

# Das erste cadmiumspezifische Enzym

Henry Strasdeit\*

*Ähnelt Cadmium biochemisch mehr dem Zink oder dem Quecksilber?*

Die 12. Gruppe des Periodensystems ist in biologischer Hinsicht bemerkenswert. Ihr leichtestes Element, das Zink, kommt als essentieller Bestandteil in zahlreichen Proteinen vor. Völlig anders ist dagegen die Situation bei dem schwersten Gruppenhomologen, dem Quecksilber. Es zählt zu den giftigsten nichtradioaktiven Elementen. Auch beim Cadmium, dem mittleren Element der Gruppe, standen bisher nahezu ausschließlich seine Toxizität und Kanzerogenität im Vordergrund. Positive biologische Wirkungen, z. B. auf das Wachstum einer Pilzart,<sup>[1]</sup> wurden nur vereinzelt beschrieben und blieben biochemisch ungeklärt. Die kürzlich beschriebene Entdeckung des ersten Cadmiumenzym kann deshalb als ein Meilenstein in der biologischen Chemie des Cadmiums gelten.<sup>[2]</sup>

Cadmium unterscheidet sich chemisch recht deutlich vom Quecksilber. Dies gilt auch für viele Aspekte der Toxizität. So werden beispielsweise die Alkylspezies  $\text{MR}_2$  und  $\text{RM}^+$  beim Quecksilber nur langsam abgebaut und weisen daher eine eigene Vergiftungssymptomatik auf,<sup>[3]</sup> während sie beim Cadmium wegen ihrer schnellen Hydrolyse zu  $\text{Cd}^{2+}$  ohne spezielle toxikologische Bedeutung sind. Andererseits weiß man seit langem, dass Cadmium in seinen Verbindungen häufig dem Zink ähnelt. Vor diesem Hintergrund muss es also nicht gänzlich überraschen, dass auch Cadmium eine definierte Funktion in Organismen haben kann. In den ersten 140 Jahren nach seiner Entdeckung zeichnete sich davon in der biologischen Karriere dieses Elements allerdings noch nichts ab (Tabelle 1).

## Cadmiumsubstituierte Zinkproteine

Der Weg des Cadmiums zum „Bioelement“ wurde wesentlich durch Untersuchungen an Zinkproteinen geebnet. 1961 zeigten Coleman und Vallee, dass dem Zinkenzym Carboxypeptidase A das native Metallion mit Hilfe von Chelatbildnern entzogen und dann  $\text{Cd}^{2+}$  in das Apoenzym eingeführt werden kann.<sup>[4]</sup> Viele weitere Cd-substituierte Zinkproteine folgten. Anders als beim spektroskopisch „toten“ Zink konnte man jetzt die Möglichkeiten der  $^{113}\text{Cd}$ -NMR- und der  $^{111}\text{Cd}$ -PAC-Spektroskopie (PAC = perturbed angular correlation of  $\gamma$ -rays) nutzen, um die Strukturen der Metallzentren zu untersuchen. Die enzymatische Aktivität der Cd-Formen ist jedoch meist niedriger als die der Zinkenzyme und manchmal gar nicht mehr vorhanden. Ursache dafür sind die unterschiedlichen Ionenradien von  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ ; das

Tabelle 1. Eine kurze Chronik der biologischen Chemie des Cadmiums.

