

# Aktivierung von Disauerstoff und Hydroxylierung von Methan durch lösliche Methan-Monooxygenase: eine Geschichte von zwei Eisenatomen und drei Proteinen\*\*

Maarten Merkx, Daniel A. Kopp, Matthew H. Sazinsky, Jessica L. Blazyk, Jens Müller und Stephen J. Lippard\*

Methanotrophe Bakterien nutzen Methan als ausschließliche Quelle von Kohlenstoff und Energie. Der erste Schritt des Methan-Metabolismus, die Oxidation von Methan zu Methanol, wird von einem faszinierenden Enzymsystem namens Methan-Monooxygenase (MMO) katalysiert. Die selektive Oxidation der äußerst stabilen C-H-Bindung von Methan bei Raumtemperatur ist eine Meisterleistung, die bisher mit synthetischen Katalysatoren nicht reproduziert werden konnte und die ein beträchtliches wissenschaftliches wie kommerzielles Interesse geweckt hat. Bei der am besten untersuchten MMO handelt es sich um

ein komplexes Enzymsystem aus drei löslichen Proteinkomponenten, die alle für die effiziente Katalyse erforderlich sind: Eine Hydroxylase mit einer Nichthäm-Dieisen-Einheit katalysiert die Aktivierung von Disauerstoff und die nachfolgende Hydroxylierung von Methan; eine Reduktase erhält Elektronen von NADH und überträgt sie auf die Hydroxylase, von der sie zur reduktiven Aktivierung von Disauerstoff verwendet werden; die dritte Proteinkomponente verknüpft den Elektronen- und Sauerstoffverbrauch mit der Oxidation von Methan. In dieser Übersicht diskutieren wir einige Aspekte der Katalyse durch die MMO-

Proteine und behandeln dabei detailliert Studien zum Mechanismus der Aktivierung von Disauerstoff an der Dieisen-Einheit sowie zur Substrathydroxylierung durch die aktivierte Sauerstoffspezies. Ferner befassen wir uns mit der Rolle, die die Bildung von Komplexen zwischen den Proteinkomponenten bei der Regulierung diverser Aspekte der Katalyse spielt.

**Stichwörter:** Bioanorganische Chemie  
• C-H-Aktivierung • O-O-Aktivierung • Oxidoreduktasen • Oxygenierungen

## 1. Einleitung

Methan-Monooxygenasen (MMOs) katalysieren die selektive Oxidation von Methan zu Methanol [Gl. (1)].<sup>[1-6]</sup> Diese



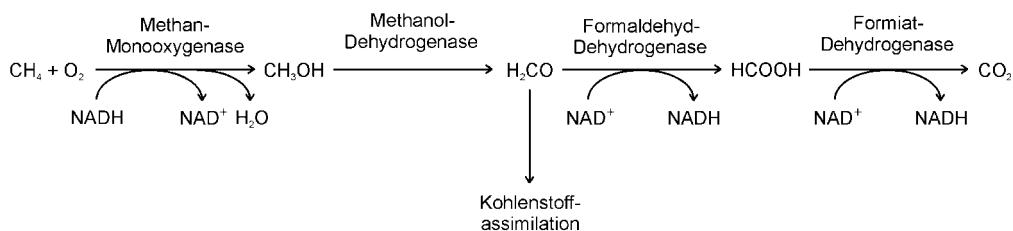
Reaktion ist der essentielle erste Schritt in einem Metabolismus, in dem methanotrophe Bakterien Methan als ihre

einige Quelle von Kohlenstoff und Energie verwenden (Schema 1).<sup>[7]</sup> Methanotrophe Bakterien leben an der Grenze zwischen aerober und anaerober Umgebung, an der sowohl Methan als auch Disauerstoff vorkommt. Das Methan wird dabei von methanogenen Bakterien produziert, die in unterschiedlichen anaeroben Umgebungen wie Ozeanen, Seen oder Sumpfland  $\text{CO}_2$  zu  $\text{CH}_4$  reduzieren.<sup>[8]</sup> Methanotrophe Bakterien spielen eine wesentliche Rolle im globalen Kohlenstoff-Kreislauf, indem sie die Menge des in die Atmosphäre freigesetzten Methans, eines weitaus wirksameren Treibhausgases als Kohlendioxid, begrenzen.<sup>[9]</sup>

Fast alle methanotrophen Bakterien exprimieren eine membrangebundene, unlösliche Form von MMO (pMMO).<sup>[10, 11]</sup> Dieses 94 kDa schwere Enzym enthält etwa 12–15 Kupferatome, verteilt auf zwei Cluster. Von einem wird vermutet, dass er das aktive Zentrum für die Hydroxylierung von Methan bildet, vom anderen, dass er als Elektronenüberträger fungiert.<sup>[12-16]</sup> Eine detaillierte Charakterisierung von pMMO wurde durch die Instabilität des Enzyms

[\*] Prof. Dr. S. J. Lippard, Dr. M. Merkx, D. A. Kopp, M. H. Sazinsky, J. L. Blazyk, Dr. J. Müller  
Department of Chemistry  
Massachusetts Institute of Technology  
77 Massachusetts Avenue 18-590  
Cambridge, MA 02139 (USA)  
Fax: (+1) 617-258-8150  
E-mail: lippard@lippard.mit.edu

[\*\*] Wichtige verwendete Abkürzungen sind in Abschnitt 7 zusammengefasst.



Schema 1. Der oxidative Abbau von Methan in *Methylococcus capsulatus* (Bath).

und Schwierigkeiten bei der Aufreinigung erschwert. Einige methanotrophe Bakterien sind bei geringer Kupferverfügbar-

keit außerdem in der Lage, eine zweite, lösliche Form von MMO (sMMO) zu exprimieren. sMMOs sind stabiler und einfacher aufzureinigen und haben daher beträchtliche Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Ihr aktives Zentrum enthält ein Nichthäm-Dieisen-Zentrum und kann, im Gegensatz zu pMMO, mit einer großen Auswahl an Substraten neben Methan reagieren, z.B. mit gesättigten und ungesättigten,

**Maarten Merkx** (Drs in Chemie 1995, Universität Nijmegen, Niederlande; Ph.D. in Chemie 1999, Universität Amsterdam, Niederlande) führte in seiner Doktorarbeit bei Professor Bruce A. Averill Untersuchungen zur mechanistischen Rolle des Dieisen-Zentrums in Violetter Saurer Phosphatase durch. Zurzeit arbeitet er als vom Human Frontier Science Program unterstützter Postdoktorand in Professor Lippards Gruppe am Mechanismus der Methan-Monoxygenase. Sein Forschungsinteresse ist die Katalyse durch Metalloenzyme.

**Daniel A. Kopp** erhielt seinen BSc in Chemie und Biologie 1997 vom College of William and Mary in Williamsburg, Virginia. Er untersuchte dort unter der Anleitung von Professor Kathleen M. Morgan den Einfluss des Lösungsmittels auf Konformationsgleichgewichte kleiner Amide. Zu seinen bevorzugten Freizeitaktivitäten zählen Wandern, Gitarrespielen und die gemeinsame Zeit mit seiner Frau Karen.

**Matthew H. Sazinsky** erhielt seinen BSc in Chemie 1999 vom Haverford College in Haverford, Pennsylvania. Er untersuchte dort unter der Anleitung von Professor Robert C. Scarro und Dr. Eileen K. Jaffe (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Pennsylvania) die funktionelle Rolle von Zink in der Porphobilinogen-Synthase. Zurzeit beschäftigt er sich mit den Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten von sMMO. Er interessiert sich vor allem für die Strukturbioologie und die Metalloenzymologie.

**Jessica L. Blazyk** erhielt ihren BSc in Chemie 1996 vom Honors Tutorial College an der Ohio University (Athens, Ohio). Während ihres Studiums führte sie bei Professor James E. Penner-Hahn an der University of Michigan in Ann Arbor, Michigan, Untersuchungen zum Mechanismus der Katalyse durch die Mangan-Katalase durch. Derzeit untersucht sie in Professor Lippards Gruppe, unterstützt durch ein Promotionsstipendium des Howard Hughes Medical Institute, Elektronentransferreaktionen im sMMO-System.

**Jens Müller** hat Chemie an der Universität Dortmund und am University College London studiert. Er promovierte 1999 bei Professor Bernhard Lippert mit Studien über Platin-stabilisierte, parallele DNA und über die Stabilisierung seltener Tautomere von Nucleobasen. Zurzeit arbeitet er in den Gruppen von Professor Lippard (MIT) und Professor Gerhard Wagner (Harvard Medical School) als Feodor-Lynen-Stipendiat. Zu seinen aktuellen Forschungsinteressen gehört die Aufklärung der Strukturen von Proteinen in Lösung.

**Stephen J. Lippard** hat die Arthur-Amos-Noyes-Professur für Chemie am Massachusetts Institute of Technology inne und ist dort Vorsitzender der chemischen Fakultät (Head of the Chemistry Department). Als Mitglied der National Academy of Sciences, des National Institute of Medicine und der American Academy of Arts and Sciences umfasst sein Forschungsinteresse die Bereiche der Anorganischen und Biologischen Chemie. Die Erforschung des Mechanismus der Methanoxidation durch die lösliche Methan-Monoxygenase ist schon seit mehr als einem Jahrzehnt eine seiner wissenschaftlichen Leidenschaften.

M. Merkx

S. J. Lippard

J. Müller



D. A. Kopp

J. L. Blazyk

M. H. Sazinsky

unverzweigten, verzweigten und cyclischen Kohlenwasserstoffen bis zu C<sub>8</sub> sowie mit aromatischen, heterocyclischen und chlorierten Verbindungen.<sup>[9, 17–22]</sup> Aufgrund dieses breiten Spektrums an oxidierbaren Substraten können methanotrophe Bakterien bei der biologischen Altlastensanierung eingesetzt werden, etwa beim Abbau von Erdölprodukten auf bei Tankerunglücken kontaminierten Stränden.<sup>[23]</sup> Die für alle MMOs charakteristische Reaktion, die effiziente Umwandlung von Methan in Methanol, ist ebenfalls von kommerziellem Interesse. Methanol als flüssiges Erdgasderivat wäre ökonomischer zu transportieren, was ein wichtiger Gesichtspunkt bei der Erschließung von Erdgasfeldern in abgelegenen Regionen ist. Während eine erfolgreiche Anwendung von MMO im industriellen Maßstab zweifelhaft ist, könnten durch enzymologische Studien gesammelte chemische Einblicke die Entwicklung besserer synthetischer Katalysatoren vorantreiben.

Lösliche MMO ist ein Dreikomponentensystem mit einiger Komplexität (Abbildung 1).<sup>[24–27]</sup> Die sMMOs aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) und *Methylosinus trichosporium* OB3b sind ausführlichst untersucht worden, und zwei ihrer

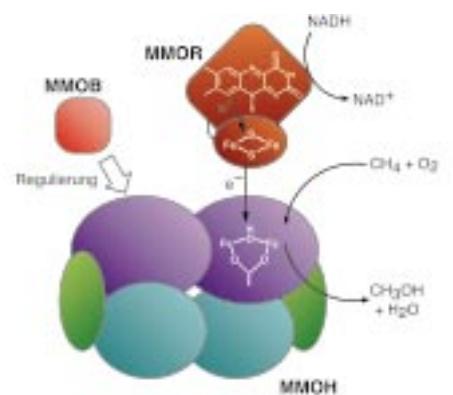


Abbildung 1. Schematische Darstellung der drei Proteinkomponenten von löslicher MMO und ihrer katalytischen Rollen. Nur eines der zwei Nichthäm-Dieisen-Zentren des MMOH-Heterodimers ist gezeigt.

drei Komponenten sind strukturell charakterisiert.<sup>[28–33]</sup> Die Oxidation von Methan durch Disauerstoff findet an einem carboxylatverbrückten Dieisen-Zentrum in der  $\alpha$ -Untereinheit der Hydroxylase MMOH statt, einem 251 kDa schweren  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Heterodimer. Die Elektronen für diese Reaktion werden von einer Reduktase, MMOR, zur Verfügung gestellt, die NADH oxidiert und die Elektronen an MMOH weiterleitet. Eine effiziente Katalyse erfordert die Anwesenheit eines dritten Proteins, MMOB, das an mehreren Stellen als Regulator fungiert.

Ein wichtiger Grund für das wissenschaftliche Interesse an sMMOs ist deren einzigartige Fähigkeit, die sehr stabile C-H-Bindung von Methan zu oxidieren. Diese Meisterleistung unterscheidet sMMOs von anderen Monooxygenasen wie Cytochrom P450.<sup>[34]</sup> Cytochrom P450 und sMMOs repräsentieren zwei unterschiedliche Lösungen für das Problem der Aktivierung von Disauerstoff zur Kohlenwasserstoff-Oxidation.<sup>[35]</sup> Cytochrom-P450-Enzyme aktivieren Disauerstoff an einer durch Cystein koordinierten Eisen-Porphyrin-Einheit,

wohingegen sMMOs und verwandte Mehrkomponenten-Monooxygenasen Nichthäm-Dieisen-Zentren verwenden. Ähnliche carboxylatverbrückte, zweikernige Eisencluster kommen auch in anderen Proteinen vor und haben dort eine große Bandbreite an Funktionen. Beispiele sind das reversible Binden von Disauerstoff an Hämerythrin, die Bildung eines stabilen Radikals in Klasse-I-Ribonucleotid-Reduktase, die Dehydrierung von Fettsäureketten durch Stearyl-ACP- $\Delta^9$ -Desaturase, die Oxidation und Speicherung von Eisen in Ferritin und möglicherweise auch das Erkennen von Disauerstoff im bakteriellen Chemotaxis-Protein DcrH.<sup>[3, 36–40]</sup> Die Vielfalt an chemischer Reaktivität von Nichthäm-Dieisen-Zentren konkurriert mit der von Häm-Gruppen, und häufig haben beide ähnliche Funktionen in Metalloproteinen.<sup>[35]</sup> Das Verständnis der Faktoren, die für die Feinabstimmung dieser Eisenzentren entsprechend ihrer jeweiligen Funktion verantwortlich sind, ist von fundamentaler Wichtigkeit.<sup>[41]</sup>

Ein weiterer Aspekt der sMMO-Katalyse, der viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen hat, ist der Mechanismus, mit dem die Katalyse reguliert wird. Die Aktivierung von sehr reaktionsträgen C-H-Bindungen verlangt nach einer hochaktivierten Sauerstoffzwischenstufe, wozu ein genaues Zusammenspiel der Zufuhr von Elektronen, Protonen und Substrat nötig ist. Eine von Mehrkomponenten-Enzymsystemen wie sMMOs häufig angewendete Methode zur Regulierung ist die physikalische Trennung der Stelle des Elektroneneintritts von dem Ort, an dem der molekulare Sauerstoff reduktiv aktiviert wird. Darüber hinaus wurden weitere, subtilere Arten der Regulierung identifiziert.

Lösliche MMO ist somit ein wunderbares System, um die Grundlagen der Aktivierung von Disauerstoff und der Hydroxylierung von Methan an einem Dieisen-Zentrum, ebenso wie die von einer Mehrkomponenten-Oxygenase verwendeten regulatorischen Mechanismen, inklusive dem Elektronentransfer über weite Strecken, zu studieren. Beide Aspekte der MMO-Katalyse werden hier diskutiert. In Abschnitt 2 besprechen wir die drei sMMO-Komponenten mit dem Schwerpunkt auf ihren Strukturen. Abschnitt 3 präsentiert durch zeitlich aufgelöste spektroskopische Untersuchungen erhaltene Schlüsselinformationen über die Natur mehrerer katalytischer Zwischenstufen, sowohl für die reduktive Aktivierung von Disauerstoff als auch für den Elektronentransfer von NADH über MMOR zu MMOH. Der Mechanismus der Substrathydroxylierung wurde sowohl mittels molekularer Reportermoleküle als auch durch Berechnungen auf der Basis der Dichtefunktionaltheorie (DFT) untersucht (Abschnitt 4). Abschnitt 5 widmet sich der Rolle der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten bei der Regulierung verschiedener Aspekte der Katalyse. Wie wir sehen werden, ist die biologische Oxidation von Methan weitgehend eine Geschichte von zwei Eisenatomen und drei Proteinen.

## 2. Die Proteinkomponenten von löslicher Methan-Monooxygenase

Die drei Proteinkomponenten MMOH, MMOR und MMOB, aus denen sich das lösliche MMO-Enzymsystem

zusammensetzt, sind mit einer breiten Auswahl an kinetischen, spektroskopischen und Strukturtechniken charakterisiert worden. Bevor wir die Strukturen dieser Komponenten im Detail besprechen, sollen jedoch zunächst einige allgemeine Eigenschaften von sMMO und verwandten Mehrkomponenten-Oxygenasen diskutiert werden.

Die Hydroxylase MMOH ist ein 251 kDa schweres Dimer aus drei Untereinheiten in einer  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Konfiguration ( $\alpha$ : 60.6 kDa;  $\beta$ : 45.0 kDa;  $\gamma$ : 19.8 kDa).<sup>[24, 26]</sup> Jede  $\alpha$ -Untereinheit enthält ein carboxylat- und hydroxoverbrücktes Dieisen-Zentrum, an dem die Aktivierung von Disauerstoff und die Hydroxylierung von Methan stattfinden. Bei MMOR handelt es sich um ein 38.5 kDa schweres Eisen-Schwefel-Flavoprotein, das Elektronen von NADH durch seine Flavinadenindinucleotid(FAD)- und [2Fe-2S]-Cofaktoren zum aktiven Zentrum der Hydroxylase transportiert.<sup>[27, 42, 43]</sup> MMOB (15.9 kDa) enthält keine prosthetischen Gruppen und moduliert die Reaktivität von MMO durch die Bildung spezifischer Komplexe mit der Hydroxylase, die indirekt Struktur und Reaktivität des Dieisen-Zentrums beeinflussen.<sup>[24, 27, 44–50]</sup> In *M. trichosporium* OB3b machen MMOH, MMOB und MMOR 12, 0.5 bzw. 0.1–0.3 Gew.-% der löslichen Proteine im bei niedriger Kupferkonzentration hergestellten zellfreien Extrakt aus. Die molaren Konzentrationen von MMOH und MMOB in der Zelle sind damit etwa gleich groß, wohingegen die der Reduktase nur rund 10% derjenigen der anderen Komponenten beträgt.<sup>[24]</sup> Ähnliche Ergebnisse sind für lösliche Zellextrakte von *Methylocystis* sp. Stamm WI 14 berichtet worden.<sup>[51]</sup>

Die für die sMMO-Proteine aus *M. capsulatus* (Bath),<sup>[52–54]</sup> *M. trichosporium* OB3b,<sup>[30, 55, 56]</sup> *Methylocystis* sp. Stamm M,<sup>[57]</sup> *Methylocystis* sp. Stamm WI 14<sup>[51]</sup> und *Methyloimonas* sp. Stämme KSPIII und KSWIII kodierenden Gene sind identifiziert und sequenziert worden.<sup>[58]</sup> Diese Gene befinden sich auf einem 5.5 kb langen Operon, das aus *mmoX*, *mmoY*, *mmoB*, *mmoZ*, *orfY* und *mmoC* besteht, die für MMOH $\alpha$ , MMOH $\beta$ , MMOB, MMOH $\gamma$ , ein Protein mit noch unbekannter Funktion (OrfY, 12 kDa) bzw. MMOR kodieren (Abbildung 2). Die Expression in *M. capsulatus* (Bath) wird von einem einzelnen  $\sigma^{70}$ -abhängigen, kupferregulierten Promotor oberhalb des *mmoX*-Gens gesteuert, sodass im nativen Organismus das sMMO-System nur bei

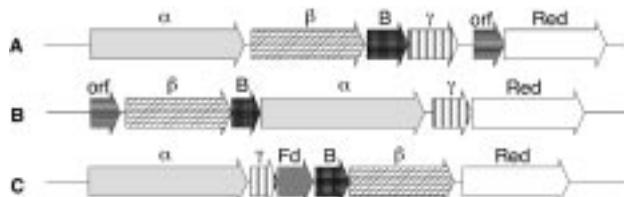


Abbildung 2. Organisation des sMMO-Operons (A) und von Operonen verwandter Mehrkomponenten-Monoxygenasen (B, C). Der Aufbau B kommt bei Phenol-Hydroxylase und Benzol/Toluol-2-Monoxygenase vor, der Aufbau C bei Toluol-3-Monoxygenase, Toluol-4-Monoxygenase und *Xanthobacter*-Alkan-Monoxygenase. Die Kürzel bedeuten Folgendes:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ : Untereinheiten der Hydroxylase (oder Epoxidase); B: regulatorisches Protein; Red: Reduktase; Fd: Ferredoxin; orf: offenes Leseraster (open reading frame, DmpK-Protein in Phenol-Hydroxylase). Genehmigter Nachdruck aus Lit. [54].

geringer Kupferkonzentration produziert wird.<sup>[59]</sup> Die Transkription der sMMO-Gene in *M. trichosporium* OB3b wird von einem  $\sigma^{54}$ -ähnlichen Promotor oberhalb von *mmoX* und einem  $\sigma^{70}$ -ähnlichen Promotor in der intercistronischen Region zwischen *mmoX* und *mmoY* gesteuert.<sup>[59, 60]</sup>

Die Aminosäuresequenzen dieser sechs sMMO-Proteine sind folgendermaßen universell konserviert: MMOH $\alpha$  73.6%, MMOH $\beta$  46.8%, MMOB 55.6%, MMOH $\gamma$  35.7%, OrfY 19.4% und MMOR 37.4%. Die Funktion von OrfY ist bisher unklar; das Protein ist aus keinem der nativen Organismen isoliert worden und weist keine signifikante Homologie mit anderen bekannten Proteinen auf.<sup>[54, 61]</sup> Obwohl insgesamt die prozentuale Identität der vermutlichen *orfY*-Produkte relativ gering ist (19.4%), gibt es eine zentrale Region mit einer signifikant größeren Anzahl konservierter Aminosäuren (44.4%). Erst kürzlich haben wir OrfY aus *M. capsulatus* (Bath) in *E. coli* exprimiert. Entgegen einem früheren Bericht<sup>[11]</sup> hat eine Western-Blot-Analyse des löslichen Zellextrakts aus *M. capsulatus* (Bath) mit einem Antikörper auf OrfY eindeutig die Anwesenheit des OrfY-Proteins ergeben, wenn auch in viel geringerer Konzentration als MMOH (1–2%). Rekombinantes OrfY inhibiert die MMO-katalysierte Epoxidierung von Propen, vermutlich durch direkte Anlagerung an MMOH.<sup>[62]</sup> Diese Ergebnisse weisen eindeutig auf eine funktionelle Rolle von OrfY im sMMO-System hin. Eine Möglichkeit wäre, dass das Protein am Aufbau der Dieisen-Zentren der Hydroxylase beteiligt ist. Eine solche Funktion wurde einem Protein ähnlicher Größe, aber ohne offensichtliche Sequenzhomologie, DmpK, in der verwandten Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. CF600 zugeordnet.<sup>[63]</sup> Trotz unserer neuen Belege für eine vierte Komponente ist der Titel unseres Beitrags weiterhin angebracht, da wir derzeit keinen Grund zu der Annahme haben, dass OrfY in der sMMO-Katalyse eine Rolle spielt.

Mehrere Monoxygenasen, darunter Benzol/Toluol-2-Monoxygenase,<sup>[64]</sup> Toluol-3-Monoxygenase,<sup>[65, 66]</sup> Toluol-4-Monoxygenase,<sup>[67–70]</sup> Phenol-Hydroxylase<sup>[71–74]</sup> und Alkan-Monoxygenase,<sup>[75–80]</sup> sind sMMO sehr ähnlich. All diese Proteinsysteme enthalten eine Hydroxylase aus zwei oder drei Untereinheiten mit einem carboxylatverbrückten Nichthäm-Dieisen-Zentrum, eine Reduktase und ein Regulierungsprotein. Ferner ist immer Disauerstoff das Oxidationsmittel in den von ihnen katalysierten Hydroxylierungen oder Epoxidierungen. Ein Sequenzvergleich demonstriert, dass in diesem Satz von Proteinen viele Aminosäurereste hochkonserviert sind, insbesondere am aktiven Dieisen-Zentrum der  $\alpha$ -Untereinheit der Hydroxylase.<sup>[54, 66, 68, 80–82]</sup> Bei sMMO handelt es sich um das bisher am besten untersuchte Mitglied dieser Oxygenasen.

Für MMOB sowie kürzlich auch für MMOR sind sehr effiziente rekombinante Expressionssysteme in *E. coli* entwickelt worden.<sup>[31, 54, 61, 83, 84]</sup> Die Möglichkeit, MMOR in hohen Ausbeuten zu exprimieren, ist insbesondere für Strukturuntersuchungen wichtig, weil aus dem nativen Organismus nur geringe Mengen dieses Proteins isoliert werden können. Die rekombinante Expression von MMOH erwies sich als größere Herausforderung. In *E. coli* exprimierte MMOH wird nicht richtig gefaltet, was zur Bildung von Einschluskörpern (inclusion bodies) führt.<sup>[11, 85]</sup> Plasmide mit den

MMOH-Genen von *M. trichosporium* OB3b liefern aktives Enzym, wenn sie in bestimmten Stämmen von *Pseudomonas* oder in nativen *M. trichosporium*-OB3b-Zellen, in denen die chromosomal Kopie des *mmoX*-Gens unterbrochen wurde, exprimiert werden.<sup>[86–89]</sup> Die Reinigung und Charakterisierung von rekombinanter MMOH und mutierten MMOH-Proteinen, die mit diesen Expressionssystemen erhalten wurden, wurde allerdings nicht beschrieben.

## 2.1. MMOH

Obwohl alle drei Bestandteile von sMMO für eine effiziente Katalyse benötigt werden, kann MMOH auch ohne die anderen Komponenten Disauerstoff aktivieren und verschiedene Kohlenwasserstoffe hydroxylieren, wenn es auf chemischem Weg zum Fe<sup>II</sup>-Zustand reduziert wird.<sup>[24, 50]</sup> Die Aktivierung von Disauerstoff und die Substrathydroxylierung finden daher am Dieisen-Zentrum in den  $\alpha$ -Untereinheiten von MMOH statt. Viel Arbeit wurde in die Charakterisierung der strukturellen Eigenschaften der Dieisen-Einheit in ihren verschiedenen Oxidationsstufen und in den kurzlebigen Zwischenstufen der Disauerstoff-Aktivierung gesteckt. Im Folgenden präsentieren wir zunächst die wichtigsten Einblicke in die Strukturen, die durch spektroskopische Studien erhalten wurden. Dieser Diskussion folgt eine Auswertung der Röntgenstrukturanalysen von MMOH in zahlreichen Kristallformen, Oxidationsstufen und in Form von Komplexen mit Substratalanoga und Produkten, die zusammen einen Einblick in die Dynamik des aktiven Zentrums von MMO geben.

