. O. Hodgson, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8578–8579.
- [15] a) J. A. Halfen, S. Mahapatra, E. C. Wilkinson, S. Kaderli, V. G. Young, Jr., L. Que, Jr., A. D. Zuberbühler, W. B. Tolman, *Science* **1996**, *271*, 1397–1400; b) J. Cahoy, P. L. Holland, W. B. Tolman, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 2161–2168.
- [16] a) S. Mahapatra, J. A. Halfen, W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11575–11586; b) S. Mahapatra, S. Kaderli, A. Llobet, Y.-M. Neuhold, T. Palanché, J. A. Halfen, V. G. Young, Jr., T. A. Kaden, L. Que, Jr., A. D. Zuberbühler, W. B. Tolman, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 6343–6356.

- [17] M. J. Henson, P. Mukherjee, D. E. Root, T. D. P. Stack, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10332–10345.
- [18] a) S. Itoh, H. Nakao, L. M. Berreau, T. Kondo, M. Komatsu, S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2890–2899; b) S. Itoh, H. Bando, S. Nagatomo, T. Kitagawa, S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8945–8946.
- [19] P. L. Holland, K. R. Rodgers, W. B. Tolman, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1210–1213; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1139–1142.
- [20] a) N. Kitajima, T. Koda, Y. Iwata, Y. Moro-oka, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8833–8839; b) P. P. Paul, Z. Tyeklár, R. R. Jacobson, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5322–5332; c) N. Kitajima, Y. Moro-oka, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 737–757; d) S. Mahapatra, J. A. Halfen, E. C. Wilkinson, L. Que, Jr., W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9785–9786; e) H. V. Obias, Y. Lin, N. N. Murthy, E. Pidcock, E. I. Solomon, M. Ralle, N. J. Blackburn, Y.-M. Neuhold, A. D. Zuberbühler, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12960–12961; f) V. Mahadevan, J. L. DuBois, B. Hedman, K. O. Hodgson, T. D. P. Stack, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5583–5584.
- [21] a) L. Santagostini, M. Gullotti, E. Monzani, L. Casella, R. Dillinger, F. Tuczek, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 519–522; b) L. Casella, E. Monzani, M. Gullotti, D. Cavagnino, G. Cerina, L. Santagostini, R. Ugo, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 7516–7525.
- [22] Die direkte Bindung von Substratanaloga an das aktive Kupferzentrum von Tyrosinase unter Verdrängung von O<sub>2</sub> wurde vor längerem gezeigt: a) M. E. Winkler, K. Lerch, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7001–7003; b) D. E. Wilcox, A. G. Porras, Y. T. Hwang, K. Lerch, M. E. Winkler, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4015–4027.
- [23] T. Lind, P. E. M. Siegbahn, R. H. Crabtree, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 1193–1202.