1858	40 Jahre nach der Entdeckung des Elements wird über erste Fälle von Cadmiumvergiftung beim Menschen berichtet
1946	Beginn der systematischen Erforschung der Itai-Itai-Krankheit in Japan; etwa 20 Jahre später wird erstmals chronische Cadmiumvergiftung als ein auslösender Faktor vermutet
1961	Tierexperimentelle Befunde geben erste Hinweise auf das kanzerogene Potential von Cadmium; 1993 stuft die International Agency for Research on Cancer das Cadmium als humankanzerogen ein In dem Zinkenzym Carboxypeptidase A kann $\text{Zn}^{2+}$ durch $\text{Cd}^{2+}$ ersetzt werden; das Cd-substituierte Enzym zeigt weiterhin Esteraseaktivität, die Peptidaseaktivität ist jedoch weitgehend verloren gegangen
1981	Es wird berichtet, dass Cadmium bei einer Champignonart wachstumsfördernd wirkt, einen Zinkmangel aber nicht kompensieren kann
1985	Kristallographische Untersuchungen zeigen, dass sich das aktive Zentrum einer Alkohol-Dehydrogenase strukturell nur geringfügig verändert, wenn das native $\text{Zn}^{2+}$ durch $\text{Cd}^{2+}$ ersetzt wird; trotzdem ist die Enzymaktivität stark vermindert
1989	Das erste cadmiumaktivierte Enzym, die Phytochelat-Synthase, wird beschrieben
1990	Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Kanzerogenität von Cadmium und der experimentell nachgewiesenen Substitution von $\text{Zn}^{2+}$ durch $\text{Cd}^{2+}$ in genregulierenden „Zinkfinger“-Proteinen wird diskutiert Unter Zinkmangel-Bedingungen nutzt die marine Kieselalge <i>Thalassiosira weissflogii</i> Cadmium als alternatives Bioelement
1994	Es wird vermutet, dass <i>T. weissflogii</i> fehlendes Zink in dem Zinkenzym Carboanhydrase durch Cadmium ersetzt
2000	Die Substitutionshypothese erweist sich als unzutreffend: <i>T. weissflogii</i> synthetisiert eine neuartige cadmiumspezifische Carboanhydrase – das erste Cadmiumenzym ist gefunden

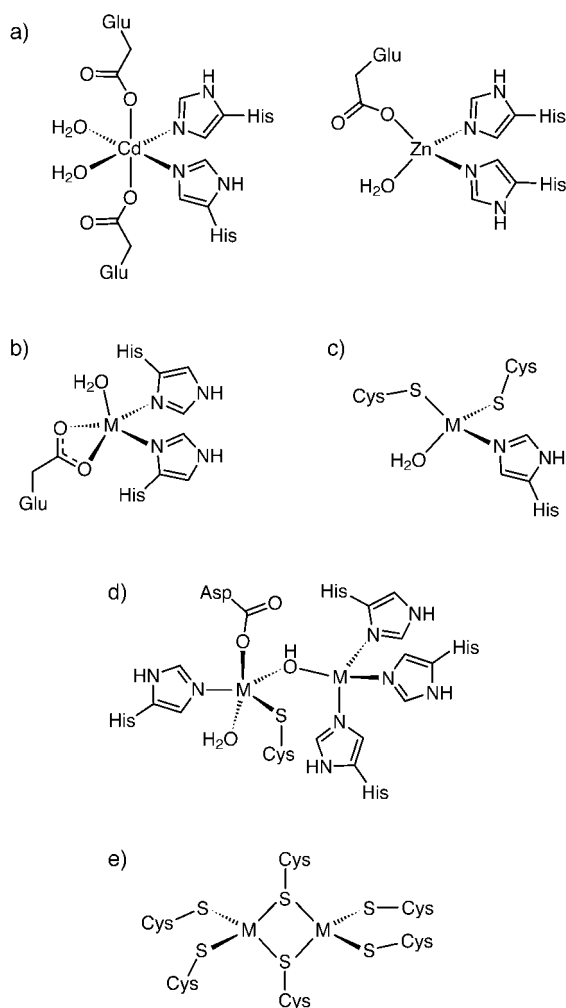
deutlich größere  $\text{Cd}^{2+}$ -Ion bevorzugt höhere Koordinationszahlen und ist die schwächere Lewis-Säure. Im Extremfall des Thermolysins liegt bei der Cd-Form sechsfache Koordination vor  $[\text{Cd}(\text{N} \cdot \text{His})_2(\text{O}_2\text{C} \cdot \text{Glu})_2(\text{OH}_2)_2]$  und bei der Zn-Form vier- oder fünffache  $[\text{Zn}(\text{N} \cdot \text{His})_2(\text{O}_2\text{C} \cdot \text{Glu})(\text{OH}_2)]$  (Schema 1 a).<sup>[5]</sup> Dieser Unterschied ist offenbar dafür verantwortlich, dass Cd-substituiertes Thermolysin enzymatisch vollständig inaktiv ist.