### 2.1.1. Spektroskopische Charakterisierung von MMOH

Das Dieisen-Zentrum von MMOH wurde ausführlichst mit einer Vielzahl spektroskopischer Techniken charakterisiert, darunter EXAFS,<sup>[90–95]</sup> ESR-<sup>[44, 46, 47, 92, 96–100]</sup> ENDOR/ESEEM-<sup>[47, 99, 101–107]</sup> optische,<sup>[24, 92]</sup> MCD-<sup>[108–110]</sup> und Mößbauer-Techniken.<sup>[24, 47, 50, 92, 111]</sup> Über die spektroskopischen Eigenschaften von Nichthäm-Eiseneinheiten in Enzymen (inklusive derer von MMOH) ist erst kürzlich eine Übersicht erschienen.<sup>[39]</sup> Hier konzentrieren wir uns auf Studien mit hoher Relevanz für die Enzymkatalyse (Tabelle 1).

Die Dieisen-Einheit von MMOH kann in drei stabilen Oxidationsstufen existieren: Fe<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup> (MMOH<sub>ox</sub>), Fe<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup> (MMOH<sub>mv</sub>) und Fe<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup> (MMOH<sub>red</sub>). In MMOH<sub>ox</sub> sind die High-Spin-Fe<sup>III</sup>-Ionen antiferromagnetisch gekoppelt und bilden einen diamagnetischen Grundzustand, der kein ESR-Signal liefert.<sup>[92, 96, 111, 112]</sup> Anders als bei Hämerythrin, Ribonucleotid-Reduktase und Stearoyl-ACP- $\Delta^9$ -Desaturase, alleamt Proteine mit einer verbrückenden Oxogruppe in der Fe<sup>II</sup>-Oxidationsstufe,<sup>[39, 81, 113–116]</sup> wird der antiferromagnetische Spinaustausch bei MMOH<sub>ox</sub> durch eher schwach koppelnde Brückenliganden vermittelt. EXAFS-Studien an MMOH<sub>ox</sub> lieferten keinen Hinweis auf kurze (1.75–1.80 Å) Fe-O-Bindungen, wie sie für  $\{\text{Fe}_2(\mu\text{-O})\}^{4+}$ -Einheiten charakteristisch sind, und auch in den optischen Spektren fehlen die für oxoverbrückte Fe<sup>II</sup>-Komplexe typischen Absorptionen bei 350 und 500–600 nm.<sup>[24, 39, 91, 94]</sup> Eine Analyse von Ein-elektronen-reduzierten MMOH<sub>ox</sub>-Analoga, hergestellt durch Kryoreduktion von gefrorenen MMOH<sub>ox</sub>-Proben durch  $\gamma$ -Bestrahlung, hat die Charakterisierung von MMOH<sub>ox</sub>-Formen mit zusätzlich angelagerten kleinen Molekülen und Proteinkomponenten mittels ESR-Spektroskopie ermöglicht.<sup>[98, 100, 117, 118]</sup> Dabei zeigt sich, dass die Dieisen-Einheit

Tabelle 1. Spektroskopische Eigenschaften der MMO-Hydroxylase (H) in Gegenwart sowie bei Abwesenheit von MMOB (B).

Quelle <sup>[a]</sup>	ESR-g-Werte	ESR/ENDOR Hyperfeinkopplung	J [cm <sup>-1</sup> ] <sup>[l]</sup>	Mößbauer				Fe-Fe-Abstand	andere Abstände
				$\delta(\text{Fe1})$ [mm s <sup>-1</sup> ]	$\Delta E_{\text{O}}(\text{Fe1})$ [mm s <sup>-1</sup> ]	$\delta(\text{Fe2})$ [mm s <sup>-1</sup> ]	$\Delta E_{\text{O}}(\text{Fe2})$ [mm s <sup>-1</sup> ]		
H <sub>ox</sub>	MCB	1.94, 1.87, 1.72 1.82, 1.77, 1.68 <sup>[b,c]</sup>		0.51 0.72 <sup>[n,o]</sup>	1.12 1.46 <sup>[n,o]</sup>	0.50 0.47 <sup>[n,o]</sup>	0.79 1.33 <sup>[n,o]</sup>	3.42 Å <sup>[h]</sup>	1. O/N-Umgebung bei 2.06–2.09 Å
H <sub>ox</sub>	MTO	1.94, 1.86, 1.79 1.85, 1.75, 1.7 <sup>[b,d]</sup>	– 7 ± 3 <sup>[f]</sup>	0.51 <sup>[f]</sup>	1.16 <sup>[f]</sup>	0.50 <sup>[f]</sup>	0.87 <sup>[f]</sup>	60 % 3.01 Å 40 % 3.36 Å <sup>[q]</sup>	2 O/N bei 1.96 Å 3 O/N bei 2.09 Å
H <sub>ox</sub> + B	MCB	1.94, 1.86, 1.79 1.82, 1.77, 1.68 <sup>[b,c]</sup>						3.39 Å <sup>[r]</sup>	analog MMOH <sub>ox</sub>
H <sub>ox</sub> + B	MTO	1.97, 1.86, 1.75 1.90, 1.79, 1.59 <sup>[b,d]</sup>							analog MMOH <sub>ox</sub> <sup>[q]</sup>
H <sub>mv</sub>	MCB	1.94, 1.87, 1.72 <sup>[e]</sup>	14–30 MHz ( $\mu\text{-OH}$ ) 8 MHz (FeOH <sub>(2)</sub> ) <sup>[j]</sup>	– 32 <sup>[h]</sup>					3.42 Å <sup>[h,r,s]</sup>
H <sub>mv</sub>	MTO	1.94, 1.86, 1.75 <sup>[d,e,f]</sup>	13–23 MHz ( $\mu\text{-OH}$ ) 8 MHz (FeOH <sub>(2)</sub> ) <sup>[k]</sup>	– 30 <sup>[g]</sup>	0.48 <sup>[p,f]</sup>	– 1.3 <sup>[p,f]</sup>	1.19 <sup>[p,f]</sup>	2.4 <sup>[p,f]</sup>	
H <sub>mv</sub> + B	MCB	1.88, 1.77, 1.63 <sup>[c]</sup>							
H <sub>mv</sub> + B	MTO	1.86, 1.77, 1.62 <sup>[f,g]</sup>		– 5 <sup>[g]</sup>					
H <sub>red</sub>	MCB	15 <sup>[h]</sup>			1.3 <sup>[n,o]</sup>	2.8 <sup>[n,o]</sup>	1.3 <sup>[n,o]</sup>	2.8 <sup>[n,o]</sup>	keine Fe-Fe- Streuung <sup>[r,s]</sup>
H <sub>red</sub>	MTO	16 <sup>[e,f,g]</sup>		0.35 <sup>[m]</sup>	1.3 <sup>[f,n]</sup>	3.0 <sup>[f,n]</sup>	1.3 <sup>[f,n]</sup>	2.7 <sup>[f,n]</sup>	
H <sub>red</sub> + B	MTO	16 (schräfer als H <sub>red</sub> ) <sup>[g,h]</sup>							

[a] MCB: *Methylococcus capsulatus* (Bath); MTO: *Methylosinus trichosporium* OB3b. [b] ESR-Parameter für die kryogenen reduzierten MMOH<sub>ox</sub>-Verbindungen. [c] Lit. [100]. [d] Lit. [98]. [e] Lit. [111]. [f] Lit. [47]. [g] Lit. [44]. [h] Lit. [92]. [i] Lit. [46]. [j] Lit. [102]. [k] Lit. [103]. [l] Werte gemäß der Konvention  $H = -2JS_1S_2$ . [m] Lit. [97]. [n] Gemessen bei 4 K. [o] Lit. [50]. [p] Gemessen bei 150 K. [q] Lit. [94]. [r] Lit. [93]. [s] Lit. [91].

von  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$  durch Anlagerung von  $\text{MMOB}$  beeinflusst wird, nicht jedoch durch die von  $\text{MMOR}$ . Produktalkohole wie Methanol und Phenol binden an das Dimetall-Zentrum, wohingegen Glycerin und  $\text{DMSO}$ , ein Inhibitor, ausschließlich in Gegenwart von  $\text{MMOB}$  binden. Die Anlagerung von Phenol an  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$  konnte auch mit Resonanz-Raman-Spektroskopie beobachtet werden.<sup>[119]</sup>

Studien zur Struktur der gemischtvalenten Oxidationsstufe sind für den Katalysemechanismus nur begrenzt von Relevanz, weil  $\text{MMOH}_{\text{mv}}$  nicht mit Disauerstoff reagiert. Außerdem wird im ternären  $\text{MMOH}$ - $\text{MMOB}$ - $\text{MMOR}$ -Komplex ein Zweielektronentransfer auf  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$  bevorzugt.<sup>[2, 45, 96, 120]</sup> Eine antiferromagnetische Kopplung zwischen High-Spin- $\text{Fe}^{\text{III}}$  und High-Spin- $\text{Fe}^{\text{II}}$  in  $\text{MMOH}_{\text{mv}}$  resultiert in einem  $S = 1/2$ -Grundzustand, der ein rhombisches ESR-Spektrum mit  $g < 2$  zur Folge hat.<sup>[47, 96, 112]</sup> Ausgefielte Puls-ESR-Techniken wurden zur Untersuchung der Anlagerung von substrat-/produktanalogen kleinen Molekülen an das Dieisen-Zentrum in  $\text{MMOH}_{\text{mv}}$  sowie zur Beobachtung des Einflusses der Wechselwirkungen zwischen den Komponenten auf dessen Struktur verwendet. Mittels ENDOR/ESEEM-Spektroskopie konnten Signale identifiziert werden, die zu einer verbrückenden Hydroxogruppe und zu einem terminal gebundenen Wassermoleköl oder Hydroxidion gehören.<sup>[101–103]</sup> Hyperfeinkopplungen zwischen dem Dieisen-Zentrum und  $^2\text{H}$ - oder  $^{13}\text{C}$ -markiertem  $\text{DMSO}$ ,  $^{13}\text{C}$ -markiertem  $\text{MeOH}$  und Acetat belegen, dass diese drei Moleküle direkt an das Dieisen-Zentrum binden.<sup>[99, 101, 106]</sup>

Nach den Mößbauer-Spektren sind in der reduzierten  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Oxidationsstufe beide Eisenatome im High-Spin-Zustand und schwach ferromagnetisch gekoppelt.<sup>[47, 92, 111]</sup> Das daraus resultierende System mit ganzzahligem Spin weist ein energetisch niedrig liegendes Dublett auf, dessen Aufspaltung ohne äußeres Feld einer durchschnittlichen Energie im Mikrowellenbereich entspricht und das somit zu einer äußerst charakteristischen ESR-Absorption bei etwa  $g = 16$  führt.<sup>[97, 105, 108]</sup> Das Signal von  $\text{MMOH}_{\text{red}}$  bei  $g = 16$  hat sich als sehr hilfreich bei der Verfolgung der Reaktion von

$\text{MMOH}_{\text{red}}$  mit  $\text{O}_2$  erwiesen (siehe Abschnitt 3). Die MCD-Spektren sind konsistent mit dem Auftreten von zwei fünffach koordinierten, quadratisch-pyramidalen  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Zentren.<sup>[108–110]</sup> Die Anlagerung von  $\text{MMOB}$  beeinflusst hauptsächlich die Koordinationsgeometrie eines der beiden Eisenzentren. Im Gegensatz zu  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$  scheint  $\text{MMOH}_{\text{red}}$  substrat-/produktähnliche Moleküle wie  $\text{MeOH}$ ,  $\text{DMSO}$  und  $\text{MeCN}$  nicht anzulagern. Produkte wie  $\text{MeOH}$  und Phenol, die an  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$  binden, werden somit abgespalten, wenn  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$  zu  $\text{MMOH}_{\text{red}}$  reduziert wird, was die Anlagerung von Substrat im folgenden Schritt des Katalysezyklus vereinfacht.

### 2.1.2. Kristallographisch bestimmte $\text{MMOH}$ -Strukturen

Die Struktur von  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$  aus *M. capsulatus* (Bath) im Kristall verschaffte 1993 zum ersten Mal einen detaillierten Einblick in die  $\text{MMOH}$ -Proteinstruktur und ihre Dieisen-Einheit.<sup>[28, 121]</sup> Die Bestimmung der Struktur von  $\text{MMOH}$  hat den Grundstein für einen großen Teil unseres heutigen Wissens über kurzlebige Zwischenstufen bei der Aktivierung von Disauerstoff gelegt, die Kalibrierung theoretischer Berechnungen von  $\text{MMOH}$  ermöglicht und denkbare Substratzugänge und Wechselwirkungen der Komponenten aufgezeigt. Seitdem sind weitere Kristallstrukturuntersuchungen an  $\text{MMOH}$  durchgeführt worden, und zwar an  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$  aus *M. trichosporium* OB3b<sup>[30]</sup> und an  $\text{MMOH}$  aus *M. capsulatus* (Bath) in unterschiedlichen Kristallformen, Oxidationsstufen sowie in Gegenwart diverser Substrate und Produkte.<sup>[28, 29, 33, 121–123]</sup>

Tabelle 2 listet 19  $\text{MMOH}$ -Proben auf, deren Strukturen kristallographisch bestimmt worden sind. Da die beiden  $\alpha\beta\gamma$ -Protomere der  $\text{MMOH}$ -Kristalle aus *M. capsulatus* (Bath) nicht symmetrieverknüpft sind, entsprechen diese 17  $\text{MMOH}$ -Strukturen einer Sammlung von 34 unabhängigen Geometrien des aktiven Zentrums. Eine solche Sammlung von Strukturen des gleichen Proteins bietet wichtige Informationen über die Flexibilität der Seitenketten von Amino-

Tabelle 2. Kristallstrukturuntersuchungen an  $\text{MMOH}$ .

Spezies <sup>[a]</sup>	Oxidationsstufe <sup>[b]</sup>	experimentelle Bedingungen	Kristallform	Auflösung [Å]	PDB mit Literaturangabe
MCB	ox	277 K	Form I	2.20	1MMO <sup>[28]</sup>
MCB	ox	113 K	Form I	1.70	in Bearbeitung <sup>[29]</sup>
MCB	ox	100 K	Form II	1.96	1FZ1 <sup>[33]</sup>
MCB	red	100 K	Form I	1.70	1MTY <sup>[122]</sup>
MCB	red	im Kristall reduziert, 100 K	Form II	2.15	1FYZ <sup>[33]</sup>
MCB	red	reduziert gewachsen, 100 K	Form II	2.40	1FZ5 <sup>[33]</sup>
MCB	mv	im Kristall reduziert, 100 K	Form II	2.15	1FZ2 <sup>[33]</sup>
MCB	mv	gemischtvalent gewachsen, 100 K	Form II	2.07	1FZ0 <sup>[33]</sup>
MCB	ox	in Methanol äquilibriert, 100 K	Form II	2.05	1FZ6 <sup>[123]</sup>
MCB	ox	in Ethanol äquilibriert, 100 K	Form II	1.96	1FZ7 <sup>[123]</sup>
MCB	ox	in DMSO äquilibriert, 100 K	Form I	1.70	in Bearbeitung <sup>[224]</sup>
MCB	ox	unter Xenon-Druck äquilibriert, 100 K	Form I	3.30	1FZI <sup>[129]</sup>
MCB	ox	unter Xenon-Druck äquilibriert, 100 K	Form II	2.60	1FZH <sup>[129]</sup>
MCB	ox	mit Dibrommethan gewachsen, 100 K	Form II	2.10	1FZ8 <sup>[129]</sup>
MCB	ox	mit Iodethan gewachsen, 100 K	Form II	2.30	1FZ9 <sup>[129]</sup>
MCB	ox	bei pH 8.5 äquilibriert, 100 K	Form II	2.38	1FZ4 <sup>[33]</sup>
MCB	ox	bei pH 6.2 äquilibriert, 100 K	Form II	2.03	1FZ3 <sup>[33]</sup>
MTO	ox	291 K	Form I	2.00	1MHY <sup>[30]</sup>
MTO	ox	291 K	Form II	2.70	1MHZ <sup>[30]</sup>

[a] MCB: *Methylococcus capsulatus* (Bath); MTO: *Methylosinus trichosporium* OB3b. [b] Oxidationsstufe: ox =  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ , red =  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}$ , mv =  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ .

säuren am aktiven Zentrum. Man entdeckt Konformationsänderungen, die möglicherweise auch während der Katalyse und ihrer Regulierung auftreten. Statt jedoch all diese Strukturen im Detail zu beschreiben, betrachten wir hier die gemeinsamen Eigenschaften und diskutieren Unterschiede, die für die Funktionsweise von MMOH relevant sein könnten. Im Großen und Ganzen bleibt die globale Konformation des Proteins in den verschiedenen MMOH-Formen dieselbe; die Unterschiede konzentrieren sich auf das Dieisen-Zentrum und auf einige Reste nahe dem aktiven Zentrum. Wir beschränken unsere Diskussion auf Strukturen von MMOH aus *M. capsulatus* (Bath). Doch sei angemerkt, dass für MMOH aus *M. trichosporium* OB3b die Geometrie des aktiven Zentrums und die gesamte Proteinstruktur sehr ähnlich sind.

Die Gesamtstruktur von MMOH ist die eines herzförmigen  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Dimers (Abbildung 3) mit beinahe ausschließlich  $\alpha$ -helicaler Sekundärstruktur. Die Untereinheiten bilden zwei

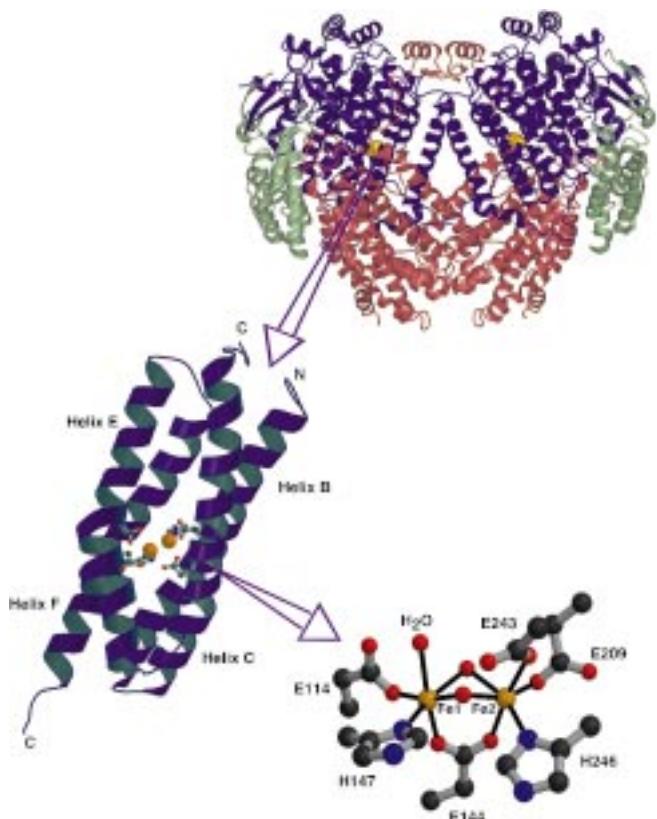


Abbildung 3. Drei Stufen der Darstellung der Struktur von MMOH aus *M. capsulatus* (Bath). Oben: Gesamtstruktur mit der zweizähligen Symmetriechse in vertikaler Richtung.  $\alpha$ : violett;  $\beta$ : rot;  $\gamma$ : grün. Mitte: Bänderdarstellung des Vier-Helix-Bündels mit im Kugel-Stab-Modell wiedergegebenen Glu- und His-Liganden. Unten: Kugel-Stab-Modell des Dieisen-Zentrums von MMOH<sub>ox</sub>. Diese Abbildung wurde mithilfe der Programme Molmol,[231] Molscript[232] und Raster3d[233] erstellt.

$\alpha\beta\gamma$ -Protomere und können über eine nichtkristallographische, zweizählige Symmetriechse ineinander überführt werden. Umfangreiche Helixkontakte zwischen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der Protomere sind für die Bildung des Dimers verantwortlich. An der Schnittstelle der Monomere

ist eine schluchtartige Region mit den ungefähren Dimensionen  $80 \text{ \AA} \times 40 \text{ \AA} \times 20 \text{ \AA}$  ausgebildet. Die  $\gamma$ -Untereinheiten flankieren die beiden Seiten der Hydroxylase und sind nicht an der Bildung des Dimers beteiligt.

Die Dieisen-Zentren befinden sich in aus den Helices B, C, E und F gebildeten Vier-Helix-Bündeln im Kern der  $\alpha$ -Untereinheit (Abbildung 3). Die Helices B und E steuern je einen Glutamatrest (Glu114, Glu209) zum Dieisen-Zentrum bei, die Helices C und F jeweils zwei das Eisen koordinierende Reste in der Form eines Glu-Xxx-Xxx-His-Motivs. Die restliche Koordinationssphäre wird von aus dem Lösungsmittel stammenden Liganden besetzt. Sehr ähnliche Strukturen kommen auch in anderen Enzymen vor, die ein carboxylatverbrücktes Dieisen-Zentrum zur Aktivierung von Disauerstoff verwenden, etwa in der R2-Untereinheit der Klasse-I-Ribonucleotid-Reduktase und in der Stearoyl-ACP- $\Delta^9$ -Desaturase.<sup>[113, 124, 125]</sup>

Abbildung 4 illustriert die Geometrien des Dieisen-Zentrums, wie sie in den kristallographisch charakterisierten Formen von MMOH gefunden wurden. In allen MMOH<sub>ox</sub>-Strukturen (Abbildung 4 A – D) sind beide Eisenatome verzerrt oktaedrisch umgeben: Fe1 durch His147, einzähniges Glu114 und ein endständiges Wassermolekül, Fe2 durch His246, einzähniges Glu209 sowie Glu243, wobei die Positionierung von Glu243, das Wasserstoffbrücken zum verbrückenden Hydroxidion oder zum endständigen Wassermolekül an Fe1 ausbilden kann, etwas flexibel ist. Die Eisenatome sind durch Glu144 (unsymmetrisch), ein Hydroxidion und einen dritten Liganden verbrückt. Der dritte verbrückende Ligand ist variabel, und mit ihm auch der Fe-Fe-Abstand: Wasser,<sup>[29]</sup> Hydroxid,<sup>[30]</sup>  $\text{H}_3\text{O}_2^-$ ,<sup>[33]</sup> Acetat<sup>[28]</sup> und Formiat<sup>[33]</sup> wurden nachgewiesen – in Abhängigkeit von Kristallform, Protomer, Spezies und Temperatur bei der Datensammlung. Diese verbrückende Position kann sogar in den zwei Protomeren desselben MMOH-Moleküls von verschiedenen Liganden eingenommen werden, was darauf hinweist, dass bereits kleinste Unterschiede in der Konformation der Protomere die Bindungsaaffinität dieser Position beeinflussen können. Eine solche Flexibilität ist in Einklang damit, dass an dieser Stelle die Disauerstoff-Aktivierung und die Methan-Hydroxylierung stattfinden<sup>[29]</sup> – eine Hypothese, die auch von der kürzlich gemachten Beobachtung gestützt wird, dass sich sowohl MeOH als auch EtOH an diese Position anlagern (Abbildung 4 I, J).<sup>[123]</sup>

Die Reduktion zum  $\text{Fe}_2^{\text{II}}$ -Zustand hat am Dieisen-Zentrum signifikante Veränderungen zur Folge.<sup>[28, 29, 33]</sup> Am meisten betroffen ist Glu243, das durch eine Carboxylat-Verschiebung das verbrückende Hydroxidion verdrängt und Fe2 nun zweizähnig chelatisierend sowie Fe1 einfach bindet (Abbildung 4E, F). Eine ähnliche Verbrückung durch einen Carboxylatrest wurde kürzlich bei den entsprechenden  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Zentren in D84E- sowie in Azid-äquilibrierten F208A/Y122F-Mutanten des R2-Proteins von Ribonucleotid-Reduktase nachgewiesen.<sup>[126, 127]</sup> Die Koordination des Wasser/Hydroxid-Liganden in der verbrückenden Position gegenüber den zwei Histidinresten ist etwas variabel und kann von symmetrisch zu schwach und asymmetrisch wechseln. Der Abstand zwischen dem Sauerstoffatom von Glu144 und Fe2 nimmt von 2.6 auf 2.3 Å ab, was einer Änderung der Koordination des

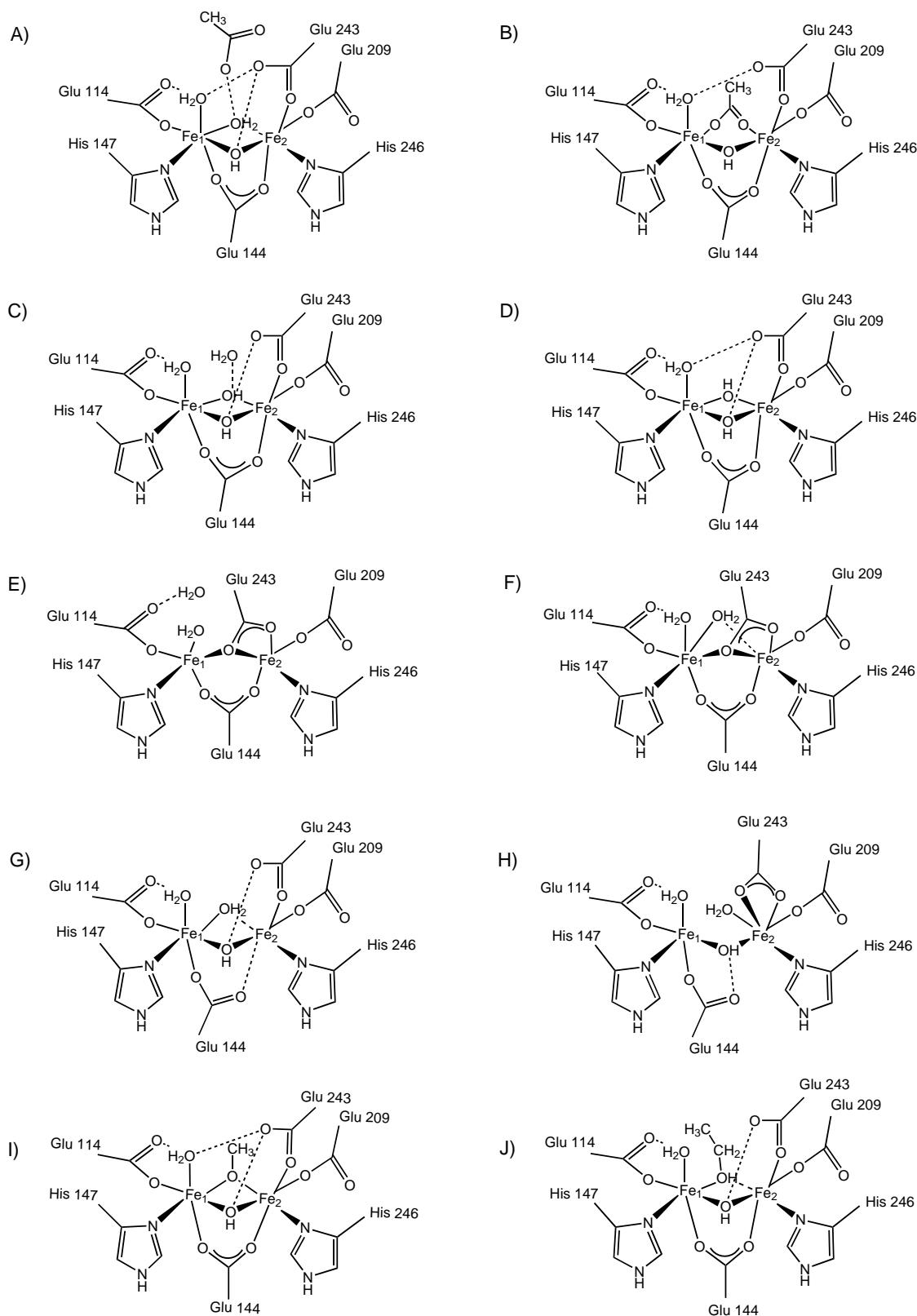


Abbildung 4. Koordinationsgeometrien des Dieisen-Zentrums von MMOH in verschiedenen Zuständen: A)  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$ , Form I bei 160 K; B)  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$ , Form I bei 277 K; C)  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$ , Form II; D)  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$  aus *M. trichosporium* OB3b, Form I; E)  $\text{MMOH}_{\text{red}}$ , Form I; F)  $\text{MMOH}_{\text{red}}$ , Form II; G)  $\text{MMOH}_{\text{mv}}$ ; H)  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$ , äquilibriert in 10-proz. DMSO; I)  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$ , äquilibriert in 1M MeOH; J)  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$ , äquilibriert in 1M EtOH. Alle Strukturen außer der in (D) gezeigten gelten für das Enzym aus *M. capsulatus* (Bath). Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht in allen Strukturen der des Enzyms aus *M. capsulatus* (Bath). Gestrichelte Linien stellen Wasserstoffbrücken oder sehr schwache Fe-O-Wechselwirkungen dar.

Carboxylatrests dieses Liganden von quasiverbrückend in  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$  zu verbrückend in  $\text{MMOH}_{\text{red}}$  entspricht.

Basierend auf diesen Strukturen liegt die Vermutung nahe, dass die Anlagerung von Disauerstoff durch Substitution des schwach koordinierenden, verbrückenden Wassermoleküls gegenüber den Histidinresten vollzogen wird. Diese Position grenzt an einen hydrophoben Hohlraum neben dem Dieisen-Zentrum. Es darf allerdings nicht vergessen werden, dass  $\text{MMOH}_{\text{red}}$  ohne  $\text{MMOB}$  nicht sehr reaktiv ist<sup>[49]</sup> und dass sich die Geometrie des aktiven Zentrums von  $\text{MMOH}_{\text{red}}$ , in der es mit  $\text{O}_2$  reagiert, von allen bisher in Kristallen gefundenen unterscheiden kann.

Die Dieisen-Zentren in  $\text{MMOH}_{\text{mv}}$  und  $\text{MMOH}_{\text{DMSO}}$ , letzteres hergestellt durch Äquilibrieren von  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$ -Kristallen in einer Lösung des Inhibitors DMSO (10 Vol.-%), ähneln einander und sind gegenüber den Dieisen-Zentren von  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$  und  $\text{MMOH}_{\text{red}}$  stark verzerrt (Abbildung 4G und H).<sup>[29, 33]</sup> Obwohl keine der beiden Strukturen direkte Relevanz für die MMO-Katalyse hat, ermöglichen sie zusätzliche Einblicke in die geometrische Flexibilität der carboxylatverbrückten Dieisen-Zentren von MMOH. In beiden Strukturen bleibt die Koordination an Fe1 unverändert, wohingegen sich die an Fe2 stark ändert: Fe2 wird um 1 Å senkrecht zum Fe-Fe-Vektor verschoben. In der  $\text{MMOH}_{\text{mv}}$ -Struktur liegt Fe2 vierfach durch Glu209, Glu243, His246 und  $\mu$ -OH als jeweils einzähnige Liganden koordiniert vor. Eine zweizähnige Koordination durch Glu243 und die Koordination eines endständigen Wassermoleküls ergeben dagegen in  $\text{MMOH}_{\text{DMSO}}$  eine oktaedrische Geometrie um Fe2.

Immer wieder lässt sich beobachten, dass die Koordinationsumgebung um Fe2 viel flexibler ist als die um Fe1. Ein Vergleich der individuellen B-Faktoren ergibt deutlich mehr thermische Bewegung um Fe2, und neue Arbeiten weisen darauf hin, dass unter gewissen Umständen Fe2 weniger stark gebunden ist als Fe1.<sup>[33]</sup> Wir folgern daraus, dass es sich bei Fe2 höchstwahrscheinlich um das Eisenatom handelt, das durch die Anlagerung von  $\text{MMOB}$  stärker beeinflusst wird. Wie zuvor bereits aufgrund von CD/MCD-Daten<sup>[108–110]</sup> argumentiert wurde, ist nur eines der beiden Eisenatome signifikant von der Wechselwirkung des Regulierungsproteins mit der Hydroxylase betroffen.  $\text{MMOB}$  könnte die Konformation von Fe2 durch Veränderung der Konformation der sich an der Oberfläche befindenden Helices E und F beeinflussen, die all die Aminosäuren beherbergen, die an Fe2 koordinieren (Glu243, His246 und Glu209).

Das MMOH-Protein liefert nicht nur Liganden für die beiden Eisenatome. Damit am Dieisen-Zentrum Reaktionen ablaufen können, müssen Elektronen, Disauerstoff und Kohlenwasserstoffsubstrate an Ort und Stelle durch strikt regulierte Prozesse zur Verfügung gestellt werden. Eine Sequenzvergleich von sMMOs, Toluol-Monooxygenasen, Alkan-Monooxygenasen und Phenol-Hydroxylasen ergab ein universell konserviertes Netz aus Wasserstoffbrücken, das sich von der Dieisen-Einheit bis zur Oberfläche der Hydroxylase erstreckt.<sup>[54]</sup> Dazu gehören die das Eisen koordinierenden Histidinreste ebenso wie die an der Proteinoberfläche in Helix A in der MMOH-Schlucht befindlichen Aminosäuren Tyr67 und Lys74, die etwa 10 Å von der Dieisen-Einheit entfernt sind (Abbildung 5). Ein ähnliches Wasserstoffbrückennetzwerk existiert im R2-Protein von Ribonucleotid-Reduktase, in dem es vermutlich am Elektronentransfer beteiligt ist.<sup>[128]</sup> Möglicherweise findet die Zufuhr von Elektronen von  $\text{MMOB}$  zu MMOH entlang dieses Pfades statt.

Abbildung 5. Struktur von MMOH mit dem Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen konservierten Resten, von denen angenommen wird, dass sie am Elektronentransfer beteiligt sind. Das Netzwerk erstreckt sich von den zwei Eisen-koordinierenden Histidinresten bis zu den Aminosäuren Tyr67 und Lys74 an der Oberfläche des Proteins. Diese Abbildung wurde mithilfe der Programme Molscript und Raster3d erstellt.<sup>[232, 233]</sup> Genehmigter Nachdruck aus Lit. [234].

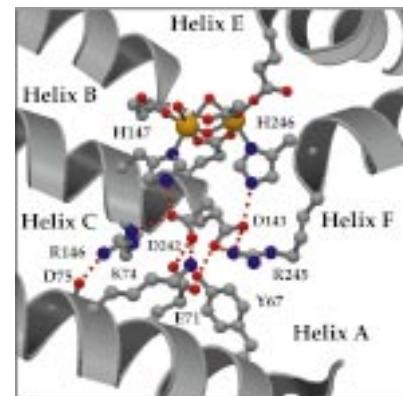


Abbildung 5. Struktur von MMOH mit dem Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen konservierten Resten, von denen angenommen wird, dass sie am Elektronentransfer beteiligt sind. Das Netzwerk erstreckt sich von den zwei Eisen-koordinierenden Histidinresten bis zu den Aminosäuren Tyr67 und Lys74 an der Oberfläche des Proteins. Diese Abbildung wurde mithilfe der Programme Molscript und Raster3d erstellt.<sup>[232, 233]</sup> Genehmigter Nachdruck aus Lit. [234].

Das aktive Zentrum von MMO enthält gegenüber den Histidinresten eine hydrophobe Tasche mit einem Volumen von ca. 185 Å<sup>3</sup> zur Anlagerung von Substrat. Diese Tasche bevorzugt hydrophobe Gastmoleküle wie Methan und Disauerstoff. Mehrere Möglichkeiten für den Eintritt von Substrat in diesen Hohlraum und den Austritt von Produkt aus ihm sind bisher in Betracht gezogen worden.<sup>[122, 129]</sup> Der kürzeste und direkteste Weg in den Hohlraum führt durch einen Zwischenraum zwischen den Helices E und F. Denkbar ist, dass Änderungen der Konformationen dieser Helices, durch normales Atmen des Proteins veränderte Rotamerkonformationen der Seitenketten oder auch die Anlagerung von  $\text{MMOB}$  es dem Substrat erlauben, sich seinen Weg in das aktive Zentrum zu bahnen. Ein Vergleich der Strukturen von  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$  und  $\text{MMOH}_{\text{red}}$  ergab leicht unterschiedliche Konformationen dieser Helices.<sup>[33]</sup>

Eine andere Art des Eintritts von Substrat in das aktive Zentrum würde eine Reihe von Bewegungen durch einige der fünf hydrophoben Hohlräume umfassen, die in der  $\alpha$ -Untereinheit gefunden wurden (Abbildung 6). Eine denkbare Route könnte sich von der Proteinoberfläche aus durch die im hydrophoben Kern der  $\alpha$ -Untereinheit befindlichen Hohlräume 3 und 2 in den Hohlraum 1, das aktive Zentrum, erstrecken.<sup>[33, 122]</sup> Kristallographische Untersuchungen an  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$ -Kristallen vom Typ I und II, die Xenon im Überdruck ausgesetzt worden waren, wiesen geordnetes Xe im Hohlraum 2 nach.<sup>[129]</sup> Da der Van-der-Waals-Radius von Xenon beinahe identisch ist mit dem von Methan (~2.15 Å), spricht der Xenon-Nachweis in Hohlraum 2 dafür, dass die verborgenen hydrophoben Taschen der  $\alpha$ -Untereinheit auch für das natürliche Substrat zugänglich sein sollten. Die Aminosäure Leu110, die eine Barriere zwischen den Hohlräumen 1 und 2 bildet, verändert bei der Reduktion von MMOH im Kristalltyp I ihre Konformation von einer

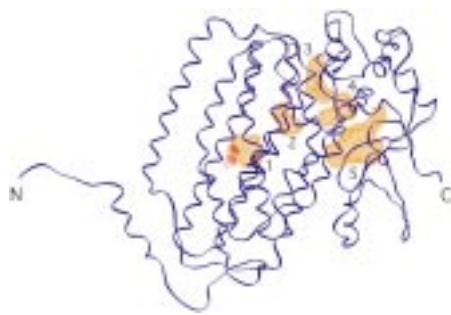


Abbildung 6. Bänderdarstellung der  $\alpha$ -Untereinheit von MMOH mit fünf hydrophoben Taschen, die möglicherweise an der Anlagerung von Substrat und dessen Transport zum aktiven Zentrum beteiligt sind. Diese Abbildung wurde mithilfe des Programms O<sup>[235]</sup> erstellt. Genehmigter Nachdruck aus Lit. [122].

„geschlossenen“ zu einer „offenen“ Position (Abbildung 7). In Typ-II-MMOH aus *M. capsulatus* (Bath) hingegen wurde sowohl in der oxidierten als auch in der reduzierten Struktur nur das geöffnete Rotamer gefunden.<sup>[33, 122]</sup> Asn214 ist ein

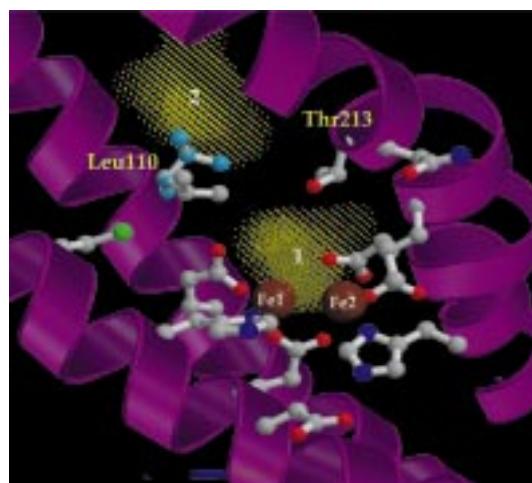


Abbildung 7. Eine genauere Ansicht des aktiven Zentrums von MMOH. Von Leu110 sind zwei Konformationen gezeigt („geschlossen“ in Blau, „offen“ in Grau). Diese Aminosäure agiert möglicherweise als Pforte zwischen den hydrophoben Taschen 1 und 2 (in Gelb dargestellt). Diese Abbildung wurde mithilfe der Programme Molscript und Raster3d erstellt.<sup>[232, 233]</sup>

weiterer konservierter Rest, der verschiedene Konformationen einnimmt. In MMOH<sub>ox</sub> weist die Seitenkette von Asn214 nach außen in Richtung des Lösungsmittels, in allen MMOH<sub>red</sub>-Strukturen ist sie jedoch der Dieisen-Einheit im Inneren zugewandt.<sup>[33]</sup> Dieser Aminosäurerest könnte somit an der Übermittlung des Einflusses von MMOB auf die Redoxeigenschaften von MMOH beteiligt sein. So könnten Vorgänge wie die Reduktion des Dieisen-Zentrums oder die Anlagerung der anderen MMO-Komponenten die Konformation von Leu110 und anderen Aminosäureresten zum Zweck der Zufuhr von Substrat oder Lösungsmittel in das aktive Zentrum steuern. Eine solche „Leucin-Pforte“ war ursprünglich im Zusammenhang mit der Regulierung der O<sub>2</sub>-Zufuhr zum Dieisen-Zentrum in Hämerythrin vorgeschlagen worden,<sup>[130, 131]</sup> neue Studien weisen jedoch eher auf eine Rolle von Leu98 bei der Zufuhr von Lösungsmittel und nicht von O<sub>2</sub> hin.<sup>[132, 133]</sup>

## 2.2. MMOB

Die Zugabe von MMOB zu den anderen sMMO-Bestandteilen hat Auswirkungen sowohl auf die Geschwindigkeit und die Regioselektivität Hydroxylase-katalysierter Reaktionen als auch auf die Redoxpotentiale des Dieisen-Zentrums von MMOR (siehe Abschnitt 5 für eine eingehendere Diskussion).<sup>[2, 24, 44–46, 48–50, 134]</sup> Ähnliche regulierende Proteine kommen in anderen Mehrkomponenten-Monooxygenasen wie der Toluol-, Phenol- oder Alkan-Monooxygenase vor.<sup>[54, 135]</sup> Eine Vielzahl spektroskopischer Befunde spricht dafür, dass MMOB seinen Einfluss auf MMOH durch Anlagerung in der Umgebung der Dieisen-Einheit ausübt und so deren Struktur geringfügig ändert.<sup>[44, 46, 93, 98, 100, 108–110]</sup> Wie das kleine MMOB-Protein ohne Cofaktor die unterschiedlichsten Aspekte der MMO-Katalyse genau beeinflusst, bleibt rätselhaft. Die kürzliche Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von MMOB mittels NMR-Spektroskopie hat jedoch wichtige geometrische Einblicke in die mögliche Natur der Wechselwirkung zwischen MMOH und MMOB gebracht und einen guten Ausgangspunkt für weitergehende Studien des regulatorischen Mechanismus von MMOB geschaffen.

MMOB aus *M. capsulatus* (Bath) und aus *M. trichosporium* OB3b wurde NMR-spektroskopisch strukturell charakterisiert (Abbildung 8); die mittlere Standardabweichung für das

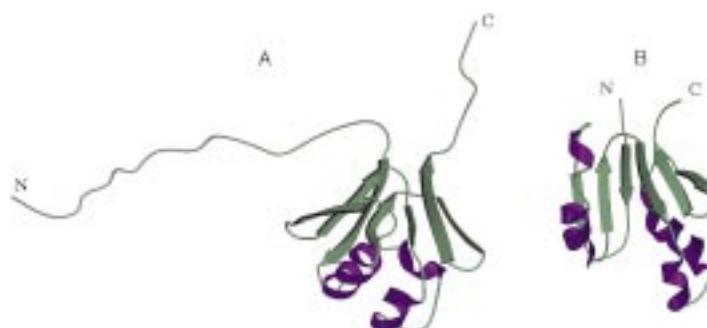


Abbildung 8. Bänderdarstellung der Struktur von MMOB A aus *M. capsulatus* (Bath) (Kennung in der Proteindatenbank PDB: 1CKV) und B aus *M. trichosporium* OB3b (PDB: 2MOB). Diese Abbildung wurde mithilfe der Programme Molscript und Raster3d erstellt.<sup>[232, 233]</sup>

Rückgrat des Proteinkerns betrug dabei 0.46 bzw. 1.1 Å.<sup>[31, 32]</sup> Der MMOB-Kern, der im Fall des Enzyms aus *M. capsulatus* (Bath) aus den Aminosäuren 35–127 besteht, setzt sich aus sieben  $\beta$ -Strängen in zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern zusammen, die beinahe senkrecht zueinander angeordnet sind (Abbildung 8A). Drei  $\alpha$ -Helices überbrücken den Raum zwischen den beiden  $\beta$ -Faltblättern und bilden so den globulären Proteinkern. Die ersten 35 und die letzten 12 Aminosäuren von MMOB konnten nicht gut charakterisiert werden, aber sowohl NMR- als auch CD-Experimente deuten darauf hin, dass ein Teil des N-Terminus eine helicale Struktur einnimmt.<sup>[31, 32, 83]</sup> Proteolytische Spaltung in der N-terminalen Region inaktiviert MMOB vollständig.<sup>[83, 134, 136]</sup>

Bei zwei weiteren Mehrkomponenten-Hydroxylasen wurden die regulatorischen Proteine NMR-spektroskopisch strukturell charakterisiert: das Protein P2 in Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. CF600 und das Protein T4moD in

Toluol-4-Monooxygenase aus *Pseudomonas mendocina*.<sup>[135, 137]</sup> Die Sekundärstrukturen von beiden regulatorischen Proteinen ähneln der von MMOB, und auch die Tertiärstruktur von T4moD ähnelt der von MMOB aus *M. capsulatus* (Bath). Unterschiede zwischen MMOB und P2, das flacher ist und ein „Doughnut“-förmiges Loch in seiner Mitte aufweist, können möglicherweise in fehlenden Constraints in der letztgenannten Struktur begründet sein, wie durch die Standardabweichung von 2.48 Å für das Proteinrückgrat deutlich wird. Ferner weisen NMR-Untersuchungen darauf hin, dass P2 mit dem Substrat wechselwirkt, wohingegen eine solche Wechselwirkung im Fall von MMOB nicht beobachtet werden konnte.<sup>[31, 137]</sup>

NMR-Experimente mit MMOB in Gegenwart der Hydroxylase haben mehrere konservierte Aminosäuren an der Oberfläche identifiziert, die möglicherweise bei der Anlagerung an das größere Hydroxylase-Protein eine Rolle spielen.<sup>[32]</sup> Eine Projektion dieser Aminosäuren, deren NMR-Signale in Gegenwart von MMOH verbreitert sind, auf die dreidimensionale Struktur von MMOB zeigt, dass sich die meisten auf der Seite des Proteins befinden, die auch die konservierten Aminosäuren E53, E94, L96, G97, F100 und D108 (Abbildung 9) aufweist. N- wie auch C-Terminus

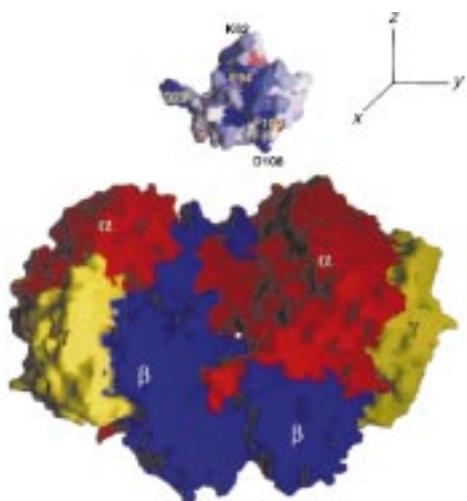


Abbildung 9. Ein Oberflächenmodell für das Andocken von MMOB (oben) in der Schlucht von MMOH (unten). Die am stärksten von einer Anlagerung an MMOH beeinflussten MMOB-Aminosäuren sind blau dargestellt, die am wenigsten beeinflussten rot. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde MMOB aus seiner angenommenen Andockposition auf der Oberfläche der Hydroxylase entfernt und im Uhrzeigersinn um 90° um die y-Achse gedreht. Die auf der „unten“ Hälften von MMOB gelegenen, am stärksten durch die Anlagerung an MMOH beeinflussten Aminosäuren sind dadurch besser sichtbar. Diese Abbildung wurde mithilfe des Programms Grasp<sup>[236]</sup> erstellt. Genehmigter Nachdruck aus Lit. [32].

befinden sich auf der entgegengesetzten Seite von MMOB. Auch die NMR-Signale einer stark konservierten Region am N-Terminus (Aminosäuren 22–26) sind bei 25 °C verbreitert. Diese Befunde deuten darauf hin, dass sich die untere Hälfte von MMOB in eine nicht näher bestimmte Region der Hydroxylase, vermutlich die „Schlucht“, einlagert, wohingegen die obere Hälfte dem Lösungsmittel ausgesetzt ist. Eine

Wechselwirkung des N-Terminus mit Aminosäuren auf der Oberfläche von MMOH könnte so die Verbreiterung der NMR-Signale der Reste 22–26 erklären.<sup>[28, 32, 33]</sup> Dieses Modell ist in Einklang mit den Ergebnissen von chemischen Verknüpfungsexperimenten, nach denen MMOB mit der  $\alpha$ -Untereinheit von MMOH wechselwirkt.<sup>[44]</sup>

### 2.3. MMOR

MMOR ist der einzige MMO-Bestandteil, dessen dreidimensionale Struktur noch unbekannt ist. Er enthält einen [2Fe-2S]-Cluster und einen FAD-Cofaktor, die beide dem Elektronentransfer von NADH zu MMOH dienen.<sup>[24, 25, 27, 42, 43, 138, 139]</sup> Bei Abwesenheit von MMOH kann das Protein Elektronen von NADH auf eine Vielzahl von Elektronenacceptoren übertragen, so etwa auf  $K_3[Fe(CN)_6]$  und 2,6-Dichlorindophenol, oder es kann  $O_2$  zu Wasserstoffperoxid reduzieren.<sup>[27, 138]</sup>

Der [2Fe-2S]-Cluster befindet sich im N-terminalen Teil von MMOR und weist eine signifikante Sequenzhomologie zu Ferredoxinen aus Pflanzen, Cyanobakterien und Archaeabakterien auf.<sup>[53]</sup> Seine optischen,<sup>[27, 43]</sup> ESR-<sup>[43, 47, 138, 140]</sup> und Mößbauer-Spektren<sup>[47]</sup> sind charakteristisch für [2Fe-2S]-Ferredoxine. Der FAD-Cofaktor befindet sich ebenso wie die NADH-bindende Region in der C-terminalen Domäne von MMOR. Bei einer Einelektronen-Reduktion des FAD-Cofaktors erscheinen für eine neutrale, radikalische Semichinon-Zwischenstufe typische optische Banden bei 590 und 650 nm.<sup>[25, 27, 43, 84]</sup> Die Redoxpotentiale der MMOR-Cofaktoren liegen so, dass ein Elektronentransfer in der physiologischen Richtung bevorzugt wird:  $NADH(E^\circ = -320 \text{ mV}) \rightarrow FAD(E^\circ = -266/-176 \text{ mV}) \rightarrow [2Fe-2S](E^\circ = -209 \text{ mV}) \rightarrow MMOH(E^\circ \sim +100 \text{ mV})$  im ternären MMOH-MMOB-MMOR-Komplex).<sup>[\*][2, 42, 45, 84, 120, 140]</sup> Die Redoxpotentiale von MMOR werden durch MMOH oder MMOB nicht signifikant beeinflusst.<sup>[84]</sup>

Als teilweiser Ersatz für die fehlende hochauflöste Struktur von MMOR können Resultate von Röntgenstrukturanalysen an verwandten Proteinen dienen, und zwar an Phthalat-Dioxygenasereduktase (PDR) (Abbildung 10) und einem Komplex zwischen Maisblatt-[2Fe-2S]-Ferredoxin (Fd) und Fd-NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase (FNR).<sup>[141–143]</sup> Wie MMOR verschiebt PDR Elektronen von NADH durch Flavin- und [2Fe-2S]-Cofaktoren zu einer eisenhaltigen Oxygenase. Die Anordnung der Flavin- und [2Fe-2S]-Domänen ist jedoch genau umgekehrt; ferner verwendet PDR ein Flavinmononucleotid (FMN) anstelle von FAD.<sup>[141]</sup> In PDR nehmen die [2Fe-2S]- und die NADH-bindenden Domänen die Form einer Kidneybohne an, wobei die Isoalloxazin-Gruppe von FMN in der zentralen Spalte optimal für den Elektronentransfer von NADH zum [2Fe-2S]-Zentrum positioniert vorliegt. Der Abstand zwischen dem nächstgelegenen Eisen-

[\*] Bei den angegebenen MMOR-Potentialen handelt es sich um die erst kürzlich in unserem Labor am rekombinanten Protein bestimmten Werte.<sup>[84]</sup> Ähnliche Werte sind bereits für natives MMOR berichtet worden.<sup>[42, 140]</sup> Alle Potentiale sind relativ zur Normalwasserstoffelektrode angegeben.