Bei anderen Zinkenzymen wie der Carboxypeptidase A,<sup>[6]</sup> der Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber<sup>[7]</sup> und der Metallo- $\beta$ -Lactamase<sup>[8]</sup> bleiben die Metallumgebungen in den Cd-Formen erhalten (Schema 1 b–d). Gleichwohl sind auch hier die Enzymaktivitäten deutlich verringert, vermutlich weil das weniger Lewis-saure  $\text{Cd}^{2+}$  weniger polarisierend auf seine Umgebung wirkt. Unter anderem sind deshalb koordinierte Substrate schwächer aktiviert und die  $\text{pK}_a$ -Werte koordinierter Wassermoleküle nicht so stark herabgesetzt.

Bemerkenswert ist auch die Beobachtung, dass in genregulierenden Proteinen Cadmiumionen die strukturstabilisierenden Zinkionen ersetzen können, ohne drastische Veränderungen zu induzieren. So bleibt z. B. im Transkriptionsfaktor GAL4 das zweikernige Metallzentrum bestehen (Schema 1 e).<sup>[9]</sup> Da genregulierende Proteine direkt mit der

[\*] Prof. Dr. H. Strasdeit

Fachbereich Chemie der Universität  
Carl-von-Ossietzky-Straße 9–11, 26129 Oldenburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 441-798-3329  
E-mail: henry.strasdeit@uni-oldenburg.de

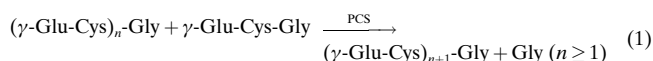


Schema 1. Schematische Darstellung der Metallkoordinationen in cadmiumsubstituierten Zinkproteinen und in den entsprechenden nativen Formen (M = Cd, Zn). a) Katalytisches Zentrum im Thermolysin; in der Zn-Form kann die Carboxylatgruppe – vermutlich pH-abhängig – auch  $\eta^2$ -koordiniert vorliegen. b) Carboxypeptidase A. c) Katalytisches Zentrum der Alkohol-Dehydrogenase. d) Metallo- $\beta$ -Lactamase. e) GAL4.

DNA wechselwirken, ist ein ursächlicher Zusammenhang mit der Kanzerogenität des Cadmiums denkbar.<sup>[10]</sup>

#### Phytochelatine-Synthase, ein cadmiumaktiviertes Enzym

Phytochelatine sind kurze Peptide der Zusammensetzung  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  ( $n = 2-11$ ), die in Pflanzen unter anderem der Cadmiumentgiftung dienen. Ihre Biosynthese erfolgt aus dem Tripeptid Glutathion ( $\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$ ) durch das Enzym  $\gamma$ -Glutamylcystein-Dipeptidyl-Transpeptidase [Phytochelatine-Synthase, PCS; Gl. (1)].



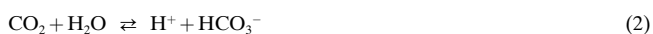
Interessanterweise liegen die PCS-Moleküle zunächst inaktiv vor und werden erst durch Cadmiumionen, die in die Pflanzenzelle eingedrungen sind, aktiviert.<sup>[11]</sup> Die daraufhin synthetisierten Phytochelatine bilden stabile  $\text{Cd}^{2+}$ -Komplexe,<sup>[12]</sup> sodass nach einiger Zeit die Enzymreaktion durch Cadmiummangel wieder zum Erliegen kommt. Die PCS ist

also selbstregulierend. Der molekulare Mechanismus der Aktivierung ist noch unklar; es erscheint fraglich, ob das Cadmium im katalytischen Zentrum des Enzyms lokalisiert ist, denn  $\text{Cd}^{2+}$  ist zwar der effektivste Aktivator, aber auch verschiedene andere Metallionen können die PCS zum Teil in beträchtlichem Maße aktivieren.<sup>[11, 13]</sup>