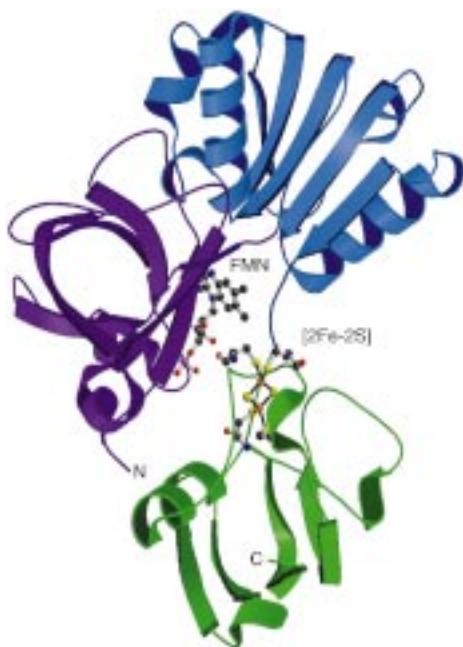


Abbildung 10. Bänderdarstellung der Struktur von PDR im Kristall mit den [2Fe-2S]- und FMN-Cofaktoren in Form von Kugel-Stab-Modellen (PDB: 2PIA). Die [2Fe-2S]-, FMN- und NADH-bindenden Domänen sind in Grün, Violett bzw. Blau dargestellt.<sup>[141]</sup> Diese Abbildung wurde mithilfe der Programme Molscript und Raster3d erstellt.<sup>[232, 233]</sup>

ion des [2Fe-2S]-Zentrums und der 8-Methylgruppe von FMN beträgt nur 7.2 Å.

Der Komplex zwischen Maisblatt-[2Fe-2S]-Ferredoxin und Fd-NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase hat die gleiche Funktion wie MMOR und PDR, nur dass es sich bei den Ferredoxin- und Flavin/NADP<sup>+</sup>-bindenden Teilen um separate Proteine anstatt Domänen desselben Proteins handelt. Im Großen und Ganzen ähnelt die Faltung der beiden Proteine in diesem Komplex der Faltung der entsprechenden Domänen in PDR, was auf den Elektronentransfer entlang eines gemeinsamen Pfades hinweist, der vermutlich so auch in MMOR existiert. Ein Unterschied zwischen dem Fd-FNR-Komplex und PDR liegt in der Orientierung der Ferredoxin-Domäne, die um etwa 180° um eine Achse zwischen dem näheren Eisenion des [2Fe-2S]-Zentrums und der 8-Methylgruppe des Flavin-Cofaktors gedreht vorliegt. Welche Ausrichtung in MMOR vorliegt, muss noch ermittelt werden, aber beide Orientierungen laufen auf einen etwa gleichen Abstand zwischen dem [2Fe-2S]-Zentrum und dem Flavin-Cofaktor hinaus.

### 3. Schnappschüsse des Katalysecyclus

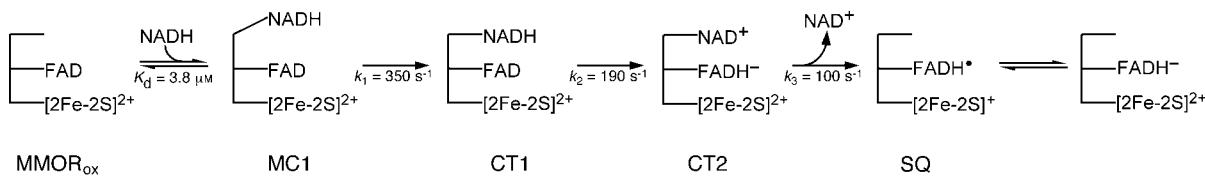
Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur einer jeden Zwischenstufe auf dem enzymatischen Weg ist der ultimative

Traum eines Enzymologen, weil er so in der Lage wäre, einen Film über die molekulare Funktionsweise des Enzyms zusammenzustellen. Die Tatsache, dass das MMO-System ein Mehrkomponentensystem ist, erschwert die Anwendung der zeitaufgelösten Kristallographie,<sup>[144]</sup> zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen hingegen haben sich als äußerst erfolgreich bei der Identifizierung und Charakterisierung zahlreicher Intermediate des Katalysecyclus von MMO erwiesen.<sup>[27, 50, 145–148]</sup> Zwei Aspekte der MMO-Katalyse sind mittels zeitaufgelöster Spektroskopie untersucht worden: Die MMOR-unterstützte Reduktion des Dieisen-Zentrums durch NADH sowie die während der Aktivierung von O<sub>2</sub> und der Hydroxylierung von Methan am Dieisen-Zentrum von MMOH ablaufenden Schritte.

#### 3.1. Der Elektronentransfer von NADH über MMOR zum Dieisen-Zentrum in MMOH

sMMOs verwenden ein hochentwickeltes System zum Elektronentransfer, bei dem sich die NADH-oxidierten und die Methan-hydroxylierenden Einheiten in zwei getrennten Proteinen befinden. Diese physikalische Trennung begrenzt die Zahl sinnloser Cyclen, in denen nur NADH statt NADH und Methan oxidiert wird. Verwandte Systeme können in bakteriellen Monooxygenasen, Dioxygenasen sowie in Elektronentransportketten bei Photosynthese und Atmung gefunden werden.<sup>[3, 54, 149–151]</sup> Ein Verständnis aller Aspekte des Elektronentransfers innerhalb des MMO-Systems und seiner Regulierung durch Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten mag sich als komplex herausstellen. Nichtsdestotrotz konnten einige Intermediate sowohl der intramolekularen (Reduktion von MMOR durch NADH) als auch der intermolekularen Elektronentransferschritte (Reduktion von MMOH durch MMOR) mittels optischer Stopped-Flow-Spektroskopie identifiziert werden.<sup>[27, 139]</sup>

Schema 2 zeigt Intermediate, die während der Reaktion von MMOR<sub>ox</sub> mit NADH gebildet werden.<sup>[27, 84]</sup> Die erste nachweisbare Zwischenstufe, CT1, wird als Charge-Transfer-Komplex zwischen der Nicotinamid-Einheit von NADH und dem Isoalloxazin-Ring von FAD formuliert. Die Bildungsgeschwindigkeit von CT1 erreicht bei Erhöhung der NADH-Konzentration einen Grenzwert, was auf eine Anlagerung von NADH in zwei Schritten hinweist. Der zunächst gebildete Michaelis-Komplex, MC1, kann spektroskopisch nicht beobachtet werden. Eine zweite Charge-Transfer-Zwischenstufe, CT2, wird durch den Transfer eines Hydridions von NADH zu FAD gebildet. CT2 absorbiert stärker und bei niedrigerer Energie als CT1, weil die π-Stapelwechselwirkung nun zwischen dem NAD<sup>+</sup>-Kation und dem FADH<sup>–</sup>-Anion auftritt. Die Abspaltung von NAD<sup>+</sup> und ein partieller Elektro-



Schema 2. Bei der Reaktion von MMOR<sub>ox</sub> mit NADH gebildete Zwischenstufen.

nentransfer von  $\text{FADH}^-$  zu  $[\text{2Fe-2S}]_{\text{ox}}$  verlaufen zeitgleich. Diese Einelektronen-Übertragung führt zur Bildung eines Flavin-Semichinons und von  $[\text{2Fe-2S}]_{\text{red}}$ .

Wenn NADH zu einem 1:1-Komplex aus  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$  und  $\text{MMOR}_{\text{ox}}$  gegeben wird, bleiben die Anfangsschritte – Anlagerung von NADH an MMOR und Hydrid-Transfer – in erster Näherung unverändert.<sup>[27]</sup> Die Geschwindigkeiten der Abspaltung von  $\text{NAD}^+$  und des von  $\text{FADH}^-$  ausgehenden Elektronentransfers ähneln stark den für MMOR allein gefundenen, obwohl nun ein Gemisch aus Komplexen mit beiden Elektronen in MMOR und solchen mit einem Elektron in MMOR und einem in  $\text{MMOH}$  vorliegt. Die folgenden Elektronentransfers zu  $\text{MMOH}$  und damit letztendlich die Bildung von  $\text{MMOH}_{\text{red}}$  erfolgen langsamer. Zugabe von MMOB erhöht die Geschwindigkeit dieser intermolekularen Elektronentransferreaktionen, wobei die Geschwindigkeit bei einem Molverhältnis MMOB:MMOH von 1:1 maximal ist. Methanol verlangsamt den intermolekularen Elektronentransfer, wohingegen Methan keinen Einfluss hat.

Das Auftreten zusätzlicher Elektronentransferschritte zwischen den Cofaktoren von MMOR erschwert die spektroskopische Analyse der intermolekularen Elektronentransferreaktion. Untersuchungen ausgehend von vorab reduziertem MMOR oder mit nur der N-terminalen Ferredoxin-ähnlichen Domäne von MMOR sollten zur Lösung dieses Problems beitragen und so zu einem besseren Verständnis des intermolekularen Elektronentransfers von MMOR zu  $\text{MMOH}$  führen.<sup>[152]</sup>

### 3.2. Zwischenstufen bei der Aktivierung von $\text{O}_2$

MMO hat sich als lohnendes System zur Untersuchung molekularer Details der Disauerstoff-Aktivierung an Nicht-häm-Dieisen-Zentren erwiesen. Zwei besondere Eigenschaften von sMMO sind für diesen Erfolg wesentlich. Zum einen kann chemisch reduziertes  $\text{MMOH}$  mit  $\text{O}_2$  und Substrat auch bei Abwesenheit der anderen MMO-Bestandteile zu hydroxylierten Produkten und  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$  reagieren.<sup>[24]</sup> Obwohl die Ausbeuten dieser Reaktion mit einfacherem Umsatz unterschiedlich ausfallen und unterhalb von 40% liegen, belegt dieses Resultat dennoch, dass sowohl die Aktivierung von Disauerstoff als auch die Hydroxylierung selbst im  $\text{MMOH}$ -Protein stattfinden.<sup>[24, 50]</sup> Zum anderen, und das ist weitaus wichtiger, ist die Energetik der Reaktion in Gegenwart von MMOB so, dass einige Zwischenstufen in signifikanten Mengen gebildet werden, bevor sie zerfallen.

Abbildung 11 zeigt Zwischenstufen des Katalysezyklus, die während der Reaktion mit einfacherem Umsatz zwischen  $\text{MMOH}_{\text{red}}$  und  $\text{O}_2$  in Abwesenheit oder Gegenwart von Substrat nachgewiesen wurden.<sup>[50, 145, 147, 148]</sup> Die Reaktion kann dabei kontinuierlich oder diskontinuierlich verfolgt werden. Im ersten Fall werden farbige Intermediate mittels optischer Stopped-Flow-Spektroskopie nachgewiesen, im zweiten die Intermediate durch Stoppen der Reaktion durch rasches Einfrieren der ESR-, Mößbauer- oder EXAFS-Spektroskopie zugänglich gemacht. Der Zerfall von  $\text{MMOH}_{\text{red}}$  wurde per ESR- (Verschwinden des Signals bei  $g=16$ ) und Mößbauer-Spektroskopie verfolgt.<sup>[49, 50, 120, 145]</sup> In Ge-

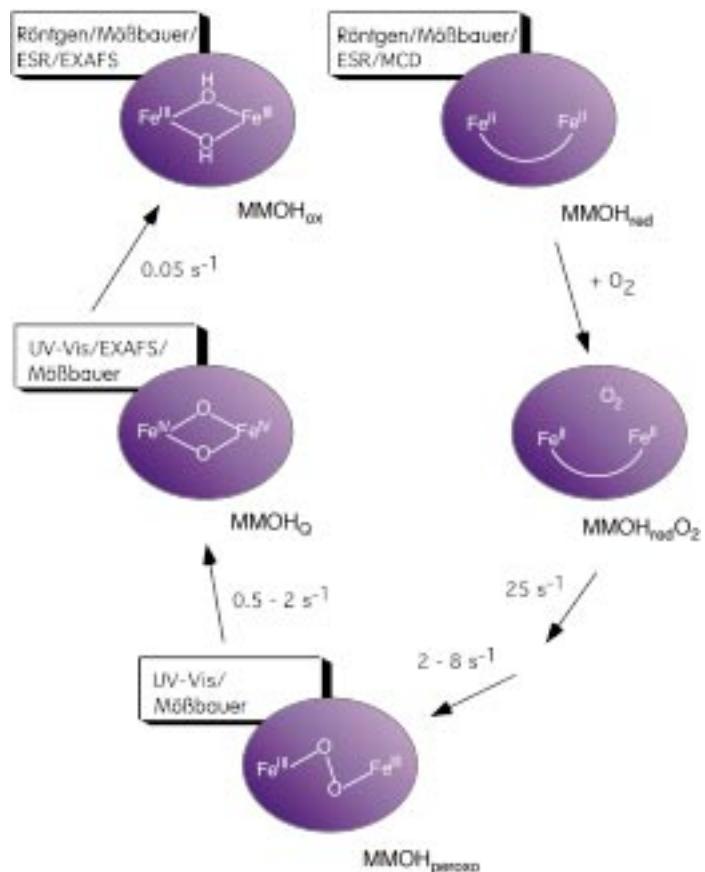


Abbildung 11. Überblick über die bei der Reaktion mit einfacherem Umsatz zwischen  $\text{MMOH}_{\text{red}}$  und  $\text{O}_2$  beobachteten katalytischen Zwischenstufen und die zur Charakterisierung verwendeten Techniken. Für die  $\text{MMOH}_{\text{peroxo}}$ - und  $\text{MMOH}_\text{O}$ -Zwischenstufen sind auch andere als die hier gezeigten Strukturen vorgeschlagen worden. Die Geschwindigkeitskonstanten stammen aus Untersuchungen an den Enzymen aus *M. capsulatus* (Bath) und *M. trichosporium* OB3b und wurden in MOPS-Puffer (3-Morpholinopropansulfosäure, pH 7.0) bei 4 °C bestimmt.

genwart von MMOB verschwindet das  $g=16$ -Signal im Fall von  $\text{MMOH}_{\text{red}}$  aus *M. trichosporium* OB3b bei 4 °C mit einer Geschwindigkeit von  $(22 \pm 5) \text{ s}^{-1}$ . In diesem Zeitfenster treten keine neuen ESR-Signale auf.<sup>[145]</sup> Die Abnahme von  $\text{MMOH}_{\text{red}}$  ist zwischen 0.3 und 0.7 mm unabhängig von der Disauerstoff-Konzentration, was auf die intermediäre Bildung eines Michaelis-Komplexes zwischen  $\text{MMOH}_{\text{red}}$  und  $\text{O}_2$  noch vor dem Verschwinden des Signals bei  $g=16$  hindeutet. Zwischen  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$  und  $\text{O}_2$  bildet sich hingegen kein solcher Komplex.<sup>[153]</sup> Eine Tatsache, die nur selten in Übersichten und Diskussionen über den Mechanismus der Disauerstoff-Aktivierung durch MMOH zum Ausdruck kommt, ist, dass ein großer Teil von  $\text{MMOH}_{\text{red}}$  inaktiv zu sein scheint und so langsam zu  $\text{MMOH}_{\text{ox}}$  reagiert, dass diese Reaktion katalytisch nicht relevant sein kann.<sup>[50, 95, 146, 147, 154, 155]</sup> Das Vorliegen dieser zwei  $\text{MMOH}_{\text{red}}$ -Populationen wirkt sich erschwerend auf die spektroskopische Charakterisierung der Zwischenstufen aus.

Die erste spektroskopisch beobachtbare Zwischenstufe nach  $\text{MMOH}_{\text{red}}$  ist  $\text{MMOH}_{\text{peroxo}}$ . Sie wurde zuerst beim Enzym aus *M. capsulatus* (Bath) entdeckt und absorbiert bei 420 ( $\epsilon = 4000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und 725 nm ( $\epsilon =$

1800 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).<sup>[50, 147, 154, 155]</sup> Eine ähnliche Zwischenstufe mit  $\lambda_{\max} = 700$  nm ( $\varepsilon = 2500$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) wurde 1999 auch für das Enzym aus *M. trichosporium* OB3b berichtet,<sup>[156]</sup> obwohl die Intensität der Absorptionsbande bei 420 nm dort niedriger sein könnte.<sup>[157]</sup> Das Mößbauer-Spektrum von MMOH<sub>peroxy</sub> besteht aus einem scharfen Quadrupol-Dublett mit  $\delta = 0.66$  mm s<sup>-1</sup> und  $\Delta E_Q = 1.51$  mm s<sup>-1</sup>, was mit zwei High-Spin-Eisen(III)-Zentren mit ähnlichen Koordinationsgeometrien in Einklang ist.<sup>[50, 154]</sup> Antiferromagnetische Kopplung zwischen den beiden Fe<sup>III</sup>-Ionen macht MMOH<sub>peroxy</sub> bei 4 K diamagnetisch. Zwischenstufen mit ähnlichen UV/Vis- und Mößbauer-spektroskopischen Eigenschaften wurden auch in anderen O<sub>2</sub>-aktivierenden Dieisen-Proteinen nachgewiesen, z. B. in Stearyl-ACP-Δ<sup>9</sup>-Desaturase, in der D84E-Mutante des R2-Proteins von Klasse-I-Ribonucleotid-Reduktase und in Frosch-Ferritin.

Bislang wurden keine zuverlässigen Resonanz-Raman-Daten für MMOH<sub>peroxy</sub> erhalten,<sup>[155, 158]</sup> obwohl alle anderen Peroxo-Zwischenstufen auf diese Art als  $\mu$ -1,2-Peroxodieisen(III)-Komplexe identifiziert werden konnten. In Tabelle 3 sind die spektroskopischen Eigenschaften dieser Spezies denen eines strukturell charakterisierten  $\mu$ -Peroxodieisen(III)-Modellkomplexes gegenübergestellt. Dieses synthetische Dieisen(III)-Modell mit Vis- und Mößbauer-Eigenschaften sehr ähnlich denen von MMOH<sub>peroxy</sub> wurde strukturell charakterisiert und enthält eine *cis*- $\mu$ -1,2-Peroxogruppe.<sup>[159]</sup> Die Peroxo-Zwischenstufe von Frosch-M-Ferritin ist bisher als einzige mit EXAFS-Spektroskopie charakterisiert worden.<sup>[160]</sup> Ein im Vergleich zum synthetischen Modellkomplex (4.004 Å)<sup>[159]</sup> überraschend kurzer Fe-Fe-Abstand von 2.53 Å legt das Vorliegen von zwei einatomigen Brücken zusätzlich zur  $\mu$ -1,2-Peroxobrücke nahe. Allerdings muss die Struktur der Ferritin-Peroxozwischenstufe nicht unbedingt Ähnlichkeit mit den Peroxo-Zwischenstufen anderer Dieisen-Proteine aufweisen. Ferritin ist das einzige in Tabelle 3 aufgeführte Protein, das nicht an der Oxidation organischer Substrate beteiligt ist. Ferner weist seine Peroxo-Zwischenstufe geringfügig niedrigere Werte für  $\lambda_{\max}$  (650 nm),  $\Delta E_Q$  (1.08 mm s<sup>-1</sup>) und die O-O-Streckschwingung (851 cm<sup>-1</sup>) auf als die anderer Dieisen-Proteine.

Zunächst wurden die Ergebnisse von zeitabhängigen optischen und Mößbauer-Studien im Sinne eines Modells interpretiert, bei dem eine einzige Peroxo-Zwischenstufe direkt aus MMOH<sub>red</sub> und O<sub>2</sub> gebildet wird, doch neuere optische Stopped-Flow-Studien an den Enzymen sowohl aus *M. capsulatus* (Bath) als auch aus *M. trichosporium* OB3b weisen auf

die Bildung einer oder mehrerer Spezies vor MMOH<sub>peroxy</sub> hin. Die Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeiten von MMOH<sub>peroxy</sub> aus letztgenanntem Organismus sind pH-abhängig; und zwar sind beide höher bei niedrigem pH-Wert.<sup>[156]</sup> Für beide Reaktionen wurde derselbe  $pK_a$ -Wert von 7.6 ermittelt. Die Bildung von MMOH<sub>peroxy</sub> ist signifikant langsamer als die Abnahme des ESR-Signals von MMOH<sub>red</sub> bei  $g = 16$ . Das Verschwinden des Signals bei  $g = 16$  ist zudem unabhängig vom pH-Wert. Beide Beobachtungen können mit einer Zwischenstufe erklärt werden, die weder ein ESR-Signal bei  $g = 16$  noch die optischen Eigenschaften von MMOH<sub>peroxy</sub> aufweist. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein Modell mit einer Zwischenstufe zwischen MMOH<sub>red</sub> und MMOH<sub>peroxy</sub> (P\* genannt) die Absorptionsänderungen insbesondere zu Beginn der Messung besser beschreibt.<sup>[157]</sup> Die Geschwindigkeit der Bildung von P\* entspricht der durch ESR-Spektroskopie ermittelten Zerfallsgeschwindigkeit von MMOH<sub>red</sub> und seine Abbaugeschwindigkeit der Bildungsgeschwindigkeit von MMOH<sub>peroxy</sub>. Kürzlich durchgeführte optische Stopped-Flow-Studien mit MMOH aus *M. capsulatus* (Bath) haben für MMOH<sub>peroxy</sub> eine Bildungsgeschwindigkeit von nur 1–2 s<sup>-1</sup> bei 4 °C ergeben.<sup>[147]</sup> Dieser Wert ist kleiner als der ursprünglich publizierte von 25 s<sup>-1</sup>. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls als Beleg für das Vorhandensein einer Zwischenstufe vor MMOH<sub>peroxy</sub> interpretiert. Bei dieser Zwischenstufe könnte es sich um eine andere Peroxo-Spezies oder einen Superoxo-Komplex handeln. Anders als beim Enzym aus *M. trichosporium* OB3b sind Bildung und Zerfall von MMOH<sub>peroxy</sub> beim Enzym aus *M. capsulatus* (Bath) unabhängig vom pH-Wert.<sup>[50]</sup>

Ein anderer Ansatz, um die Natur der frühen Schritte bei der Aktivierung von Disauerstoff aufzuklären, ist die Messung des kinetischen Isotopeneffekts (KIE) von Sauerstoff bei der MMO-Katalyse. Für das Enzym aus *M. capsulatus* (Bath) erhielt man sowohl mit als auch ohne Substrat (Acetonitril) einen KIE von 1.016 ( $v/K(^{16}\text{O}^{16}\text{O})/v/K(^{18}\text{O}^{16}\text{O})$ ,  $v$  = Geschwindigkeit,  $K$  = Michaelis-Konstante).<sup>[153]</sup> Ein solcher Wert deutet auf eine signifikante Abnahme der O-O-Bindungsordnung bis zum ersten irreversiblen Schritt der Aktivierung von Disauerstoff hin und spricht somit gegen die Bildung eines festen, irreversiblen MMOH<sub>red</sub>-O<sub>2</sub>-Komplexes. Er ist jedoch in Einklang mit einer Einelektronen-Reduktion von O<sub>2</sub> zum Superoxidion als erstem irreversiblen Schritt, andere Möglichkeiten können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Auch bei einigen anderen Sauerstoff-aktivierenden

Tabelle 3. Spektroskopische Eigenschaften peroxyoverbrückter Dieisen(III)-Zentren in Proteinen und in einem Modellkomplex.

	Vis		Resonanz-Raman		Mößbauer (4.2 K)	
	$\lambda_{\max}$ [nm]	$\varepsilon$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	O-O [cm <sup>-1</sup> ]	Fe-O [cm <sup>-1</sup> ]	$\delta$ [mm s <sup>-1</sup> ]	$\Delta E_Q$ [mm s <sup>-1</sup> ]
MMO ( <i>M. caps.</i> )	700	1800 <sup>[147]</sup>	–	–	0.66	1.51 <sup>[50, 154]</sup>
MMO ( <i>M. trich.</i> )	725	2500 <sup>[156]</sup>	–	–	0.67	1.51 <sup>[95]</sup>
R2-D84E	700	1500 <sup>[225]</sup>	890 <sup>[39]</sup>	–	0.63	1.58 <sup>[225]</sup>
R2-D84E/W48F <sup>[226]</sup>	700	–	870	458	–	–
Δ <sup>9</sup> -Desaturase	700	1200 <sup>[227, 228]</sup>	898	442 <sup>[227]</sup>	0.68	1.90
					0.64	1.06 <sup>[228]</sup>
Frosch-M-Ferritin	650 <sup>[229]</sup>	–	851	485(s) 499(as) <sup>[230]</sup>	0.62	1.08 <sup>[229]</sup>
<i>cis</i> - $\mu$ -1,2-Peroxo-Fe <sub>2</sub> <sup>III</sup>	694	2650 <sup>[159]</sup>	888 <sup>[159]</sup>	–	0.66	1.40 <sup>[159]</sup>

Metalloenzyme ist die Bildung eines Superoxids als erster irreversibler Schritt in der reduktiven Aktivierung von Disauerstoff vorgeschlagen worden.<sup>[161, 162]</sup>

Die meisten synthetischen Peroxo-Modellkomplexe sind nur bei niedrigen Temperaturen stabil und zerfallen häufig direkt zu Dieisen(II)-Verbindungen.<sup>[1, 163–165]</sup> Im Gegensatz dazu ermöglicht die Proteinmatrix um das Dieisen-Zentrum in MMOH die Umwandlung von MMOH<sub>peroxy</sub> in eine hochvalente Oxo-Zwischenstufe namens MMOH<sub>O</sub>. Wegen der intensiv gelben Farbe von MMOH<sub>O</sub> ( $\epsilon_{350\text{ nm}} = 3600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{420\text{ nm}} = 7200\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) können Bildung und Zerfall einfach mit Stopped-Flow-Spektroskopie verfolgt werden.<sup>[50, 145–147, 154, 157]</sup> Ist kein Substrat zugegen, zerfällt MMOH<sub>O</sub> langsam (ca. 0.05 s<sup>-1</sup>) zu MMOH<sub>ox</sub>. Während der Zerfall von MMOH<sub>peroxy</sub> von den meisten Substraten nicht beeinflusst wird (siehe Abschnitt 4 für eine wichtige Ausnahme), steigt die Abbaugeschwindigkeit von MMOH<sub>O</sub> in Gegenwart von Kohlenwasserstoffsubstraten an.<sup>[50, 145, 147, 157]</sup> Diese Beobachtung identifiziert MMOH<sub>O</sub> als die aktive Sauerstoff-Zwischenstufe, die mit Methan und anderen Substraten reagiert.

Für Methan und die meisten anderen Substrate hängt die Zerfallsgeschwindigkeit von MMOH<sub>O</sub> linear von der Substratkonzentration ab. Dies deutet darauf hin, dass die Substrate nicht fest an das aktive Zentrum gebunden sind.<sup>[50, 145, 147, 157]</sup> Die Eyring-Auftragung für den Zerfall von MMOH<sub>O</sub> in Gegenwart von Methan ist linear für das Enzym aus *M. capsulatus* (Bath), während für das Enzym aus *M. trichosporium* OB3b kürzlich ein nichtlineares Verhalten berichtet wurde. Interessanterweise wurde letzteres Ergebnis mithilfe eines zweistufigen Modells für den Zerfall von MMOH<sub>O</sub> interpretiert, in dem sich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt vom Aufbrechen der C-H-Bindung bei niedrigen Temperaturen zur Anlagerung von Substrat bei hohen Temperaturen ändert.<sup>[157]</sup> Für die Reaktion von MMOH<sub>O</sub> mit Methan und anderen Kohlenwasserstoff-Substraten wurden keine Zwischenstufen ermittelt. Nur im Fall von Nitrobenzol wurde die Bildung eines diskreten Produktkomplexes spektroskopisch nachgewiesen.<sup>[50, 145]</sup> Bei diesem Substrat kann das Freisetzen von Produkt aus dem hydrophoben aktiven Zentrum aufgrund des eindeutigen Farbunterschieds zwischen dem protonierten *p*-Nitrophenol im hydrophoben aktiven Zentrum und dem deprotonierten *p*-Nitrophenolat-Ion in der Lösung beobachtet werden. Die somit zugängliche Geschwindigkeit der Freisetzung des Produkts ähnelt der Umsatzgeschwindigkeit aus Messungen im Fließgleichgewicht (steady state), was damit in Einklang ist, dass die Produktfreisetzung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Oxygenierung von Nitrobenzol ist.

Die Charakterisierung von MMOH<sub>O</sub> durch Rapid-Freeze-Quench(RFQ)-Mößbauer-Spektroskopie ergab, dass die Isomerieverreibungen beider Eisenatome signifikant kleiner sind, als typischerweise bei Dieisen(II)-Komplexen gefunden wird, und eher mit dem Vorliegen einer Dieisen(IV)-Spezies in Einklang sind.<sup>[50, 146]</sup> Das für das Enzym aus *M. trichosporium* OB3b beobachtete scharfe Quadrupol-Dublett ( $\delta = 0.17\text{ mm s}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 0.53\text{ mm s}^{-1}$ ) deutet darauf hin, dass beide Eisenatome ähnliche Umgebungen haben, wohingegen im Falle des Enzyms aus *M. capsulatus* (Bath) zwei leicht unter-

schiedliche Umgebungen beobachtet wurden (Fe1:  $\delta = 0.21\text{ mm s}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 0.68\text{ mm s}^{-1}$ ; Fe2:  $\delta = 0.14\text{ mm s}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 0.55\text{ mm s}^{-1}$ ). Das Fehlen einer Aufspaltung dieser Quadrupol-Dubletts bei hohem Magnetfeld stützt die Formulierung von MMOH<sub>O</sub> als Dieisen(IV)-Cluster mit diamagnetischem Grundzustand als Folge einer antiferromagnetischen Kopplung zwischen den Eisenatomen.

Wichtige Strukturinformationen konnten auch aus Analysen von EXAFS-Spektren von RFQ-Proben mit einem hohen Anteil (40–60 %) an MMOH<sub>O</sub> erhalten werden.<sup>[195]</sup> Man ermittelte einen äußerst kurzen Fe-Fe-Abstand von 2.46 Å sowie eine kurze (1.77 Å) und eine lange (2.0 Å) Fe-O-Bindung. Der kurze Fe-Fe-Abstand deutet stark auf das Vorliegen von mindestens zwei Sauerstoffbrücken hin. Um den gegenüber Modellkomplexen mit ähnlicher Struktur kurzen Fe-Fe-Abstand in MMOH<sub>O</sub> erklären zu können, wurde eine zusätzliche Verbrückung durch einen Carboxylatrest vorgeschlagen. Eine EXAFS-Analyse des Enzyms aus *M. capsulatus* (Bath) stützt das Vorliegen eines kurzen Fe-Fe-Abstands in MMOH<sub>O</sub>.<sup>[166]</sup>

Eine wichtige mechanistische Frage ist, ob die O-O-Bindung in MMOH<sub>peroxy</sub> bei der Bildung von MMOH<sub>O</sub> homolytisch oder heterolytisch gespalten wird. In Abbildung 12 sind zwei Möglichkeiten für die Umwandlung von

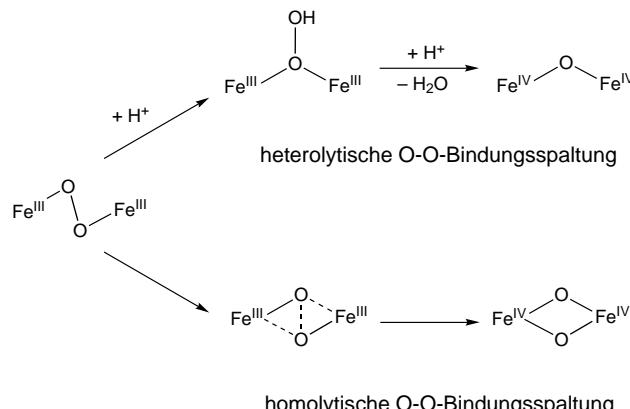


Abbildung 12. Gegenüberstellung der heterolytischen und der homolytischen O-O-Bindungsspaltung bei der Umwandlung von MMOH<sub>peroxy</sub> in MMOH<sub>O</sub>.

MMOH<sub>peroxy</sub> in MMOH<sub>O</sub> dargestellt. Beim heterolytischen Prozess könnte ein einähnlicher Peroxo-Komplex gebildet werden, in dem eines der Sauerstoffatome protoniert vorliegt. Die Anlagerung eines weiteren Protons an dieses Sauerstoffatom würde die heterolytische Spaltung der O-O-Bindung und die Bildung eines hochvalenten Dieisenkomplexes erleichtern, in dem eines der aus O<sub>2</sub> stammenden Sauerstoffatome eine Oxobrücke bildete, während das andere im Form von Wasser freigesetzt würde. Dieser Mechanismus entspricht dem für P450-Monooxygenasen und Häm enthaltende Peroxidasen vorgeschlagenen, bei denen die Protonierung eines Hydroperoxo-eisen(III)-Komplexes ebenfalls eine heterolytische O-O-Bindungsspaltung und die Freisetzung von Wasser induziert. Die Oxidationsstufe der intermediären Verbindung Fe<sup>IV</sup>=O(P<sup>+</sup>) (Verbindung I, mit P = Porphyrin), von der man annimmt, dass sie in diesem Schritt gebildet wird, entspricht

der in  $\text{MMOH}_\text{O}$ . In den Häm enthaltenden Enzymen werden die Oxidationsäquivalente sowohl auf dem Eisen als auch im Porphyrinring gespeichert, wohingegen dieselbe Oxidationsstufe in MMO durch die Oxidation von zwei Eisenatomen auf die Stufe +4 erreicht wird. Die für das Enzym aus *M. trichosporium* OB3b beobachtete pH-Abhängigkeit von Bildung und Zerfall von  $\text{MMOH}_{\text{peroxo}}$  ist in Einklang mit einem solchen Mechanismus.<sup>[156]</sup> Die in derselben Studie beschriebenen Protoneninventuren implizieren die Übertragung jeweils eines Protons in den Übergangszuständen beider Reaktionen. Ferner ist die Entropieänderung bei der Bildung von  $\text{MMOH}_\text{O}$  positiv, was mit dem Freisetzen von Wasser erklärt werden könnte.<sup>[50, 147]</sup>

Ein völlig anderer Mechanismus ist die homolytische Spaltung der O-O-Bindung unter Bildung einer Bis( $\mu$ -oxo)-dieisen(IV)-Verbindung. Man nimmt an, dass etwa die Spaltung der O-O-Bindung durch Dikupfer-Zentren über einen solchen Mechanismus abläuft.<sup>[167–169]</sup> In diesem Fall würden beide aus  $\text{O}_2$  stammenden Sauerstoffatome zu verbrückenden Oxidliganden des Dieisen-Zentrums, und die Abspaltung des Wassers erfolgte irgendwann nach dem Abbau von  $\text{MMOH}_\text{O}$ .

Eine Entscheidung zugunsten einer dieser beiden mechanistischen Möglichkeiten würde von einem detaillierteren Wissen über die Struktur von  $\text{MMOH}_\text{O}$  profitieren. Nach den EXAFS-Spektren liegen mindestens zwei Einzelatom-Brücken vor, doch kann nicht zwischen einer Struktur mit zwei Oxobrücken und einer mit einer Oxobrücke und einem oder mehreren einzeln verbrückenden, zu Glutamatresten gehörenden Sauerstoffatomen unterschieden werden. Erstere ließe sich am einfachsten mit einer homolytischen Spaltung der O-O-Bindung in  $\text{MMOH}_{\text{peroxo}}$  erklären, letztere würde auf eine heterolytische Spaltung der O-O-Bindung hinweisen. Das EXAFS-Spektrum von  $\text{MMOH}_\text{O}$  ähnelt auffallend stark demjenigen der Zwischenstufe X, einer hochvalenten Zwischenstufe in der Reaktion des Dieisen(II)-haltigen R2-Proteins der Ribonucleotid-Reduktase mit  $\text{O}_2$ .<sup>[170]</sup> Wie  $\text{MMOH}_\text{O}$  weist auch die Zwischenstufe X einen kurzen Fe-Fe-Abstand von 2.5 Å auf und enthält somit mindestens zwei Einzelatom-Brücken. Im Unterschied zu  $\text{MMOH}_\text{O}$  lässt sich die Zwischenstufe X jedoch am besten als  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{IV}}$ -Verbindung beschreiben.<sup>[171]</sup> Eine antiferromagnetische Kopplung zwischen  $\text{Fe}^{\text{III}}$  und  $\text{Fe}^{\text{IV}}$  führt bei der Zwischenstufe X zu einem Grundzustand mit einem Spin von  $S=1/2$ , was eine gründliche Charakterisierung der Struktur mittels ESR- und ENDOR-Spektroskopie ermöglichte.<sup>[172]</sup> Experimente mit  $^{17}\text{O}_2$  und  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  ergaben, dass eines der Sauerstoffatome des  $\text{O}_2$ -Moleküls eine Oxobrücke bildet, während das andere zu einem terminalen Aqualiganden an  $\text{Fe}^{\text{III}}$  wird.<sup>[172, 173]</sup> Dieses Ergebnis wiederum deutet darauf hin, dass eine der Einatom-Brücken in der Zwischenstufe X von einem Carboxylatliganden stammt.

Um die Beziehung zwischen den Strukturen von Zwischenstufe X und  $\text{MMOH}_\text{O}$  weiter zu untersuchen, haben wir kürzlich eine radiolytische Reduktion bei 77 K durchgeführt. Diese führte zu einer Einelektronen-reduzierten Form von  $\text{MMOH}_\text{O}$  (namens  $\text{MMOH}_{\text{Q}_\text{X}}$ ). Wegen der niedrigen Entstehungstemperatur sollte man davon ausgehen können, dass  $\text{MMOH}_{\text{Q}_\text{X}}$  die Struktur von  $\text{MMOH}_\text{O}$  beibehält.<sup>[174]</sup> Die Mößbauer-Parameter von  $\text{MMOH}_{\text{Q}_\text{X}}$  ähneln in bemerkens-

werter Weise denen der Zwischenstufe X:  $\text{Fe1: } \delta = 0.48 \text{ mm s}^{-1}$ ,  $\Delta E_\text{Q} = -0.9 \text{ mm s}^{-1}$ ;  $\text{Fe2: } \delta = 0.14 \text{ mm s}^{-1}$ ,  $\Delta E_\text{Q} = -0.6 \text{ mm s}^{-1}$ .<sup>[171]</sup> ESR/ENDOR-Studien mit  $^{17}\text{O}_2$  und  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  an  $\text{MMOH}_{\text{Q}_\text{X}}$  ähnlich den mit Zwischenstufe X durchgeföhrten könnten dazu beitragen, eine Unterscheidung zwischen den Mechanismen der heterolytischen und der homolytischen O-O-Bindungsspaltung zu treffen. Solche Studien werden durch die Gegenwart von intensiven ESR-Signalen erschwert, die auf freie Radikale zurückzuführen sind, welche durch die für die radiolytische Reduktion verwendeten hochenergetischen  $\gamma$ -Strahlen entstehen.

Seit kurzem wird von mehreren Arbeitsgruppen die Dichtefunktionaltheorie (DFT) zur Berechnung des Katalysezyklus von MMO genutzt.<sup>[175–184]</sup> DFT-Rechnungen können Einblicke in sinnvolle Strukturen für die spektroskopisch ermittelten Sauerstoff-Zwischenstufen geben sowie Verbindungen vorschlagen, die bislang nicht entdeckt worden sind. Außerdem bieten sie sich geradezu als Werkzeug zur Untersuchung der Reaktionen zwischen  $\text{MMOH}_\text{O}$  und Substraten an (siehe Abschnitt 4). MMO ist für die Durchführung von DFT-Rechnungen besonders geeignet, weil ein Großteil der hier wichtigen Chemie der Disauerstoff-Aktivierung und Substrat-Oxygenierung am Dieisen-Zentrum stattfindet. Es ist daher denkbar, dass bereits Modelle mit einer relativ kleinen Zahl an Atomen in der Lage sind, das aktive Zentrum zufriedenstellend zu beschreiben.

Die bisher umfangreichste DFT-Studie nutzte ein Modell aus annähernd 100 Atomen.<sup>[182]</sup> Dieses relativ große Modell war nötig, damit die Rechnungen die durch Röntgenstrukturanalyse bekannten Strukturen von  $\text{MMOH}_\text{ox}$  und  $\text{MMOH}_\text{red}$  verlässlich reproduzierten. Abbildung 13 zeigt eine auf dieser Arbeit beruhende „DFT-Ansicht“ des Katalysezyklus von MMO. Bei den dargestellten Strukturen der Zwischenstufen  $\text{MMOH}_{\text{superoxo}}$ ,  $\text{MMOH}_{\text{peroxo}}$  und  $\text{MMOH}_\text{O}$  handelt es sich jeweils um diejenigen mit der geringsten Energie. Ein bemerkenswertes Ergebnis dieser Rechnungen ist der Vorschlag, dass ein koordinierendes Wassermolekül während des gesamten Katalysezyklus endständig an  $\text{Fe1}$  gebunden vorliegt. Der Superoxo- und der Peroxo-Komplex haben ähnliche Energien. Die asymmetrische Struktur von  $\text{MMOH}_{\text{peroxo}}$  ist in Anbetracht des scharfen Quadrupol-Dubletts im Mößbauer-Spektrum dieser Zwischenstufe ein wenig überraschend. Eine neue DFT-Untersuchung mit einem kleineren Modell von 40 Atomen weist auf eine geringfügig stabilere, nichtplanare (schmetterlingsförmige), symmetrische  $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -Peroxostruktur als Alternative zu der in Abbildung 13 dargestellten Struktur von  $\text{MMOH}_{\text{peroxo}}$  hin (siehe auch unten).<sup>[184]</sup>

Die DFT-Struktur von  $\text{MMOH}_\text{O}$ , inklusive des kurzen Fe-Fe-Abstands von 2.67 Å und eines antiferromagnetisch gekoppelten Spinzustands, ist im Großen und Ganzen in Einklang mit den spektroskopischen Daten, nur dass im Widerspruch zu den Ergebnissen der EXAFS-Studie, die auf das Vorliegen einer kurzen (1.77 Å) und einer langen (2.0 Å) Fe-O-Bindung hinweisen, eher symmetrisch verbrückende Oxo-gruppen resultierten, wie man den Fe-O-Abständen von 1.76 und 1.81 Å entnehmen kann. Die neue DFT-Studie mit dem kleineren Satz von 40 Atomen bestätigte, dass die  $\text{MMOH}_\text{O}$ -Struktur mit einem verbrückenden Carboxylatrest und einem

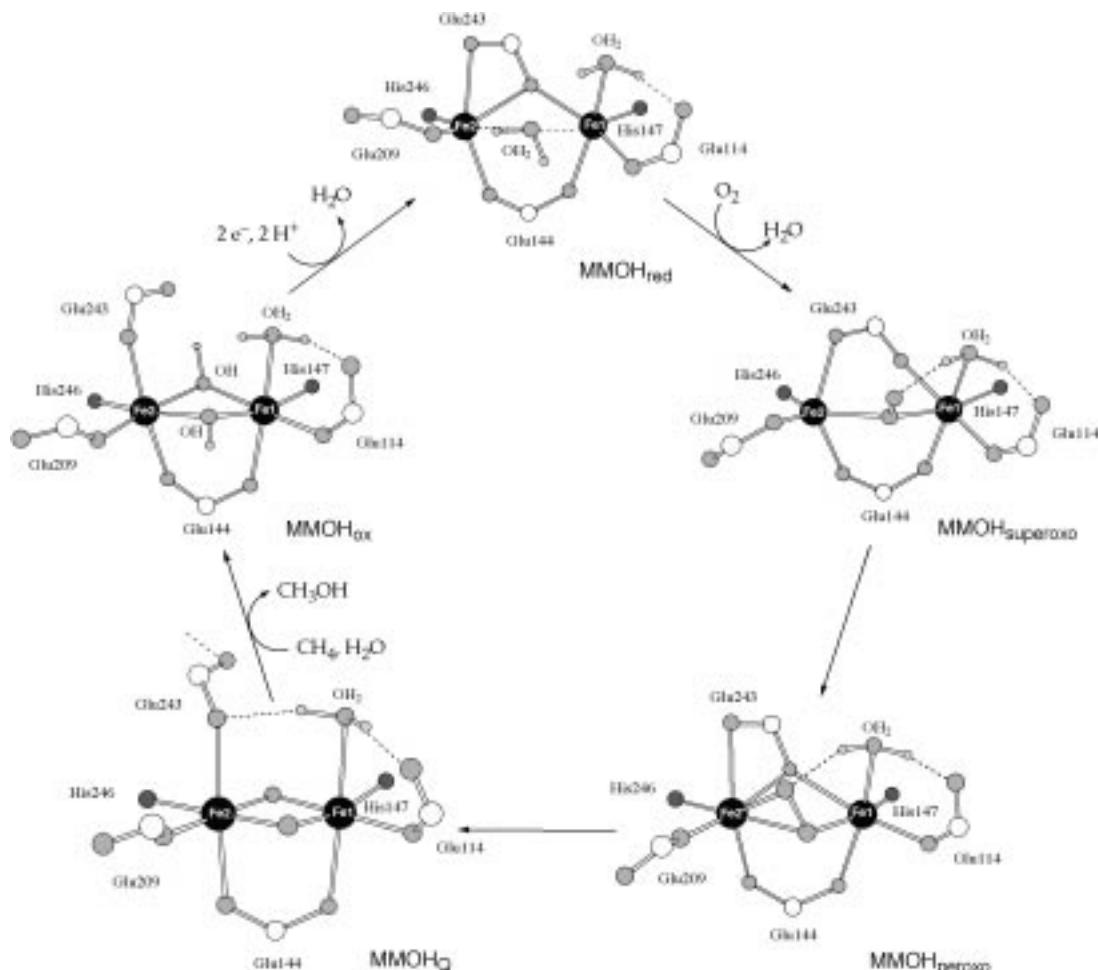


Abbildung 13. Eine aus DFT-Rechnungen stammende Beschreibung des Katalysecyclus von MMO. Man beachte, dass die Positionen von Fe1 und Fe2 im Vergleich zu den anderen Abbildungen in diesem Beitrag ausgetauscht sind, um einen besseren Blick auf die Reaktion zur Aktivierung von Disauerstoff zu haben. Genehmigte Abbildung in Anlehnung an Lit. [182].

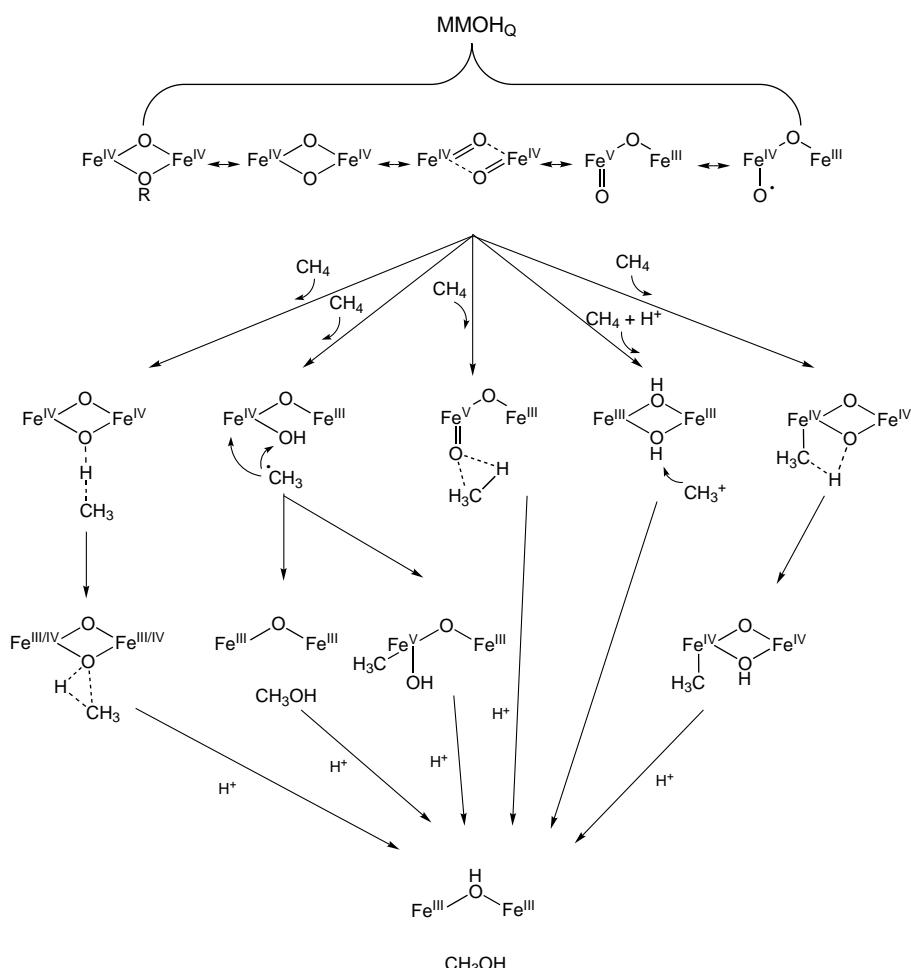
direkt an eines der Eisenatome koordinierenden Wassermolekül signifikant stabiler ist als die in früheren DFT-Rechnungen gefundenen Strukturen mit zwei verbrückenden Carboxylatresten.<sup>[184]</sup> In derselben Studie wurde auch der Mechanismus der O-O-Bindungsspaltung bei der Umwandlung von  $\text{MMOH}_{\text{peroxo}}$  in  $\text{MMOH}_\text{O}$  untersucht. Dabei wurde eine homolytische Spaltung ausgehend von einer nichtplanaren  $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -Struktur von  $\text{MMOH}_{\text{peroxo}}$  vorgeschlagen. Nur eines der Eisenatome wurde als aktiv an der Spaltungsreaktion beteiligt einbezogen. DFT-Rechnungen auf der Basis des Modells aus 100 Atomen bestätigen die Existenz dieser  $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -Peroxostruktur beim Übergang von  $\text{MMOH}_{\text{peroxo}}$  zu  $\text{MMOH}_\text{O}$ .<sup>[185]</sup> Weitere DFT-Rechnungen werden nötig sein, um die Natur dieses sowie weiterer Schritte bei der Aktivierung von Disauerstoff besser verstehen zu können.

#### 4. Mechanismus der Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffen

Die im vorigen Abschnitt beschriebenen spektroskopischen Studien an kurzlebigen Zwischenstufen haben wichtige Einblicke in das Wesen der während der Aktivierung von Disauerstoff intermediär gebildeten Verbindungen geliefert

und zur Identifizierung von  $\text{MMOH}_\text{O}$  als derjenigen Zwischenstufe geführt, die mit Methan und anderen Kohlenwasserstoffen reagiert. Die nächste Frage ist nun, wie  $\text{MMOH}_\text{O}$  Substratmoleküle hydroxyliert. Da mit spektroskopischen Stopped-Flow-Methoden für diesen Schritt keine Zwischenstufen beobachtet werden konnten, sind indirektere Methoden zur Anwendung gekommen. Substratsonden haben dazu beigetragen, die chemischen Eigenschaften der Schritte während der Hydroxylierung zu beschreiben, und theoretische Studien kamen zur Untersuchung mechanistischer Details zum Einsatz.

Zu den Vorschlägen für den Mechanismus der Hydroxylierung der C-H-Bindung sind bereits ausführliche Übersichten erschienen.<sup>[1, 3, 5, 186–192]</sup> Die in Abbildung 14 dargestellten Möglichkeiten illustrieren einige der diesbezüglich wichtigen Fragen: Wie sieht die Struktur von  $\text{MMOH}_\text{O}$  aus, in der es mit Methan reagiert? Lässt sich die reaktive Verbindung am besten als ein Bis( $\mu$ -oxo)dieisen(IV) beschreiben, wie aufgrund von EXAFS-Studien vorgeschlagen, oder als  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{V}}(=\text{O})$ -Verbindung? Sind die Eisenatome koordinativ gesättigt oder liegen sie fünffach koordiniert vor und erlauben somit die Bildung von Fe-C-Bindungen? Sind (kurzlebige) Substratradikale beteiligt, in einem Mechanismus ähnlich dem häufig genannten Sauerstoff-Wiederanlage-



rungsmechanismus (oxygen-rebound mechanism), der für Cytochrome-P450-Monoxygenasen vorgeschlagen wurde? Oder lässt sich die Hydroxylierung besser als konzertierte Reaktion beschreiben, in der ein aktiviertes Sauerstoffatom direkt in die C-H-Bindung eingefügt wird? Die meisten experimentellen Herangehensweisen, die zwischen diesen mechanistischen Vorschlägen unterscheiden können, beruhen auf der Verwendung von Reportersubstraten. Hierbei handelt es sich um Moleküle, die in Abhängigkeit von der Art der Reaktion zu unterschiedlichen Produkten reagieren. MMO reagiert mit einer Vielzahl unterschiedlicher Substrate, sodass viele verschiedene Substanzen in solchen Untersuchungen verwendet werden konnten. Eine Methode besteht darin, durch Isotopenmarkierung chiraliserte Alkan-Substrate zu untersuchen. Konzertierte Reaktionsschritte würden entweder vollständige Retention oder vollständige Inversion der Konfiguration des hydroxylierten Kohlenstoffatoms zur Folge haben, wohingegen die Bildung radikalischer oder kationischer Zwischenstufen in einer Racemisierung resultieren sollte. Die Hydroxylierung von (R)- und von (S)-[1-<sup>2</sup>H,1-<sup>3</sup>H]Ethan läuft sowohl mit dem Enzym aus *M. capsulatus* (Bath) als auch mit dem aus *M. trichosporium* OB3b hauptsächlich (64–74 %) unter Retention ab.<sup>[186, 193]</sup> Für die

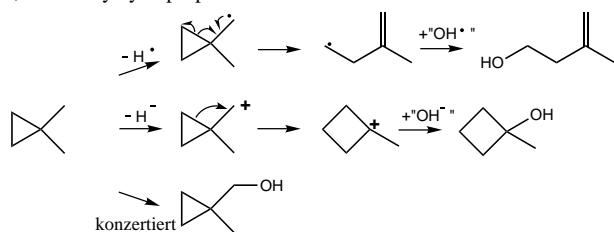
[2-<sup>3</sup>H]Butane findet man einen Wert von rund 90 % Retention.<sup>[193]</sup> Ursprünglich wurde die Detektion eines messbaren Anteils an Racemisierung als Beweis für eine radikalische Zwischenstufe angesehen.<sup>[186]</sup>

Wir wiesen jedoch darauf hin, dass eine 70-proz. Retention einer Geschwindigkeitskonstanten für die Wiederanlagerung des angenommenen Ethylradikals von  $1 \times 10^{13} \text{ s}^{-1}$  entsprechen würde.<sup>[193]</sup> Eine derart hohe Geschwindigkeit ist unvereinbar mit der alleinigen Bildung einer diskreten radikalischen Zwischenstufe.