#### Cadmium-Carboanhydrase, das erste Cadmiumenzym

Ausgangspunkt für die Entdeckung der Cadmium-Carboanhydrase war die Beobachtung, dass die Konzentration von Cadmium im Meerwasser derjenigen von Nährstoffen, z.B. Phosphat, folgt. Das heißt, häufig sind oberflächennahe Wasserschichten an gelöstem Cadmium stark verarmt, offenbar deshalb, weil es durch das Phytoplankton aufgenommen wird. Ganz analog verhält sich das Zink, dessen Verfügbarkeit deshalb für viele marine Mikroorganismen ein wachstumslimitierender Faktor ist. Die Vermutung lag nahe, dass diese Organismen Cadmium möglicherweise als Ersatz für Zink nutzen. Tatsächlich konnten Price und Morel an künstlich zinklimitierten Zellkulturen der marinen Kieselalge *Thalassiosira weissflogii* zeigen, dass sich durch  $\text{Cd}^{2+}$ -Zusatz die drastischen Wachstumsbeschränkungen, die der Zinkmangel verursacht, weitgehend aufheben lassen.<sup>[14]</sup> Wenn dagegen genügend Zink zur Verfügung steht, wirkt das Cadmium nicht wachstumsfördernd.

Schon bald wurde ein Zusammenhang zwischen diesen Beobachtungen und der Carboanhydrase-Aktivität gefunden.<sup>[15]</sup> Die zinkhaltigen Carboanhydrasen katalysieren äußerst effizient die Hydratation von  $\text{CO}_2$  [Gl. (2)]. Sie spielen unter anderem eine Schlüsselrolle bei der photosynthetischen  $\text{CO}_2$ -Fixierung in vielen photoautotrophen Pflanzen.<sup>[16]</sup> Cadmiumsubstituierte Zink-Carboanhydrasen können signifikante enzymatische Aktivität aufweisen, wenn auch nur im alkalischen pH-Bereich. Somit erschien es plausibel, den positiven Effekt des Cadmiums in *T. weissflogii* zumindest teilweise auf den Ersatz des Metalls in der dortigen Zink-Carboanhydrase (TWCA1) zurückzuführen. Aufgrund neuerer Erkenntnisse wurde diese Hypothese jedoch verworfen. Stattdessen kamen Lane und Morel zu dem überraschenden Befund, dass *T. weissflogii* unter Zinkmangelbedingungen eine spezielle Cadmium-Carboanhydrase (Cd-CA) synthetisieren kann.<sup>[2]</sup> Damit wurde erstmals eine definierte biologische Funktion für das Cadmium gefunden. Da Zinkmangel in dem natürlichen Lebensraum von *T. weissflogii* generell auftritt (siehe oben), muss Cadmium für diesen Organismus als essentielles Element angesehen werden.



Bei der Cd-CA handelt es sich definitiv nicht um cadmiumsubstituierte TWCA1. Die Autoren konnten dafür verschiedene Beweise anführen, unter anderem die unterschiedlichen Molekülmassen (Cd-CA: 43 kDa, TWCA1: 27 kDa). Die Funktion von  $\text{Cd}^{2+}$  als Bestandteil des katalytischen Zentrums der Cd-CA wird wegen der Analogie zu den Zink-Carboanhydrasen kaum bezweifelt. Sobald genügend Proteinmaterial verfügbar ist, soll mit der umfassenden Charakterisierung begonnen werden. Besonders gespannt