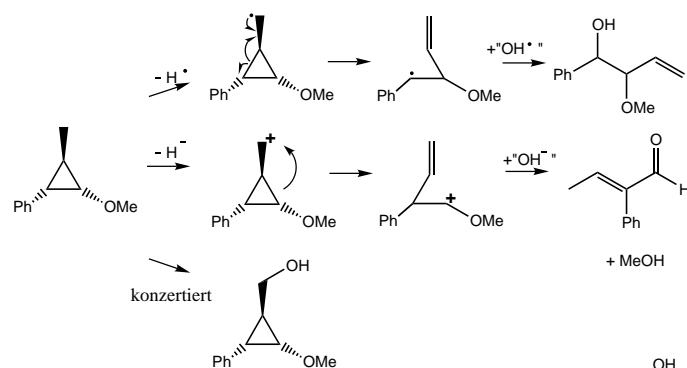
Sehr viel Arbeit wurde auch in die Verwendung von Radikaluhren als Substraten investiert.<sup>[194–196]</sup> In diesen Verbindungen lagert sich nach Abspaltung eines Wasserstoffatoms das Kohlenstoffgerüst um. Da die Geschwindigkeitskonstanten solcher Umlagerungen bekannt sind, erlaubt die Analyse der Produktverhältnisse der MMO-katalysierten Hydroxylierung die Berechnung der Lebensdauer einer jeden radikalischen Substratspezies. Die große Mehrheit der Radikaluhren, mit denen das Enzym aus *M. capsulatus* (Bath) untersucht wurde, reagiert ausschließlich zu nicht umgelagerten Produkten, was gegen das Auftreten diskreter radikalischer Verbindungen während der MMO-Katalyse spricht.<sup>[197, 198]</sup> Auch die meisten einer Reihe von auf Cyclopropan basierenden Radikaluhren, die mit dem Enzym aus *M. trichosporium* OB3b untersucht wurden, führten nicht zu umgelagerten Produkten.<sup>[199]</sup> Solche Ergebnisse legen als obere Grenze der Lebensdauer einer radikalischen Verbindung 150 fs fest; zu kurz, um die Bildung einer diskreten radikalischen Zwischenstufe zu erklären.

Für vier Substrate jedoch, die allesamt zwischen radikalischen und kationischen Umlagerungen unterscheiden können, wurden umgelagerte Produkte gefunden.<sup>[199–203]</sup> Die drei am ausführlichsten untersuchten Fälle sind in Abbildung 15 dargestellt. Die Oxidation von 1,1-Dimethylcyclopropan führt hauptsächlich zum nicht umgelagerten Produkt (1-Methylcyclopropyl)methanol; daneben wurden jedoch auch geringe Anteile des radikalischen Umlagerungsprodukts 3-Methyl-3-butien-1-ol (6 %) und des kationisch umgelagerten Produkts 1-Methylcyclobutanol (13 %) gebildet.<sup>[200]</sup> Ähnliche Ergebnisse erhielt man mit (trans,trans-2-Methoxy-3-phenylcyclopropyl)methan als Substrat,<sup>[202]</sup> und das Produkt einer kationischen Umlagerung, 1-Homocubanol, wurde als Hauptprodukt der Oxygenierung von Methylcuban ermittelt.<sup>[201–203]</sup> Eine alternative Methode zur Überprüfung, ob radikalische Zwischenstufen auftreten, ist die Verwendung von Spinfallen.

## A) 1,1-Dimethylcyclopropan



## B) (trans,trans-2-Methoxy-3-phenylcyclopropyl)methan



## C) Methylcuban

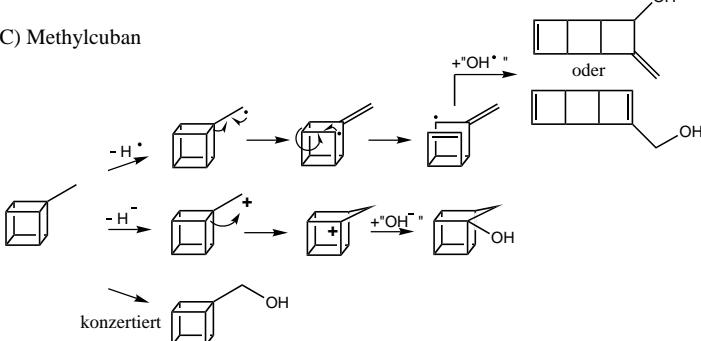


Abbildung 15. Drei Substrate, die in Abhängigkeit von der Art der Hydroxylierungsreaktion (radikalische oder kationische Zwischenstufe oder konzertiert) unterschiedlich reagieren. Für alle drei Substrate wurden Produkte nach mehr als einem Reaktionstyp nachgewiesen.

Die Fließgleichgewichtsoxidation von Methan, Methanol und Acetonitril in Gegenwart solcher Spinfallen und eine anschließende ESR-spektroskopische Analyse hat die Bildung von Addukten mit Substratradikalen aufgezeigt.<sup>[204, 205]</sup> Es ist jedoch schwierig abzuschätzen, ob diese Verbindungen auf der untergeordneten Bildung einiger Radikale beruhen oder ob sie mit echten katalytischen Zwischenstufen entstanden.

Studien des kinetischen  $^1\text{H}/^2\text{H}$ -Isotopeneffekts liefern Informationen über den Übergangszustand der C-H-Bindungsspaltung. Große kinetische Isotopeneffekte sind mit einer linearen O-H-C-Anordnung und einer bereits weit fortgeschrittenen Spaltung der C-H-Bindung im Übergangszustand in Zusammenhang gebracht worden.<sup>[206, 207]</sup> Zur Untersuchung kinetischer Isotopeneffekte mit dem MMO-Enzym aus *M. trichosporium* OB3b wurde die Reihe  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{D}$ ,  $\text{CH}_2\text{D}_2$ ,  $\text{CHD}_3$  und  $\text{CD}_4$  verwendet. Sowohl die Geschwindigkeit des Zerfalls von  $\text{MMOH}_\text{Q}$  als auch die Produktverhältnisse sind analysiert worden.<sup>[208]</sup> Ein überraschend großer Isotopeneffekt von 50–100 wurde für den  $\text{MMOH}_\text{Q}$ -Zerfall bei Verwendung von  $\text{CH}_4/\text{CD}_4$  gefunden, wohingegen mit

demselben Substratpaar ein signifikant kleinerer, aber dennoch großer Wert von 28 für das Enzym aus *M. capsulatus* (Bath) berichtet wurde.<sup>[147]</sup> Bei größeren Substraten ( $\text{C}_2\text{H}_6/\text{C}_2\text{D}_6$  und  $\text{C}_3\text{H}_8/\text{C}_3\text{D}_8$ ) konnten für den Zerfall von  $\text{MMOH}_\text{Q}$  aus *M. trichosporium* OB3b jedoch keine kinetischen Isotopeneffekte festgestellt werden. Dies wurde damit erklärt, dass bei diesen Substraten statt der Spaltung der C-H-Bindung ein Schritt in der Substratanlagerung für den  $\text{MMOH}_\text{Q}$ -Zerfall geschwindigkeitsbestimmend ist.<sup>[157]</sup> Im Fall des Enzyms aus *M. capsulatus* (Bath) wurde für Ethan ein ähnliches Fehlen eines kinetischen Isotopeneffekts beobachtet.<sup>[209]</sup>

Die aus den Produktverhältnissen ermittelten intramolekularen kinetischen Isotopeneffekte für Methan waren kleiner und vom jeweiligen Methanisotopomer abhängig (19.3 für  $\text{CH}_4/\text{CD}_4$ , aber nur 3.9 für den intramolekularen Effekt in  $\text{CD}_3\text{H}$ ). Experimente mit chiralem Ethan ergaben intramolekulare Isotopeneffekte in der Größenordnung von 3–4.<sup>[186, 193]</sup> Zum Vergleich: Für die P450-Hydroxylierung wurden  $k_\text{H}/k_\text{D}$ -Werte von 7–10 ermittelt.<sup>[34]</sup> Die Reaktion von  $\text{CD}_4$  mit  $^{18}\text{O}_2$  ergibt zu 100 %  $\text{CD}_3^{18}\text{OH}$  und zeigt somit, dass kein Austausch von Sauerstoffatomen oder Methylwasserstoffatomen mit dem Lösungsmittel stattfindet.<sup>[208]</sup> Als wahrscheinlichster Grund für den großen Isotopeneffekt beim Zerfall von  $\text{MMOH}_\text{Q}$  wurde das Tunneln von Wasserstoff vorgeschlagen. Die widersprüchlichen KIE-Werte deuten auf einen komplexen Mechanismus des Zerfalls von  $\text{MMOH}_\text{Q}$  und/oder auf die Oxidation von Substrat auf anderen Wegen als durch den Zerfall von  $\text{MMOH}_\text{Q}$  hin.

Mehrere theoretische Arbeiten wurden dem Mechanismus der Hydroxylierungsreaktion gewidmet, die meisten davon nutzten DFT-Methoden (siehe auch Abschnitt 3). Zunächst wurde ein einfaches Modell für  $\text{MMOH}_\text{Q}$  verwendet, das aus einem Bis( $\mu$ -oxo)dieisen(IV)-Zentrum mit einem verbrückenden Formiat- sowie endständigen Hydroxo- und Wasserliganden bestand.<sup>[210]</sup> In diesem Modell, bei dem alle Donoratome Sauerstoffatome sind, sind die Eisenatome in der stabilsten Konfiguration fünffach koordiniert.  $\text{MMOH}_\text{Q}$  abstrahiert ein Wasserstoffatom von Methan und reagiert zu einer  $\text{Fe}^{\text{III}}(\mu\text{-O})(\mu\text{-OH})\text{Fe}^{\text{IV}}$ -Verbindung mit einer Eisen-kordinierenden Methylgruppe, wobei allerdings der exakte Ausgang der Reaktion vom Spinzustand abhängt, den man dem ursprünglichen Eisenkomplex zuordnet. Eine spätere Arbeit mit einem größeren Modell, einem Bis( $\mu$ -oxo)dieisen(IV) mit zwei verbrückenden Formiatliganden, zwei endständigen Formiat- und zwei Imidazolliganden, favorisiert ebenfalls die Abspaltung eines Wasserstoffatoms als Weg für die Aktivierung von Methan.<sup>[177]</sup> Versuche, einen zu einem anderen Mechanismus gehörenden Übergangszustand zu finden, schlugen fehl. Mit einem ähnlichen Modell für  $\text{MMOH}_\text{Q}$  wurde ein weiteres Mal ein Beleg für die Abspaltung eines Wasserstoffatoms durch eine Dieisen(IV)-Verbindung erbracht.<sup>[176]</sup> Das resultierende Methylradikal wechselwirkt schwach mit den Eisenatomen, womit man die scheinbar kurze Lebensdauer radikalischer Zwischenstufen erklären könnte, die sich aus den Studien mit Radikaluhren und denen mit chiralem Ethan ergab. Es sollte jedoch beachtet werden, dass im letztgenannten Modell das Methan sich dem Dieisen-Zentrum aus einer Richtung nähert, die im aktiven Zentrum des Proteins nicht zugänglich ist.

Auf der Grundlage eines einfachen Modells für  $\text{MMOH}_\text{O}$ , in dem es koordinativ ungesättigt ist (ein durch einen verbrückenden Formiatliganden zusammengehaltenes Bis( $\mu$ -oxo)dieisen(IV)-Zentrum mit einem Hydroxidliganden an dem einen und zwei Hydroxidliganden an dem anderen Eisenatom), wurde ein zweistufiger, konzertierter Mechanismus vorgeschlagen.<sup>[179, 181, 211, 212]</sup> Dieser Dieisen-Komplex bildet zunächst einen Komplex mit Methan, welcher durch Abspaltung des Wasserstoffatoms über einen Vierzentren-Übergangszustand zu einer Zwischenstufe mit einem verbrückenden Hydroxidliganden und einer an Eisen gebundenen Methylgruppe reagiert. Der Methylrest wandert dann unter Bildung einer C-O-Bindung mit dem verbrückenden Hydroxidliganden und ergibt so einen Methanolkomplex.

Erst kürzlich wurden DFT-Rechnungen mit dem Ziel durchgeführt, die Mechanismen der Aktivierung von sowohl Sauerstoff als auch Methan durch sMMO zu verstehen.<sup>[182–184]</sup> Dabei wurde ein viel größeres Modell für das aktive Zentrum als in den früheren Untersuchungen verwendet, und es wurden die Strukturen von  $\text{MMOH}_\text{peroxy}$ ,  $\text{MMOH}_\text{O}$  und möglichen  $\text{MMOH}_\text{superoxo}$ -Zwischenstufen vorhergesagt (siehe Abschnitt 3). Das in dieser Studie verwendete Modell für  $\text{MMOH}_\text{O}$  enthält ein Bis( $\mu$ -oxo)dieisen(IV)-Zentrum, unterscheidet sich von anderen Modellen aber dadurch, dass das an Fe1 gebundene Wassermolekül nicht von Glu243 verdrängt wird (siehe Abbildung 13). Die den zwei Histidinliganden gegenüberliegende Position, die zur hydrophoben Bindungstasche für das Substrat weist, war die einzige, die für die Annäherung von Methan an das Dieisen-Zentrum in Frage kam. Der energetisch einzig vernünftige Reaktionsverlauf war eine frontale Annäherung des Methanmoleküls an das verbrückende Sauerstoffatom (Abbildung 16). Die für diese Reaktion berechnete Aktivierungsenergie beträgt  $13.2 \text{ kcal mol}^{-1}$  und stimmt somit akzeptabel mit dem experimentell ermittelten Wert von  $9–12 \text{ kcal mol}^{-1}$  überein.<sup>[50, 147, 157, 209]</sup> In diesem Übergangszustand bildet ein Methanwasserstoffatom eine Brücke zwischen den Kohlenstoff- und dem verbrückenden Sauerstoffatom (Abbildung 16). Interessanterweise wurden ausgehend von diesem Startpunkt zwei Reaktionswege identifiziert.

Auf dem einen Weg werden eine O-H-Bindung und damit ein ( $\mu$ -Hydroxo)dieisen-Zentrum sowie ein Methylradikal gebildet (①). Damit sich das Methylradikal wieder anlagern kann, muss sich die O-H-Gruppe drehen und einen Winkel von  $93^\circ$  zur C-O-Achse einnehmen. Laut den Berechnungen dauert dieser Prozess  $5–10 \text{ ps}$ . Diese Zeit reicht für die vollständige Racemisierung eines in Lösung befindlichen Ethylradikals aus. DFT-Rechnungen haben jedoch gezeigt, dass im aktiven Zentrum eine sterische Wechselwirkung zwischen der  $\text{CH}_2$ -Gruppe und der neu gebildeten O-H-Bindung die Rotation um die C-C-Bindung signifikant verzögern kann.<sup>[213]</sup>

Der zweite Weg ist ein zweistufiger, konzertierter Weg, der ausgehend vom Übergangszustand mit einer vernachlässigbar geringen Energiebarriere zu Methanol führt (②). In diesem Mechanismus verkürzt sich zunächst die O-H-Bindung auf  $0.97 \text{ \AA}$ , ohne dass dabei die partielle Bindung zum Methankohlenstoffatom gespalten wird. Als nächstes rotiert das

Wasserstoffatom so, dass es einen Winkel von  $80–90^\circ$  mit der C-O-Achse bildet, während sich das Kohlenstoffatom in entgegengesetzter Richtung auf das Sauerstoffatom hin dreht. Dieser gesamte Prozess hat eine Reaktionsbarriere von nur  $1 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

Das Vorhandensein zweier Reaktionskanäle mit vergleichbaren Aktivierungsenergien kann die mit chiralem Ethan beobachtete partielle Retention der Konfiguration erklären.<sup>[213]</sup> Produkte, die sich aus dem Kanal mit einem wiederangelagerten Radikal ableiten, sind teilweise racemisiert, während bei solchen aus dem konzertierten Kanal die Konfiguration erhalten bleibt. Die Aufteilung zwischen den beiden Reaktionskanälen entspricht quantitativ den Ergebnissen mit chiralem Ethan und sollte substratabhängig sein. Größere Radikaluhren als Substrate reagieren bevorzugt nach dem konzertierten Mechanismus, weil es für sie schwieriger ist, nach Erreichen des Übergangszustands ihre Molekülbewegung so zu ändern, dass ein isoliertes Radikal entsteht. Eine zweite Studie mit einem kleineren Satz aus 40 Atomen weist ebenfalls auf das Vorhandensein von zwei verschiedenen, vom Substrat abhängigen Reaktionspfaden nach der anfänglichen Abspaltung eines Wasserstoffatoms hin.<sup>[184]</sup> Berechnungen mit Methylcyclopropan und Ethan haben ergeben, dass beide Moleküle direkt nach der Abspaltung des Wasserstoffatoms ein Carbokation bilden. Die Aktivierungsenergie für die abschließende Wiederanlagerung dieses Carbokations unter Bildung eines hydroxylierten Produkts ist gering. Man könnte die Reaktion sogar als asynchron konzertiert bezeichnen. Es bleibt zu klären, wie wichtig der Reaktionsweg über die Wiederanlagerung eines Radikals für Methan ist, aber die Tatsache, dass Methylradikale mit Spinfallen nachgewiesen werden konnten, deutet darauf hin, dass zumindest ein Teil der Oxidation von Methan auf diesem Weg abläuft.

Ein Vergleich der verschiedenen Berechnungen zeigt, dass der für die Aktivierung von Methan vorhergesagte Mechanismus stark von dem für  $\text{MMOH}_\text{O}$  gewählten Modell und von der Zahl der verwendeten Atome abhängt. Wichtig bei einer Bewertung dieser Modelle ist die Frage, wie gut sie mit experimentellen Ergebnissen in Einklang sind. Das größte DFT-Modell ist nicht nur in der Lage, die kristallographisch ermittelten Strukturen von  $\text{MMOH}_\text{ox}$  und  $\text{MMOH}_\text{red}$  zu reproduzieren, sondern es sagt auch vernünftige Werte für die Aktivierungsenergie vorher und liefert ferner eine Begründung für scheinbar widersprüchliche Ergebnisse mit mechanistischen Substratsonden.

Substrate können mit  $\text{MMOH}_\text{O}$  nicht nur auf unterschiedliche Art und Weise reagieren; es ist auch möglich, dass verschiedene Substrate mit unterschiedlichen Sauerstoff-Zwischenstufen reagieren oder dass ein bestimmtes Substrat mit unterschiedlichen Sauerstoff-Zwischenstufen über verschiedene Mechanismen reagiert. Im Fall des Enzyms aus *M. capsulatus* (Bath) besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Zerfallsgeschwindigkeit von  $\text{MMOH}_\text{peroxy}$  und der Konzentration von Propen, was darauf hindeutet, dass dieses Substrat direkt mit  $\text{MMOH}_\text{peroxy}$  reagiert.<sup>[147]</sup> In einer Untersuchung mit dem Enzym aus *M. trichosporium* OB3b ließ sich kein Beweis für eine Reaktion von  $\text{MMOH}_\text{peroxy}$  mit Propen finden, allerdings war die in dieser Studie verwendete Pro-

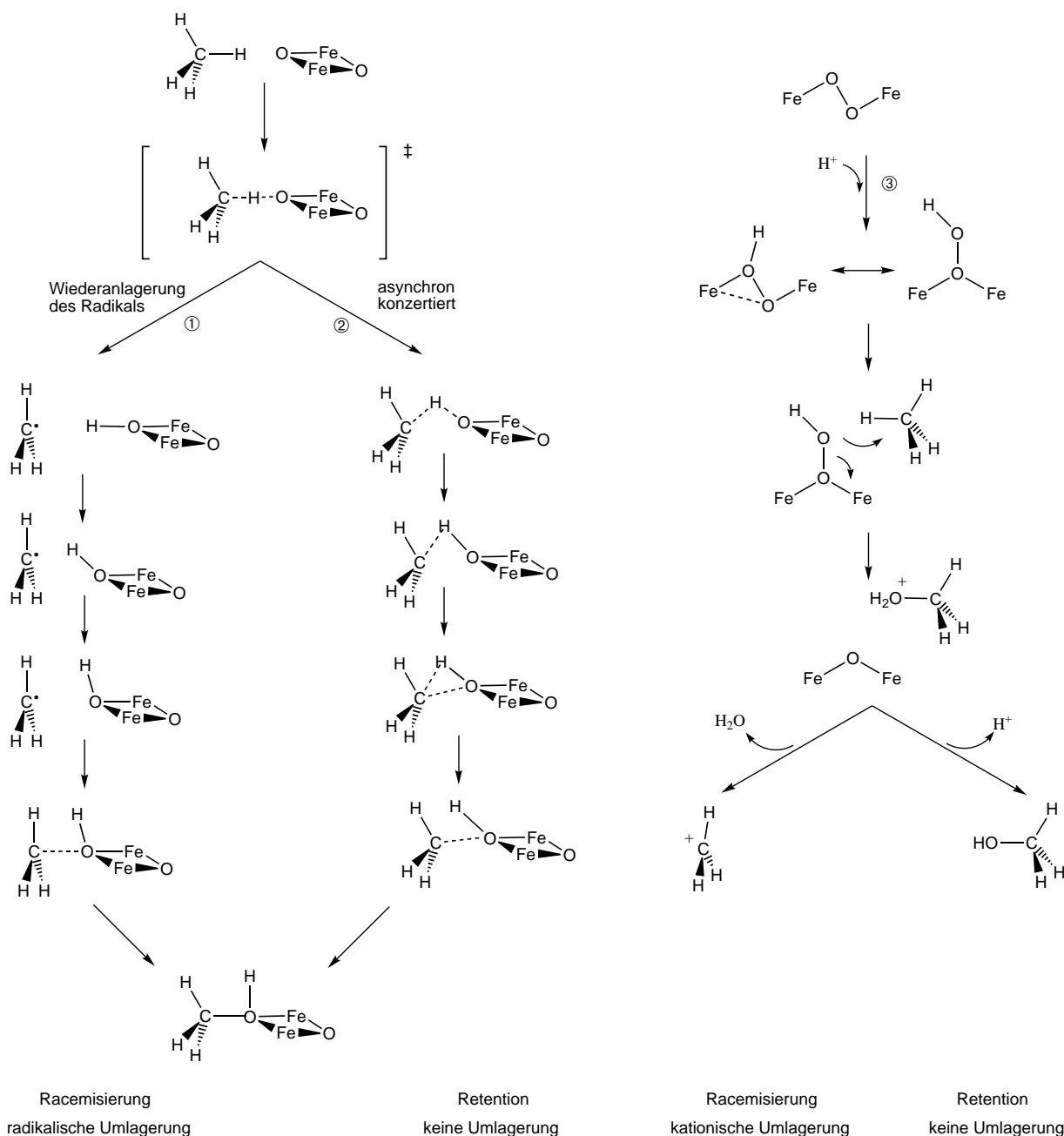


Abbildung 16. Modelle für den Mechanismus der Hydroxylierung durch MMO. Mechanismus ①, der über die Wiederanlagerung eines Radikals verläuft, sowie der zweistufige, konzertierte Mechanismus ② sind die durch kürzlich durchgeföhrte DFT-Rechnungen gestützten Mechanismen.<sup>[183,213]</sup> Ferner wird basierend auf der verwandten Chemie von Cytochrom P450 ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem  $\text{MMOH}_{\text{peroxy}}$  an Epoxidierung und Hydroxylierung beteiligt ist (③). Der für jeden Mechanismus vorhergesagte Ausgang von Experimenten mit mechanistischen Substratsonden ist ebenfalls angegeben (1. Zeile: zu erwartende Stereochemie; 2. Zeile: mechanistische Sonde).

penkonzentration möglicherweise zu gering, als dass ihr Einfluss auf die Zerfallsgeschwindigkeit von  $\text{MMOH}_{\text{peroxy}}$  hätte beobachtet werden können.<sup>[157]</sup> Ein weiterer Hinweis auf die Oxidation von Propen durch  $\text{MMOH}_{\text{peroxy}}$  ergibt sich aus der Beobachtung, dass die Epoxidierung von Propen selbst bei hohen Verhältnissen von MMOR:MMOH immer streng an den Verbrauch von NADH gekoppelt bleibt, wohingegen mit Methan bei  $\text{MMOR:MMOH} > 0.2$  eine Entkopplung vom NADH-Verbrauch beobachtet wird.<sup>[27]</sup> Die Entkopplung geschieht wahrscheinlich dann, wenn MMOR entweder  $\text{MMOH}_\text{O}$  oder  $\text{MMOH}_{\text{peroxy}}$  zusätzliche

Elektronen zur Verfügung stellt und diese zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{MMOH}_\text{ox}$  reagieren. Propen reagiert mit  $\text{MMOH}_{\text{peroxy}}$  und kann daher mit der Oxidasereaktion konkurrieren, wohingegen Methan, das ausschließlich mit  $\text{MMOH}_\text{O}$  reagiert,<sup>[147]</sup> hierzu nicht in der Lage ist.

Neuere Studien an Cytochrom P450 haben ebenfalls Hinweise auf das Vorhandensein von mehr als einer aktiven Sauerstoff-Zwischenstufe erbracht.<sup>[214-218]</sup> Der Anteil an Epoxidierung von Cyclohexen und 2-Buten stieg auf Kosten ihrer Hydroxylierung in den Mutanten, in denen der für die Bildung der hochvalenten  $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ -Verbindung verantwortliche

che Protonentransfer-Weg unterbrochen ist. Die Eisen(III)-hydroperoxid-Zwischenstufe, die in diesen Mutanten immer noch gebildet wird, kann Alkene epoxidieren, ist aber in Hydroxylierungsreaktionen, die hauptsächlich über die hochvalente Zwischenstufe ablaufen, weniger aktiv. Es ist argumentiert worden, dass das Eisen(III)-hydroperoxid  $\text{OH}^+$  in die Substrate einfügt.<sup>[217, 219]</sup> Das Einfügen von  $\text{OH}^+$  in eine C-H-Bindung liefert eine C– $\text{OH}_2^+$ -Einheit, die zu einem Alkohol deprotoniert oder zu einem Carbokation, wie es mit diversen Substratsonden nachgewiesen wurde, solvolyisiert werden kann. In Einklang mit dieser Hypothese ist die Beobachtung, dass P450-Mutanten ohne die Fähigkeit, Verbindung I zu bilden, eine höhere Ausbeute an von Carbokationen abgeleiteten Umlagerungsprodukten aufweisen. Eine Erklärung für die bei MMO manchmal beobachteten von Carbokationen abgeleiteten Produkte ist somit, dass sie aus der Reaktion mit einem vor der Entstehung von  $\text{MMOH}_\text{O}$  intermediär gebildeten, protonierten Peroxid resultieren (③ in Abbildung 16).<sup>[50, 145, 147]</sup>

## 5. Regulierung der Katalyse durch Wechselwirkung zwischen den Enzymkomponenten

Die drei Proteinkomponenten, aus denen die lösliche Methan-Monooxygenase besteht, dirigieren eine Reihe von Reaktionen beim Elektronentransfer und bei der Aktivierung von Sauerstoff, deren Ergebnis eine effiziente und nachhaltige Umwandlung von Methan und Disauerstoff in Methanol und Wasser ist. Die dynamischen Wechselwirkungen zwischen MMOH, MMOB und MMOR sind komplexer Natur, und sie sind noch immer nicht vollständig verstanden. In diesem Abschnitt untersuchen wir die verschiedenen Rollen der Wechselwirkungen zwischen den Komponenten innerhalb der MMO-Katalyse und diskutieren das Wissen um die räumlichen und zeitlichen Beziehungen zwischen ihnen.

Ein frühes und wichtiges Zeichen für die Komplexität der Komponentenwechselwirkungen war der Befund, dass die Geschwindigkeitskonstanten der Hydroxylierung im Fließgleichgewicht mit steigender Konzentration an MMOB bis zu einem Maximum bei  $\text{MMOB:MMOH} = 2:1$  ansteigen, bei höheren Verhältnissen von MMOB:MMOH jedoch wieder abnehmen.<sup>[27, 44, 50]</sup> Kürzlich wurden zahlreiche Aspekte der Komponentenwechselwirkungen für das Enzym aus *M. capsulatus* (Bath) mit einer Kombination aus kinetischen, kalorimetrischen und spektroskopischen Methoden untersucht.<sup>[27]</sup> Die Geschwindigkeitskonstante der durch MMOR katalysierten Reduktion von  $\text{O}_2$  durch NADH zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist relativ klein, wenn andere MMO-Bestandteile fehlen. Bei Zugabe von MMOH oder von MMOH und MMOB steigt die Oxidaseaktivität an, die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  hört jedoch auf, und  $\text{O}_2$  wird wahrscheinlich vollständig zu Wasser reduziert. In Gegenwart von Methan sind die Oxidation von NADH und der  $\text{O}_2$ -Verbrauch bei  $\text{MMOR:MMOH} < 0.2$  vollständig an die Substrathydroxylierung gekoppelt, wohingegen höhere Konzentrationen an MMOR zu einem Verlust an Reduktionsäquivalenten in Form von Oxidaseaktivität führen. Die Hydroxylase- und Oxidaseaktivitäten im Fließgleichgewicht bei verschiedenen Verhältnissen von MMOB:MMOH und

MMOR:MMOH lassen sich am besten mit einem Modell beschreiben, in dem MMOB und MMOR nichtkonkurrend an verschiedene Positionen von MMOH binden, und zwar jeweils mit einer 2:1-Stöchiometrie.<sup>[27]</sup> Aus diesem Modell ergeben sich  $K_\text{d}$ -Werte für die Anlagerung von MMOB und MMOR in einer Größenordnung von 0.1 bis 1  $\mu\text{m}$ , was gut mit den mittels isothermer Titrationskalorimetrie bestimmten  $K_\text{d}$ -Werten übereinstimmt. Informationen über die Kinetik der Anlagerung von MMOB und MMOR an MMOH wurden mithilfe der Stopped-Flow-Fluoreszenzspektroskopie erhalten. Die Anlagerung von MMOB und MMOR vollzieht sich in zwei Schritten, und zwar einer schnellen, vorgelagerten Gleichgewichtsphase gefolgt von einem viel langsameren Isomerisierungsgleichgewicht. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziation der vorgelagerten Gleichgewichte von MMOH mit MMOR ( $60\text{ s}^{-1}$  bei  $45^\circ\text{C}$ ) und MMOB ( $26\text{ s}^{-1}$  bei  $45^\circ\text{C}$ ) sind signifikant größer als die Geschwindigkeitskonstante für die Umsetzung mit MMO im Fließgleichgewicht.

Zwischen den Enzymen aus *M. capsulatus* (Bath) und *M. trichosporium* OB3b scheinen mehrere wichtige Unterschiede hinsichtlich der Wechselwirkungen zwischen den Bestandteilen zu bestehen. Nach Untersuchungen an dem Enzym aus *M. trichosporium* OB3b mittels Fluoreszenztitration entsteht ein fester MMOB-MMOR-Komplex ( $K_\text{d} = 0.4\ \mu\text{m}$ ),<sup>[44]</sup> wohingegen im Fall des Enzyms aus *M. capsulatus* (Bath) weder Fluoreszenzspektroskopie noch isotherme Titrationskalorimetrie irgendeinen Beleg für die Bildung eines Komplexes zwischen MMOB und MMOR erbracht haben.<sup>[27]</sup> Kinetische Fließgleichgewichtsdaten für das Enzym aus *M. trichosporium* OB3b wurden mit einem Modell interpretiert, in dem MMOB und MMOR bei höheren MMOB:MMOH-Verhältnissen um die Bindungsstellen auf MMOH konkurrieren,<sup>[44]</sup> im Fall des Enzyms aus *M. capsulatus* (Bath) hingegen wurde ein Modell ohne konkurrierendes Binden bevorzugt.<sup>[27]</sup> Es ist wichtig, nicht zu vergessen, dass *M. trichosporium* OB3b und *M. capsulatus* (Bath) zu evolutionär verschiedenen Bakterienklassen gehören, obwohl beide methanotrophe Bakterien sind. Möglicherweise äußern sich die Unterschiede zwischen den beiden sMMO-Systemen am stärksten in den Wechselwirkungen ihrer Bestandteile.

MMOB und MMOR beeinflussen nicht nur die Geschwindigkeit und Effektivität der Katalyse durch MMOH, sie legen auch die Regioselektivität der Hydroxylierung fest.<sup>[46, 50]</sup> Eine Studie mit dem Enzym aus *M. trichosporium* OB3b hat unterschiedliche Produktverteilungen für die Oxygenierung von Isopentan durch drei verschiedene zur Oxygenierung fähige Systeme ergeben: I: MMOH, MMOR, NADH und  $\text{O}_2$ ; II: MMOH und  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; III:  $\text{MMOH}_\text{red}$  und  $\text{O}_2$  (einfacher Umsatz).<sup>[46]</sup> Bereits die Zugabe von 0.1 Moläquiv. MMOB veränderte die Produktverteilung der Systeme I und III zu einem gemeinsamen Ergebnis, doch die Maximalgeschwindigkeiten wurden erst bei 1.5–2.0 MMOB pro MMOH erreicht. Im Gegensatz hierzu wurde das mit Wasserstoffperoxid arbeitende System II bei einem MMOB:MMOH-Verhältnis von 1:1 vollständig durch MMOB inhibiert. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die von Wasserstoffperoxid unterhaltene Hydroxylierung durch MMOH aus *M. capsulatus* (Bath) beschrieben.<sup>[220]</sup>

Es gibt viele Beispiele für den Einfluss von Komponentenwechselwirkungen auf spezifische Katalysegeschritte. So erhöht MMOB die Geschwindigkeit des Elektronentransfers zwischen MMOR und MMOH<sup>[27]</sup> und beeinflusst die Kinetik der Aktivierung von Disauerstoff dergestalt, dass in seiner Gegenwart zahlreiche Zwischenstufen beobachtet werden können, während dies bei der Reaktion von MMOH<sub>red</sub> allein mit O<sub>2</sub> nicht möglich ist. Die Reaktion von MMOH<sub>red</sub> mit O<sub>2</sub> ist in Gegenwart von MMOB hundert Mal schneller.<sup>[49]</sup> Der Einfluss unterschiedlicher Verhältnisse von MMOB:MMOH auf die Kinetiken von Bildung und Abbau von MMOH<sub>Q</sub> wurde so interpretiert, dass MMOB die Bildungsgeschwindigkeit sowohl von MMOH<sub>peroxo</sub> als auch von MMOH<sub>Q</sub> erhöht, während der Abbau von MMOH<sub>Q</sub> relativ unbeeinflusst bleibt.<sup>[49]</sup> Auch Mutationen diverser Aminosäuren von MMOB wirken sich auf einige der kinetischen Schritte aus. So setzt eine Substitution des konservierten His33-Rests durch Alanin die Bildungsgeschwindigkeit von MMOH<sub>peroxo</sub> um mehr als das Fünfzigfache herab. Ein vierfacher Mutant (N107G/S109A/S110A/T111A) hat keine Auswirkungen auf die Bildungsgeschwindigkeiten von MMOH<sub>peroxo</sub> und MMOH<sub>Q</sub>, führt aber zu einem drei Mal so schnellen Zerfall von MMOH<sub>Q</sub> in Gegenwart größerer Substrate wie Furan.<sup>[22]</sup> Untersuchungen am Enzym aus *M. trichosporium* OB3b haben außerdem Hinweise darauf ergeben, dass 1.0 oder 0.1 Äquiv. MMOR die O<sub>2</sub>-induzierte Zerfallsgeschwindigkeit von MMOH<sub>red</sub> im MMOH:MMOB-Komplex von 22 auf 1.2 s<sup>-1</sup> herabsetzen.<sup>[120]</sup> Die Geschwindigkeit der MMOH<sub>Q</sub>-Bildung steigt in Gegenwart von 0.1 Äquiv. MMOR jedoch an, was darauf hinausläuft, dass bereits in Gegenwart geringster Mengen Reduktase die Bildung von MMOH<sub>peroxo</sub> nicht mehr beobachtet wird.<sup>[120]</sup>

Die sowohl bei einfachem Umsatz als auch in der Fließgleichgewichtskatalyse beobachteten starken Einflüsse von MMOB und MMOR implizieren, dass die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Bestandteilen einen Einfluss auf das aktive Dieisen-Zentrum haben. Beide Bestandteile beeinflussen die Redoxpotentiale  $E_1^{\text{o}}$  und  $E_2^{\text{o}}$  von MMOH.<sup>[2, 45, 48, 96, 120, 222]</sup> Die Anlagerung von MMOB setzt das Potential für beide Gleichgewichte gleichartig und stark herab, was bedeutet, dass MMOB stärker an MMOH<sub>ox</sub> als an MMOH<sub>red</sub> bindet. Die Anlagerung von MMOB und MMOR dagegen führt zu einem scharfen Anstieg beider Potentiale mit der Folge, dass der Zweielektronentransfer zum bevorzugten Prozess wird (*M. capsulatus* (Bath):  $E_2^{\text{o}} > E_1^{\text{o}} \approx 100$  mV; *M. trichosporium* OB3b:  $E_1^{\text{o}} = 76$  mV,  $E_2^{\text{o}} = 125$  mV, alle Potentiale relativ zur Normalwasserstoffelektrode).

Ein spektroskopischer Beleg für strukturelle Änderungen innerhalb des Dieisen-Zentrums konnte nur für die Anlagerung von MMOB erhalten werden. Die Anlagerung von MMOR hat keinen Einfluss auf die spektroskopischen Eigenschaften des Dieisen-Zentrums. Die Anlagerung von MMOB hat nur einen geringen Einfluss auf die EXAFS-Spektren.<sup>[93]</sup> Nach MCD-Studien an MMOH<sub>red</sub> stört MMOB vermutlich die Koordinationsgeometrie des in der Kristallstruktur Fe2 genannten Eisenatoms (siehe Abschnitt 2).<sup>[108–110]</sup> Die Anlagerung von MMOB konnte ESR-spektroskopisch für alle drei Oxidationsstufen von MMOH nachgewiesen werden.<sup>[44, 46, 98, 100]</sup> Bei der Titration von MMOH<sub>mv</sub> mit

MMOB war das Spektrum nach Zugabe von 1.7 MMOB pro MMOH vollständig in das des MMOH:MMOB-Komplexes überführt, was eine Stöchiometrie von 1:2 andeutet. Überraschenderweise werden nur 0.6 Moläquiv. MMOB benötigt, um für MMOH<sub>red</sub> denselben Effekt zu erreichen.<sup>[46]</sup> Dies ist ein weiteres Beispiel für einen bei substöchiometrischen Verhältnissen maximalen Komponenteneinfluss. Weitere Illustrationen desselben Phänomens sind der Einfluss von MMOB auf die Regioselektivität der Substrathydroxylierung und die Einflüsse von MMOR sowohl auf das Redoxpotential von MMOH als auch auf die Geschwindigkeit der Oxidation von MMOH<sub>red</sub> durch O<sub>2</sub>.<sup>[46, 120]</sup> All diese Einflüsse sind Indizien für eine Hysterese, die auftreten könnte, wenn die Anlagerung von beispielsweise MMOR an MMOH<sub>red</sub> und seine Dissoziation schneller ablaufen als die Relaxation von der komplexierten Struktur zur freien Konformation innerhalb von MMOH. Ein einziges MMOB- oder MMOR-Molekül kann somit mehrere Moleküle MMOH bedienen. Das in methanotrophen Bakterien vorgefundene MMOH:MMOB:MMOR-Molverhältnis von 1:1:0.1 weist darauf hin, dass eine solche Hysterese auch in vivo von funktioneller Bedeutung sein könnte.<sup>[24, 51]</sup>

Ein detailliertes Bild von der Struktur der Komplexe von MMOH mit weiteren Bestandteilen ist derzeit nicht verfügbar, weil noch keine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt werden konnte. Durch das Einfügen chemischer Verknüpfungen ließ sich zeigen, dass MMOB und MMOR an die  $\alpha$ -bzw.  $\beta$ -Untereinheit von MMOH binden.<sup>[44]</sup> An sMMO aus *M. capsulatus* (Bath) wurden ferner Kleinwinkelröntgenstreuungsexperimente durchgeführt, um zu ermitteln, ob sich durch die Anlagerung von MMOB oder MMOR an MMOH dessen Konformation signifikant ändert.<sup>[223]</sup> Eine stark verzerrte MMOH-Struktur wurde nur für den Fall ermittelt, dass das eingesetzte Verhältnis MMOH:MMOB:MMOR 1:10:10 betrug. Dieses Verhältnis ist jedoch physiologisch und funktionell unsinnig. Die Zugabe von MMOB oder MMOR, sei es allein oder zusammen in einer 1:2- bzw. 1:2:2-Stöchiometrie, führte nicht zu Verzerrungen der Struktur, die genügend groß waren, um mit dieser Technik beobachtet werden zu können. Das in Abschnitt 2.2 auf der Grundlage von NMR-Experimenten diskutierte Modell des MMOH:MMOB-Komplexes stimmt mit den Röntgenstreuungsexperimenten überein, weil eine Anlagerung von MMOB im Bereich der Schlucht von MMOH dessen im Allgemeinen ellipsoide Form nicht verzerren sollte. Um die strukturelle Grundlage der Komponenteneinflüsse zu entschlüsseln, werden jedoch Röntgenstrukturanalysen der Komponentenkomplexe nötig sein.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Eine Vielzahl an Methoden aus den Disziplinen Mikrobiologie, Enzymologie, Strukturbioologie sowie Anorganische, Physikalische, Organische und Quantenchemie hat zu unserem derzeitigen Verständnis der Katalyse durch das lösliche Methan-Monooxygenase-System beigetragen. Für zwei der drei Proteinbestandteile, MMOH und MMOB, sind hochauflöste Strukturen vorhanden. Strukturinformationen über

das Dieisen-Zentrum in einer Vielzahl von Redoxstufen und Komplexen haben wichtige Einblicke in dessen geometrische Flexibilität gebracht, die es ihm erlaubt, problemlos Oxidationsstufen von  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}$  bis  $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{Fe}^{\text{IV}}$  einzunehmen. Eine einzigartige Eigenschaft von sMMO ist, dass selbst bei der Disauerstoffaktivierung ohne Substrat mehrere Zwischenstufen nacheinander entstehen, bevor sie zerfallen. So konnte ein derzeit noch unvollständiger Film dieser Aktivierung auf molekularer Basis erstellt werden. DFT-Rechnungen haben zu neuen Vorschlägen für die Strukturen der Sauerstoff-Zwischenstufen geführt und Einblicke in die Reaktionen dieser Zwischenstufen mit Substratmolekülen gewährt.

Somit ist die prinzipielle Abfolge der Geschehnisse bei der Disauerstoffaktivierung und der Substrathydroxylierung, insbesondere in Bezug auf die Rolle des Dieisen-Zentrums, nun bekannt, doch andere Aspekte der Katalyse sind noch weit weniger klar. Einer dieser Aspekte ist die Rolle von Aminosäureresten bei der Bildung der Sauerstoff-Zwischenstufen, beim Elektronen- und Protonentransfer sowie bei der Anlagerung an das und dem Zugang zum aktiven Dieisen-Zentrum. Ein rekombinantes MMOH-Expressionssystem mit hoher Ausbeute würde durch die Anwendung zielgerichteter Mutagenese dazu beitragen, diese Fragen zu beantworten. Die kürzlich gemachte Beobachtung, dass in Zellen aus *M. capsulatus* (Bath) ein vierter Proteinbestandteil (OrfY) existiert und mit MMOH wechselwirkt, stellt die wichtige Frage nach dessen Funktion *in vivo*.

Die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten steuern diverse Reaktionen im sMMO-System sehr strikt. Genaue Strukturdaten von MMOR und den Komponentenkomplexen sind jedoch vonnöten, um zu verstehen, wie die Wechselwirkungen zwischen den Bestandteilen die Katalyse regulieren. Welche Strukturänderungen in der Umgebung des aktiven Zentrums von  $\text{MMO}_{\text{red}}$  sind beispielsweise für die Erhöhung der Reaktivität gegenüber Disauerstoff verantwortlich, und wie führt die Anlagerung von MMOB an die Oberfläche von MMOH zu diesen Änderungen? Immer ausgefeilte Programme und schnellere Rechner werden die Anwendung von DFT- und quantenmechanischen Moleküldynamik-Rechnungen mit größeren Modellen für das aktive Zentrum und zur Erforschung verschiedener Aspekte der MMO-Katalyse ermöglichen. Noch genauere Informationen über die Strukturen von  $\text{MMO}_{\text{peroxo}}$ ,  $\text{MMO}_{\text{Q}}$  und möglicherweise noch nicht entdeckten Zwischenstufen sind jedoch wichtig, um wohldefinierte Anfangsstrukturen für diese Berechnungen zu erhalten. Der ultimative Test unseres Verständnisses der MMO-Katalyse wäre das erfolgreiche Design eines synthetischen MMO-Modells, das die Hydroxylierung von Methan ähnlich effizient und spezifisch katalysiert wie das native Enzym.

Diese Arbeit wurde vom National Institute of General Medical Sciences finanziell unterstützt. M.M. ist Stipendiat des Human Frontier Science Program. D.A.K. wird durch einen NIH Biotechnology Training Grant unterstützt. J.L.B. ist Stipendiatin des Howard Hughes Medical Institute, und J.M. ist Feodor-Lynen-Stipendiat.

## 7. Anhang: verwendete Abkürzungen

CD:	Circulardichroismus
CT1:	Charge-Transfer-Komplex 1
CT2:	Charge-Transfer-Komplex 2
DFT:	Dichtefunktionaltheorie
DMSO:	Dimethylsulfoxid
$E^{\circ'}$ :	formales Redoxpotential bei pH 7.0
ENDOR:	Electron–Nuclear Double Resonance
ESR:	Elektronenspinresonanz
ESEEM:	Electron Spin Echo Envelope Modulation
EXAFS:	Extended X-Ray Absorption Fine Structure
FAD:	Flavinadenindinucleotid
Fd:	Ferredoxin
FMN:	Flavinmononucleotid
FNR:	Fd-NADP <sup>+</sup> -Oxidoreduktase
KIE:	kinetischer Isotopeneffekt
MC1:	Michaelis-Komplex 1
MCD:	magnetischer Circulardichroismus
MMO:	Methan-Monomooxygenase
MMOB:	regulatorisches Protein der sMMO
MMOH:	Hydroxylase-Protein der sMMO
MMOH <sub>DMSO</sub> :	Komplex von MMOH mit DMSO
MMOH <sub>mv</sub> :	MMOH in der gemischvalenten (mixed valent, mv) $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ -Oxidationsstufe
MMOH <sub>ox</sub> :	MMOH in der $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ -Oxidationsstufe
MMOH <sub>peroxo</sub> :	Peroxo-Zwischenstufe bei der Aktivierung von Disauerstoff, auch $\text{H}_{\text{peroxo}}$ oder Verbindung P genannt
MMOH <sub>Q</sub> :	hochvalente Zwischenstufe bei der Aktivierung von Disauerstoff, auch Verbindung Q genannt
MMOH <sub>Qx</sub> :	Einelektronen-reduzierte $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{IV}}$ -Form von MMOH <sub>Q</sub> , gebildet durch radiolytische Reduktion bei 77 K
MMOH <sub>red</sub> :	MMOH in der $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}$ -Oxidationsstufe
MMOH <sub>superoxo</sub> :	Superoxo-Zwischenstufe bei der Aktivierung von Disauerstoff
MMOR:	Reduktase-Protein der sMMO
NADH:	Nicotinamidadenin-Dinucleotid, reduzierte Form
NAD <sup>+</sup> :	Nicotinamidadenin-Dinucleotid, oxidierte Form
NADP <sup>+</sup> :	Nicotinamidadenin-Dinucleotidphosphat, oxidierte Form
P2:	regulatorisches Protein der Phenol-Hydroxylase von <i>Pseudomonas</i> sp. CF600
PDR:	Phthalat-Dioxygenasereduktase
pMMO:	unlösliche (particulate) MMO
RFQ:	rapid-freeze quench
sMMO:	lösliche (soluble) MMO
SQ:	Semichinon-Zwischenstufe

Eingegangen am 10. Januar 2001

Ergänzte Fassung am 3. Mai 2001 [A442]

Übersetzt von Dr. Jens Müller, Cambridge

[1] A. L. Feig, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 759–805.

[2] K. E. Liu, S. J. Lippard, *Adv. Inorg. Chem.* **1995**, *42*, 263–289.