sein kann man auf die dreidimensionale Struktur und hier speziell auf die Koordination des Cadmiums. Bezüglich der Metallkoordination sorgten kürzlich sogar Zink-Carboanhydrasen noch für Überraschungen: Statt des „klassischen“  $\{\text{Zn}(\text{N} \cdot \text{His})_3(\text{OH}_2)\}$ -Zentrums der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Carboanhydrasen wurden in pflanzlichen  $\beta$ -Carboanhydrasen nämlich  $\{\text{Zn}(\text{N} \cdot \text{His})(\text{S} \cdot \text{Cys})_2\text{L}\}$ -Zentren ( $\text{L} = \text{OH}_2$  oder  $\text{O}_2\text{C} \cdot \text{Asp}$ ) entdeckt.<sup>[17]</sup> Im Vergleich zur Cadmium-Carboanhydrase, deren Untersuchung gerade erst begonnen hat, ist man bei der Charakterisierung der Phytochelat-Synthase bereits einen Schritt weiter. Drei Arbeitsgruppen berichteten praktisch zeitgleich über die erstmalige Identifizierung von PCS-Genen und die zugehörigen Aminosäuresequenzen.<sup>[18]</sup> Das Ziel, den Mechanismus der Aktivierung durch  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen aufzuklären, ist damit ein gutes Stück näher gerückt. Durch die neue Rolle des Cadmiums als Bioelement sind nicht zuletzt die Koordinationschemiker gefordert, mit Modelluntersuchungen zum Verständnis der katalytischen und strukturgebenden Eigenschaften von  $\text{Cd}^{2+}$ -Ionen in Enzymen beizutragen.

- 
- [1] H.-U. Meisch, A.-R. Scholl, J. A. Schmitt, *Z. Naturforsch. C* **1981**, 36, 765–771.
- [2] T. W. Lane, F. M. M. Morel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 4627–4631.
- [3] H. Strasdeit, A. von Döllen, W. Saak, M. Wilhelm, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 803–805; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 784–786.
- [4] J. E. Coleman, B. L. Vallee, *J. Biol. Chem.* **1961**, 236, 2244–2249.
- [5] D. R. Holland, A. C. Hausrath, D. Juers, B. W. Matthews, *Protein Sci.* **1995**, 4, 1955–1965.
- [6] D. C. Rees, J. B. Howard, P. Chakrabarti, T. Yeates, B. T. Hsu, K. D. Hardman, W. N. Lipscomb in *Zinc Enzymes* (Hrsg.: I. Bertini, C. Luchinat, W. Maret, M. Zeppezauer), Birkhäuser, Boston, **1986**, S. 155–166.
- [7] G. Schneider, E. Cedergren-Zeppezauer, S. Knight, H. Eklund, M. Zeppezauer, *Biochemistry* **1985**, 24, 7503–7510.
- [8] N. O. Concha, B. A. Rasmussen, K. Bush, O. Herzberg, *Protein Sci.* **1997**, 6, 2671–2676.
- [9] K. H. Gardner, T. Pan, S. Narula, E. Rivera, J. E. Coleman, *Biochemistry* **1991**, 30, 11292–11302.
- [10] F. W. Sunderman, Jr., *Toxicol. Environ. Chem.* **1990**, 27, 131–141.
- [11] E. Grill, S. Löffler, E.-L. Winnacker, M. H. Zenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 6838–6842.
- [12] J. Johanning, H. Strasdeit, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2642–2644; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2464–2466.
- [13] J. Chen, J. Zhou, P. B. Goldsbrough, *Physiol. Plant.* **1997**, 101, 165–172.
- [14] N. M. Price, F. M. M. Morel, *Nature* **1990**, 344, 658–660.
- [15] F. M. M. Morel, J. R. Reinfelder, S. B. Roberts, C. P. Chamberlain, J. G. Lee, D. Yee, *Nature* **1994**, 369, 740–742.
- [16] M. R. Badger, G. D. Price, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1994**, 45, 369–392.
- [17] a) M. S. Kimber, E. F. Pai, *EMBO J.* **2000**, 19, 1407–1418; b) S. Mitsuhashi, T. Mizushima, E. Yamashita, M. Yamamoto, T. Kumasa-ka, H. Moriyama, T. Ueki, S. Miyachi, T. Tsukihara, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 5521–5526.
- [18] a) S.-B. Ha, A. P. Smith, R. Howden, W. M. Dietrich, S. Bugg, M. J. O’Connell, P. B. Goldsbrough, C. S. Cobbett, *Plant Cell* **1999**, 11, 1153–1163; b) O. K. Vatamaniuk, S. Mari, Y.-P. Lu, P. A. Rea, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 7110–7115; c) S. Clemens, E. J. Kim, D. Neumann, J. I. Schroeder, *EMBO J.* **1999**, 18, 3325–3333.
-