- [3] B. J. Wallar, J. D. Lipscomb, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2625–2657.
- [4] A. M. Valentine, S. J. Lippard, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, 3925–3931.
- [5] R. J. Deeth, H. Dalton, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 302–306.
- [6] L. Westerheide, M. Pascaly, B. Krebs, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 235–241.
- [7] R. S. Hanson, T. E. Hanson, *Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 439–471.
- [8] C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, Academic Press, London, **1982**.
- [9] I. J. Higgins, D. J. Best, R. C. Hammond, *Nature* **1980**, *286*, 561–564.
- [10] J. C. Murrell, *Biodegradation* **1994**, *5*, 145–159.
- [11] J. C. Murrell, B. Gilbert, I. R. McDonald, *Arch. Microbiol.* **2000**, *173*, 325–332.
- [12] H.-H. T. Nguyen, M. Zhu, S. J. Elliott, K. H. Nakagawa, B. Hedman, A. M. Costello, T. L. Peebles, B. Wilkinson, H. Morimoto, P. G. Williams, H. G. Floss, M. E. Lidstrom, K. O. Hodgson, S. I. Chan in *Microbial Growth on C<sub>1</sub> Compounds* (Hrsg.: M. E. Lidstrom, F. R. Tabita), Kluwer Academic, Dordrecht, **1996**, S. 150–158.
- [13] H.-H. T. Nguyen, K. H. Nakagawa, B. Hedman, S. J. Elliott, M. E. Lidstrom, K. O. Hodgson, S. I. Chan, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12766–12776.
- [14] H.-H. T. Nguyen, S. J. Elliott, J. H.-K. Yip, S. I. Chan, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 7957–7966.
- [15] M. Takeguchi, K. Miyakawa, I. Okura, *J. Mol. Catal. A* **1998**, *132*, 145–153.
- [16] J. A. Zahn, A. A. DiSpirito, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 1018–1029.
- [17] J. Colby, D. I. Stirling, H. Dalton, *Biochem. J.* **1977**, *165*, 395–402.
- [18] H. Dalton, *Adv. Appl. Microbiol.* **1980**, *26*, 71–87.
- [19] J. Green, H. Dalton, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 17698–17703.
- [20] B. G. Fox, J. G. Borneman, L. P. Wackett, J. D. Lipscomb, *Biochemistry* **1990**, *29*, 6419–6427.
- [21] M. J. Rataj, J. E. Kauth, M. I. Donnelly, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 18684–18690.
- [22] K. K. Andersson, W. A. Froland, S.-K. Lee, J. D. Lipscomb, *New J. Chem.* **1991**, *15*, 411–415.
- [23] J. R. Bragg, R. C. Prince, E. J. Harner, R. M. Atlas, *Nature* **1994**, *368*, 413–418.
- [24] B. G. Fox, W. A. Froland, J. E. Dege, J. D. Lipscomb, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 10023–10033.
- [25] J. Colby, H. Dalton, *Biochem. J.* **1978**, *171*, 461–468.
- [26] M. P. Woodland, H. Dalton, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 53–59.
- [27] G. T. Gassner, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1999**, *38*, 12768–12785.
- [28] A. C. Rosenzweig, C. A. Frederick, S. J. Lippard, P. Nordlund, *Nature* **1993**, *366*, 537–543.
- [29] A. C. Rosenzweig, P. Nordlund, P. M. Takahara, C. A. Frederick, S. J. Lippard, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 409–418.
- [30] N. Elango, R. Radhakrishnan, W. A. Froland, B. J. Wallar, C. A. Earhart, J. D. Lipscomb, D. H. Ohlendorf, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 556–568.
- [31] S.-L. Chang, B. J. Wallar, J. D. Lipscomb, K. H. Mayo, *Biochemistry* **1999**, *38*, 5799–5812.
- [32] K. J. Walters, G. T. Gassner, S. J. Lippard, G. Wagner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7877–7882.
- [33] D. A. Whittington, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 827–838.
- [34] P. R. Ortiz de Montellano in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Hrsg.: P. R. Ortiz de Montellano), Plenum, New York, **1995**, S. 245–303.
- [35] S. S. Stahl, S. J. Lippard in *Iron Metabolism: Inorganic Biochemistry and Regulatory Mechanisms* (Hrsg.: G. C. Ferreira, J. J. G. Moura, R. Franco), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**, S. 303–321.
- [36] J. B. Vincent, G. L. Olivier-Lilley, B. A. Averill, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1447–1467.
- [37] D. E. Edmondson, B. H. Huynh, *Inorg. Chim. Acta* **1996**, *252*, 399–404.
- [38] D. M. Kurtz, Jr., *J. Biol. Inorg. Chem.* **1997**, *2*, 159–167.
- [39] E. I. Solomon, T. C. Brunold, M. I. Davis, J. N. Kemsley, S.-K. Lee, N. Lehnert, F. Neese, A. J. Skulan, Y.-S. Yang, J. Zhou, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 235–349.
- [40] J. Xiong, D. M. Kurtz, Jr., J. Ai, J. Sanders-Loehr, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5117–5125.
- [41] S. J. Lippard, J. M. Berg, *Bioanorganische Chemie*, Spektrum, Heidelberg, **1995**.
- [42] J. Lund, M. P. Woodland, H. Dalton, *Eur. J. Biochem.* **1985**, *147*, 297–305.
- [43] J. Lund, H. Dalton, *Eur. J. Biochem.* **1985**, *147*, 291–296.
- [44] B. G. Fox, Y. Liu, J. E. Dege, J. D. Lipscomb, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 540–550.
- [45] K. E. Liu, S. J. Lippard, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12836–12839.
- [46] W. A. Froland, K. K. Andersson, S.-K. Lee, Y. Liu, J. D. Lipscomb, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17588–17597.
- [47] B. G. Fox, M. P. Hendrich, K. K. Surerus, K. K. Andersson, W. A. Froland, J. D. Lipscomb, E. Münck, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3688–3701.
- [48] K. E. Paulsen, Y. Liu, B. G. Fox, J. D. Lipscomb, E. Münck, M. T. Stankovich, *Biochemistry* **1994**, *33*, 713–722.
- [49] Y. Liu, J. C. Nesheim, S.-K. Lee, J. D. Lipscomb, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24662–24665.
- [50] K. E. Liu, A. M. Valentine, D. Wang, B. H. Huynh, D. E. Edmondson, A. Salifoglou, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10174–10185.
- [51] S. Grosse, L. Laramee, K.-D. Wendlandt, I. R. McDonald, C. B. Miguez, H.-P. Kleber, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 3929–3935.
- [52] A. C. Stainthorpe, J. C. Murrell, G. P. C. Salmond, H. Dalton, V. Lees, *Arch. Microbiol.* **1989**, *152*, 154–159.
- [53] A. C. Stainthorpe, V. Lees, G. P. C. Salmond, H. Dalton, J. C. Murrell, *Gene* **1990**, *91*, 27–34.
- [54] D. E. Coufal, J. L. Blazyk, D. A. Whittington, W. W. Wu, A. C. Rosenzweig, S. J. Lippard, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 2174–2185.
- [55] D. L. N. Cardy, V. Laidler, G. P. C. Salmond, J. C. Murrell, *Arch. Microbiol.* **1991**, *156*, 477–483.
- [56] D. L. N. Cardy, V. Laidler, G. P. C. Salmond, J. C. Murrell, *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 335–342.
- [57] I. R. McDonald, H. Uchiyama, S. Kambe, O. Yagi, J. C. Murrell, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 1898–1904.
- [58] T. Shigematsu, S. Hanada, M. Eguchi, Y. Kamagata, T. Kanagawa, R. Kurane, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 5198–5206.
- [59] A. K. Nielsen, K. Gerdes, H. Degn, J. C. Murrell, *Microbiology* **1996**, *142*, 1289–1296.
- [60] A. K. Nielsen, K. Gerdes, J. C. Murrell, *Mol. Microbiol.* **1997**, *25*, 399–409.
- [61] C. A. West, G. P. C. Salmond, H. Dalton, J. C. Murrell, *J. Gen. Microbiol.* **1992**, *138*, 1301–1307.
- [62] M. Merkx, S. J. Lippard, **2001**, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [63] J. Powłowski, J. Sealy, V. Shingler, E. Cadieux, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 945–951.
- [64] G. R. Johnson, R. H. Olsen, *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 3336–3346.
- [65] R. H. Olsen, J. J. Kukor, B. Kaphammer, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 3749–3756.
- [66] A. M. Byrne, J. J. Kukor, R. H. Olsen, *Gene* **1995**, *154*, 65–70.
- [67] G. M. Whited, D. T. Gibson, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 3010–3016.
- [68] K.-M. Yen, M. R. Karl, L. M. Blatt, M. J. Simon, R. B. Winter, P. R. Fausset, H. S. Lu, A. A. Harcourt, K. K. Chen, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 5315–5327.
- [69] K.-M. Yen, M. R. Karl, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 7253–7261.
- [70] J. D. Pikus, J. M. Studts, C. Achim, K. E. Kauffmann, E. Münck, R. J. Steffan, K. McClay, B. G. Fox, *Biochemistry* **1996**, *35*, 9106–9119.
- [71] V. Shingler, F. C. H. Franklin, M. Tsuda, D. Holroyd, M. Bagdasarian, *J. Gen. Microbiol.* **1989**, *135*, 1083–1092.
- [72] I. Nordlund, J. Powłowski, V. Shingler, *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 6826–6833.
- [73] J. Powłowski, V. Shingler, *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 6834–6840.
- [74] I. Nordlund, J. Powłowski, Å. Hagström, V. Shingler, *J. Gen. Microbiol.* **1993**, *139*, 2695–2703.
- [75] H. Saeki, K. Furuhashi, *J. Ferment. Bioeng.* **1994**, *78*, 399–406.
- [76] A. Miura, H. Dalton, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, *59*, 853–859.
- [77] F. J. Small, S. A. Ensign, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24913–24920.
- [78] S. C. Gallagher, R. Cammack, H. Dalton, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *247*, 635–641.
- [79] N.-Y. Zhou, A. Jenkins, C. K. N. C. K. Chion, D. J. Leak, *FEBS Lett.* **1998**, *430*, 181–185.

- [80] N.-Y. Zhou, A. Jenkins, C. K. N. C. K. Chion, D. J. Leak, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 1589–1595.
- [81] B. G. Fox, J. Shanklin, J. Ai, T. M. Loehr, J. Sanders-Loehr, *Biochemistry* **1994**, *33*, 12776–12786.
- [82] S. C. Gallagher, A. George, H. Dalton, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 480–489.
- [83] H. Brandstetter, D. A. Whittington, S. J. Lippard, C. A. Frederick, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 441–449.
- [84] D. A. Kopp, G. T. Gassner, J. L. Blazyk, S. J. Lippard, noch unveröffentlicht.
- [85] D. E. Coufal, J. L. Blazyk, M. Merkx, S. J. Lippard, **2001**, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [86] D. Jahng, T. K. Wood, *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 2473–2482.
- [87] D. Jahng, C. S. Kim, R. S. Hanson, T. K. Wood, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *51*, 349–359.
- [88] J. S. Lloyd, P. De Marco, H. Dalton, J. C. Murrell, *Arch. Microbiol.* **1999**, *171*, 364–370.
- [89] J. S. Lloyd, R. Finch, H. Dalton, J. C. Murrell, *Microbiol.* **1999**, *145*, 461–470.
- [90] A. Ericson, B. Hedman, K. O. Hodgson, J. Green, H. Dalton, J. G. Bentsen, R. H. Beer, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2330–2332.
- [91] J. DeWitt, B. Hedman, A. Ericson, K. O. Hodgson, J. Bentsen, R. Beer, S. J. Lippard, J. Green, H. Dalton, *Physica B* **1989**, *158*, 97–98.
- [92] J. G. DeWitt, J. G. Bentsen, A. C. Rosenzweig, B. Hedman, J. Green, S. Pilkington, G. C. Papaefthymiou, H. Dalton, K. O. Hodgson, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9219–9235.
- [93] J. G. DeWitt, A. C. Rosenzweig, A. Salifoglou, B. Hedman, S. J. Lippard, K. O. Hodgson, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 2505–2515.
- [94] L. Shu, Y. Liu, J. D. Lipscomb, L. Que, Jr., *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, *1*, 297–304.
- [95] L. Shu, J. C. Nesheim, K. Kauffmann, E. Münck, J. D. Lipscomb, L. Que, Jr., *Science* **1997**, *275*, 515–518.
- [96] M. P. Woodland, D. S. Patil, R. Cammack, H. Dalton, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *873*, 237–242.
- [97] M. P. Hendrich, E. Münck, B. G. Fox, J. D. Lipscomb, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5861–5865.
- [98] A. Davydov, R. Davydov, A. Gräslund, J. D. Lipscomb, K. K. Andersson, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 7022–7026.
- [99] J.-P. Willems, A. M. Valentine, R. Gurbel, S. J. Lippard, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9410–9416.
- [100] R. Davydov, A. M. Valentine, S. Komar-Panicucci, B. M. Hoffman, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1999**, *38*, 4188–4197.
- [101] M. P. Hendrich, B. G. Fox, K. K. Andersson, P. G. Debrunner, J. D. Lipscomb, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 261–269.
- [102] V. J. DeRose, K. E. Liu, D. M. Kurtz, Jr., B. M. Hoffman, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6440–6441.
- [103] H. Thomann, M. Bernardo, J. M. McCormick, S. Pulver, K. K. Andersson, J. D. Lipscomb, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8881–8882.
- [104] C. J. Bender, A. C. Rosenzweig, S. J. Lippard, J. Peisach, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 15993–15998.
- [105] B. M. Hoffman, B. E. Sturgeon, P. E. Doan, V. J. DeRose, K. E. Liu, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6023–6024.
- [106] V. J. DeRose, K. E. Liu, S. J. Lippard, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 121–134.
- [107] B. E. Sturgeon, P. E. Doan, K. E. Liu, D. Burdi, W. H. Tong, J. M. Nocek, N. Gupta, J. Stubbe, D. M. Kurtz, Jr., S. J. Lippard, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 375–386.
- [108] S. Pulver, W. A. Froland, B. G. Fox, J. D. Lipscomb, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12409–12422.
- [109] S. Pulver, W. A. Froland, B. G. Fox, J. D. Lipscomb, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4529.
- [110] S. C. Pulver, W. A. Froland, J. D. Lipscomb, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 387–395.
- [111] B. G. Fox, K. K. Surerus, E. Münck, J. D. Lipscomb, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 10553–10556.
- [112] B. G. Fox, J. D. Lipscomb, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *154*, 165–170.
- [113] P. Nordlund, B.-M. Sjöberg, H. Eklund, *Nature* **1990**, *345*, 593–598.
- [114] M. A. Holmes, I. Le Trong, S. Turley, L. C. Sieker, R. E. Stenkamp, *J. Mol. Biol.* **1991**, *220*, 583–593.
- [115] P. Nordlund, H. Eklund, *J. Mol. Biol.* **1993**, *232*, 123–164.
- [116] R. E. Stenkamp, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 715–726.
- [117] R. M. Davydov, S. Ménage, M. Fontecave, A. Gräslund, A. Ehrenberg, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1997**, *2*, 242–255.
- [118] R. M. Davydov, J. Smieja, S. A. Dikanov, Y. Zang, L. Que, Jr., M. K. Bowman, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 292–301.
- [119] K. K. Andersson, T. E. Elgren, L. Que, Jr., J. D. Lipscomb, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8711–8713.
- [120] Y. Liu, J. C. Nesheim, K. E. Paulsen, M. T. Stankovich, J. D. Lipscomb, *Biochemistry* **1997**, *36*, 5223–5233.
- [121] A. C. Rosenzweig, S. J. Lippard, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 229–236.
- [122] A. C. Rosenzweig, H. Brandstetter, D. A. Whittington, P. Nordlund, S. J. Lippard, C. A. Frederick, *Proteins* **1997**, *29*, 141–152.
- [123] D. A. Whittington, M. H. Sazinsky, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1794–1795.
- [124] Y. Lindqvist, W. Huang, G. Schneider, J. Shanklin, *EMBO J.* **1996**, *15*, 4081–4092.
- [125] A. Lombardi, C. M. Summa, S. Geremia, L. Randaccio, V. Pavone, W. F. DeGrado, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 6298–6305.
- [126] M. E. Andersson, M. Högbom, A. Rinaldo-Matthis, K. K. Andersson, B.-M. Sjöberg, P. Nordlund, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2346–2352.
- [127] W. C. Voegli, N. Khidekel, J. Baldwin, B. A. Ley, J. M. Bollinger, Jr., A. C. Rosenzweig, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3255–3261.
- [128] J. Stubbe, W. A. van der Donk, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 705–762.
- [129] D. A. Whittington, A. C. Rosenzweig, C. A. Frederick, S. J. Lippard, *Biochemistry* **2001**, *40*, 3476–3482.
- [130] G. M. Raner, L. J. Martins, W. R. Ellis, Jr., *Biochemistry* **1997**, *36*, 7037–7043.
- [131] L. J. Martins, C. P. Hill, W. R. Ellis, Jr., *Biochemistry* **1997**, *36*, 7044–7048.
- [132] J. Xiong, R. S. Phillips, D. M. Kurtz, Jr., S. Jin, J. Ai, J. Sanders-Loehr, *Biochemistry* **2000**, *39*, 8526–8536.
- [133] C. S. Farmer, D. M. Kurtz, Jr., R. S. Phillips, J. Ai, J. Sanders-Loehr, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17043–17050.
- [134] Y. Shinohara, H. Uchiyama, O. Yagi, I. Kusakabe, *J. Ferment. Bioeng.* **1998**, *85*, 37–42.
- [135] H. Hemmi, J. M. Studts, Y. K. Chae, J. Song, J. L. Markley, B. G. Fox, *Biochemistry* **2001**, *40*, 3512–3524.
- [136] J. S. Lloyd, A. Bhambra, J. C. Murrell, H. Dalton, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *248*, 72–79.
- [137] H. Qian, Y. Edlund, J. Powlowski, V. Shingler, I. Sethson, *Biochemistry* **1997**, *36*, 495–504.
- [138] J. Colby, H. Dalton, *Biochem. J.* **1979**, *177*, 903–908.
- [139] J. Green, H. Dalton, *Biochem. J.* **1989**, *259*, 167–172.
- [140] R. C. Prince, R. N. Patel, *FEBS Lett.* **1986**, *203*, 127–130.
- [141] C. C. Correll, C. J. Batie, D. P. Ballou, M. L. Ludwig, *Science* **1992**, *258*, 1604–1610.
- [142] C. C. Correll, M. L. Ludwig, C. M. Bruns, P. A. Karplus, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 2112–2133.
- [143] G. Kurisu, M. Kusunoki, E. Katoh, T. Yamazaki, K. Teshima, Y. Onda, Y. Kimata-Ariga, T. Hase, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 117–121.
- [144] K. Moffat, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 641–645.
- [145] S.-K. Lee, J. C. Nesheim, J. D. Lipscomb, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 21569–21577.
- [146] S.-K. Lee, B. G. Fox, W. A. Froland, J. D. Lipscomb, E. Münck, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6450–6451.
- [147] A. M. Valentine, S. S. Stahl, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3876–3887.
- [148] J. D. Lipscomb, S.-K. Lee, J. C. Nesheim, Y. Jin, B. J. Wallar, X.-Y. Zhang in *Iron Metabolism: Inorganic Biochemistry and Regulatory Mechanisms* (Hrsg.: G. C. Ferreira, J. J. G. Moura, R. Franco), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**, S. 323–339.
- [149] R. E. Blankenship, W. W. Parson, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 635–653.
- [150] J. E. Walker, *Q. Rev. Biophys.* **1992**, *25*, 253–324.
- [151] G. T. Gassner, M. L. Ludwig, D. L. Gatti, C. C. Correll, D. P. Ballou, *FASEB J.* **1995**, *9*, 1411–1418.
- [152] J. L. Blazyk, G. T. Gassner, S. J. Lippard, **2001**, unveröffentlichte Ergebnisse.

- [153] S. S. Stahl, W. A. Francisco, M. Merkx, J. P. Klinman, S. J. Lippard, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 4549–4553.
- [154] K. E. Liu, D. Wang, B. H. Huynh, D. E. Edmondson, A. Salifoglou, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7465–7466.
- [155] K. E. Liu, A. M. Valentine, D. Qiu, D. E. Edmondson, E. H. Appelman, T. G. Spiro, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4997–4998.
- [156] S.-K. Lee, J. D. Lipscomb, *Biochemistry* **1999**, *38*, 4423–4432.
- [157] B. J. Brazeau, J. D. Lipscomb, *Biochemistry* **2000**, *39*, 13503–13515.
- [158] K. E. Liu, A. M. Valentine, D. Qiu, D. E. Edmondson, E. H. Appelman, T. G. Spiro, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11134.
- [159] K. Kim, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4914–4915.
- [160] J. Hwang, C. Krebs, B. H. Huynh, D. E. Edmondson, E. C. Theil, J. E. Penner-Hahn, *Science* **2000**, *287*, 122–125.
- [161] Q. Su, J. P. Klinman, *Biochemistry* **1998**, *37*, 12513–12525.
- [162] W. A. Francisco, G. Tian, P. F. Fitzpatrick, J. P. Klinman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4057–4062.
- [163] A. L. Feig, A. Masschelein, A. Bakac, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 334–342.
- [164] L. Que, Jr., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, 3933–3940.
- [165] J. Du Bois, T. J. Mizoguchi, S. J. Lippard, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *200*, 443–485.
- [166] J. L. DuBois, M. J. Latimer, A. M. Valentine, S. S. Stahl, B. Hedman, S. J. Lippard, K. O. Hodgson, **2001**, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [167] E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2563–2605.
- [168] J. Cahoy, P. L. Holland, W. B. Tolman, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 2161–2168.
- [169] V. Mahadevan, R. J. M. Klein Gebbink, T. D. P. Stack, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 228–234.
- [170] P. J. Riggs-Gelasco, L. Shu, S. Chen, D. Burdi, B. H. Huynh, L. Que, Jr., J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 849–860.
- [171] B. E. Sturgeon, D. Burdi, S. Chen, B.-H. Huynh, D. E. Edmondson, J. Stubbe, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7551–7557.
- [172] N. Ravi, J. M. Bollinger, Jr., B. H. Huynh, D. E. Edmondson, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8007–8014.
- [173] D. Burdi, J.-P. Willems, P. Riggs-Gelasco, W. E. Antholine, J. Stubbe, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12910–12919.
- [174] A. M. Valentine, P. Tavares, A. S. Pereira, R. Davydov, C. Krebs, B. M. Hoffman, D. E. Edmondson, B. H. Huynh, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2190–2191.
- [175] P. E. M. Siegbahn, M. R. A. Blomberg, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1999**, *50*, 221–249.
- [176] H. Basch, K. Mogi, D. G. Musaev, K. Morokuma, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7249–7256.
- [177] P. E. M. Siegbahn, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 2880–2889.
- [178] K. Yoshizawa, Y. Yokomichi, Y. Shiota, T. Ohta, T. Yamabe, *Chem. Lett.* **1997**, 587–588.
- [179] K. Yoshizawa, T. Ohta, T. Yamabe, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1998**, *71*, 1899–1909.
- [180] K. Yoshizawa, T. Ohta, T. Yamabe, *Nippon Kagaku Kaishi* **1998**, 451–459.
- [181] K. Yoshizawa, *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *78*, 23–34.
- [182] B. D. Dunietz, M. D. Beachy, Y. Cao, D. A. Whittington, S. J. Lippard, R. A. Friesner, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2828–2839.
- [183] B. F. Gherman, B. D. Dunietz, D. A. Whittington, S. J. Lippard, R. A. Friesner, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3836–3837.
- [184] P. E. M. Siegbahn, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6*, 27–45.
- [185] B. F. Gherman, S. J. Lippard, R. A. Friesner, **2001**, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [186] N. D. Priestley, H. G. Floss, W. A. Froland, J. D. Lipscomb, P. G. Williams, H. Morimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7561–7562.
- [187] A. A. Shteinman, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 325–330.
- [188] E. Nordlander, K. K. Andersson, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 300–301.
- [189] P. E. M. Siegbahn, R. H. Crabtree, P. Nordlund, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 314–317.
- [190] D. A. Whittington, A. M. Valentine, S. J. Lippard, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 307–313.
- [191] K. Yoshizawa, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 318–324.
- [192] J. D. Lipscomb, L. Que, Jr., *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 331–336.
- [193] A. M. Valentine, B. Wilkinson, K. E. Liu, S. Komar-Panicucci, N. D. Priestley, P. G. Williams, H. Morimoto, H. G. Floss, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1818–1827.
- [194] D. Griller, K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 317–323.
- [195] P. R. Ortiz de Montellano, R. A. Stearns, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3415–3420.
- [196] M. Newcomb, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1151–1176.
- [197] K. E. Liu, C. C. Johnson, M. Newcomb, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 939–947.
- [198] A. M. Valentine, M.-H. Le Tadic-Biadatti, P. H. Toy, M. Newcomb, S. J. Lippard, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 10771–10776.
- [199] Y. Jin, J. D. Lipscomb, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1543*, 47–59.
- [200] F. Ruzicka, D.-S. Huang, M. I. Donnelly, P. A. Frey, *Biochemistry* **1990**, *29*, 1696–1700.
- [201] S.-Y. Choi, P. E. Eaton, P. F. Hollenberg, K. E. Liu, S. J. Lippard, M. Newcomb, D. A. Putt, S. P. Upadhyaya, Y. Xiong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6547–6555.
- [202] S.-Y. Choi, P. E. Eaton, D. A. Kopp, S. J. Lippard, M. Newcomb, R. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12198–12199.
- [203] Y. Jin, J. D. Lipscomb, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6178–6186.
- [204] N. Deighton, I. D. Podmore, M. C. R. Symons, P. C. Wilkins, H. Dalton, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1086–1087.
- [205] P. C. Wilkins, H. Dalton, I. D. Podmore, N. Deighton, M. C. R. Symons, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 67–72.
- [206] C. D. Ritchie, *Physical Organic Chemistry: The Fundamental Concepts*, Marcel Dekker, New York, **1990**, S. 289–307.
- [207] R. A. More O'Ferrall, *J. Chem. Soc. B* **1970**, 785–790.
- [208] J. C. Nesheim, J. D. Lipscomb, *Biochemistry* **1996**, *35*, 10240–10247.
- [209] E. A. Ambundo, S. J. Lippard, **2001**, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [210] P. E. M. Siegbahn, R. H. Crabtree, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3103–3113.
- [211] K. Yoshizawa, T. Ohta, T. Yamabe, R. Hoffmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12311–12321.
- [212] K. Yoshizawa, T. Ohta, Y. Shiota, T. Yamabe, *Chem. Lett.* **1997**, 1213–1214.
- [213] V. Guallar, B. F. Gherman, S. J. Lippard, W. H. Miller, R. A. Friesner, noch unveröffentlichte Ergebnisse.
- [214] A. D. N. Vaz, S. J. Pernecke, G. M. Raner, M. J. Coon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4644–4648.
- [215] P. H. Toy, M. Newcomb, M. J. Coon, A. D. N. Vaz, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9718–9719.
- [216] A. D. N. Vaz, D. F. McGinnity, M. J. Coon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 3555–3560.
- [217] M. Newcomb, P. H. Toy, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 449–455.
- [218] M. Newcomb, R. Shen, S.-Y. Choi, P. H. Toy, P. F. Hollenberg, A. D. N. Vaz, M. J. Coon, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2677–2686.
- [219] M. Newcomb, M.-H. Le Tadic-Biadatti, D. L. Chestney, E. S. Roberts, P. F. Hollenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12085–12091.
- [220] Y. Jiang, P. C. Wilkins, H. Dalton, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1163*, 105–112.
- [221] B. J. Wallar, J. D. Lipscomb, *Biochemistry* **2001**, *40*, 2220–2233.
- [222] J. Kazlauskaitė, H. A. O. Hill, P. C. Wilkins, H. Dalton, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *241*, 552–556.
- [223] S. C. Gallagher, A. J. Callaghan, J. Zhao, H. Dalton, J. Trewella, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6752–6760.
- [224] A. C. Rosenzweig, C. A. Frederick, S. J. Lippard in *Microbial Growth on C<sub>1</sub> Compounds* (Hrsg.: M. E. Lidstrom, F. R. Tabita), Kluwer, Dordrecht, **1996**, S. 141–149.
- [225] J. M. Bollinger, Jr., C. Krebs, A. Vicol, S. Chen, B. A. Ley, D. E. Edmondson, B. H. Huynh, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1094–1095.
- [226] P. Moënne-Locoz, J. Baldwin, B. A. Ley, T. M. Loehr, J. M. Bollinger, Jr., *Biochemistry* **1998**, *37*, 14659–14663.
- [227] J. A. Broadwater, J. Ai, T. M. Loehr, J. Sanders-Loehr, B. G. Fox, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14664–14671.
- [228] J. A. Broadwater, C. Achim, E. Münck, B. G. Fox, *Biochemistry* **1999**, *38*, 12197–12204.

- [229] A. S. Pereira, W. Small, C. Krebs, P. Tavares, D. E. Edmondson, E. C. Theil, B. H. Huynh, *Biochemistry* **1998**, *37*, 9871–9876.
- [230] P. Moënne-Loccoz, C. Krebs, K. Herlihy, D. E. Edmondson, E. C. Theil, B. H. Huynh, T. M. Loehr, *Biochemistry* **1999**, *38*, 5290–5295.
- [231] R. Koradi, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Mol. Graphics* **1996**, *14*, 51–55.
- [232] P. J. Kraulis, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, *24*, 946–950.
- [233] E. A. Merritt, M. E. P. Murphy, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1994**, *50*, 869–873.
- [234] D. A. Whittington, S. J. Lippard in *Handbook of Metalloproteins* (Hrsg.: A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt), Wiley, Chichester, **2001**, S. 712–724.
- [235] T. A. Jones, J.-Y. Zou, S. W. Cowan, M. Kjeldgaard, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1991**, *47*, 110–119.
- [236] A. J. Nicholls, *GRASP Manual*, Columbia University, New York, **1993**.