

## Metalloenzyme

# Reduktion von N<sub>2</sub>O an einem μ<sub>4</sub>-sulfidverbrückten vierkernigen aktiven Cu<sub>2</sub>-Zentrum\*\*

Peng Chen, Serge I. Gorelsky, Somdatta Ghosh und Edward I. Solomon\*

### Stichwörter:

Bioanorganische Chemie · Elektronische Struktur · Kupfer · Metalloenzyme · Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Die Reduktion von Distickstoffoxid (N<sub>2</sub>O) ist eine chemische Herausforderung, sowohl was die selektive Oxidation organischer Substrate durch N<sub>2</sub>O anbelangt als auch die Beseitigung von N<sub>2</sub>O als Treibhausgas. Die Reduktion von N<sub>2</sub>O ist thermodynamisch günstig, aber kinetisch gehemmt und erfordert die Aktivierung von N<sub>2</sub>O durch Übergangsmetallzentren. In biologischen Systemen ist die Reduktion von N<sub>2</sub>O der abschließende Denitrifizierungsschritt im bakteriellen Stickstoffkreislauf und wird von dem Enzym Distickstoff-Reduktase katalysiert, dessen aktives Zentrum aus einem μ<sub>4</sub>-sulfidverbrückten vierkernigen Cu<sub>2</sub>-Cluster mit vielen ungewöhnlichen spektroskopischen Eigenschaften besteht. Aktuelle Untersuchungen führen zu einer detaillierten Beschreibung der elektronischen Struktur des Cu<sub>2</sub>-Clusters im Ruhezustand und im katalytisch aktiven Zustand. Dies führt zum besseren Verständnis der Rolle dieses vierkernigen Kupferclusters bei der Aktivierung und Reduktion von N<sub>2</sub>O.

### 1. Einleitung

Die selektive Oxidation organischer Substrate ist eine schwierige präparative Aufgabe.<sup>[1]</sup> Oxidationsmittel sind oft entweder so reaktiv, dass die Oxidation nicht substratselektiv verläuft, oder sie erzeugen Nebenprodukte, die dann zu unerwünschten Nebenreaktionen führen. Distickstoffoxid

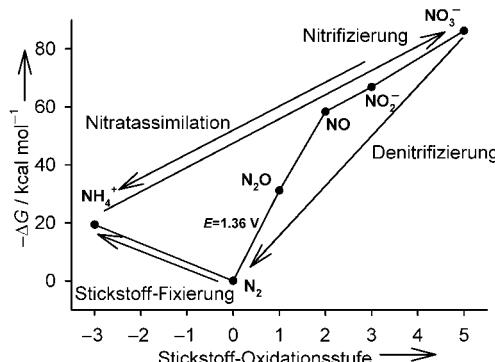
könnte ein interessanter Sauerstoffüberträger bei der Oxidation organischer Substrate sein, da bei seiner Reduktion N<sub>2</sub> das einzige Nebenprodukt ist (N<sub>2</sub>O + 2H<sup>+</sup> + 2e<sup>-</sup> → N<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O, E° = 1.76 V).<sup>[2]</sup> Allerdings ist N<sub>2</sub>O ein kinetisch inertes Molekül, zu seiner thermischen Zersetzung (einer unimolekularen, spinverbotenen Reaktion) muss eine Aktivierungsenergie von ca. 59 kcal mol<sup>-1</sup> aufgewendet werden.<sup>[3]</sup> Für eine erfolgreiche Reduktion muss N<sub>2</sub>O in homogenen Systemen normalerweise zunächst durch Übergangsmetalle wie Ti, V, Ni, Zr, Ru oder Hf aktiviert werden.<sup>[4-9]</sup> Die beiden dazu benötigten Elektronen stammen entweder vom Metallzentrum (Bildung endständiger<sup>[10,11]</sup> oder verbrückter<sup>[4]</sup> Metallocide) oder von den Liganden (Insertion des Sauerstoffatoms in die Metall-Ligand-Bindung<sup>[5-7,12]</sup>). Bisher ist noch keine Kristallstrukturanalyse eines der bekannten Metall-N<sub>2</sub>O-Komplexe gelungen. Spektroskopische Untersuchungen des [(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>Ru(N<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup>-Komplexkations ergaben eine lineare End-on-Koordination von N<sub>2</sub>O über sein endständiges Stickstoffatom an das Rutheniumzentrum.<sup>[13]</sup> Im dimeren {Ru(N<sub>2</sub>O)Ru}-Komplex wird eine zusätzliche Koordination durch das terminale Sauerstoffatom von N<sub>2</sub>O an das zweite Metallzentrum angenommen;<sup>[10,14]</sup> im Falle der N<sub>2</sub>O-Adsorption an α-Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> wurde eine solche Koordination spektroskopisch nachgewiesen.<sup>[15]</sup>

Die N<sub>2</sub>O-Reduktion wird in vivo durch das kupferhaltige Enzym Distickstoffoxid-Reduktase (N<sub>2</sub>OR) ausgeführt. Diese Reaktion ist der abschließende Schritt der Denitrifizierung. Der denitrifizierende Organismus verwendet für die

[\*] P. Chen, Dr. S. I. Gorelsky, S. Ghosh, Prof. Dr. E. I. Solomon  
Department of Chemistry  
Stanford University  
Stanford, CA 94305 (USA)  
Fax: (+1) 650-725-0259  
E-mail: Edward.Solomon@stanford.edu

[\*\*] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (DK-31450 (E.I.S.)) gefördert. Die Schwefel-K-Kanten wurden von Dr. S. DeBeer George (Stanford Synchrotron Radiation Laboratory) gemessen. Wir danken den Professoren I. Moura (Portugal), D. Dooley (Montana State University), K. Hodgson und B. Hedman (Stanford Synchrotron Radiation Laboratory) und W. E. Antholine (Wisconsin Medical College) für die Zusammenarbeit. P.C. wurde durch ein Gerhard Casper Stanford Graduate Fellowship und ein Franklin Veatch Memorial Fellowship unterstützt, S.I.G. durch ein NSERC Postdoctoral Fellowship (Ottawa).

anaerobe Atmung, die an die ATP-Synthese gekoppelt ist, anstelle von Sauerstoff oxidierte Formen von Stickstoff als terminale Elektronenacceptoren (Abbildung 1).<sup>[16]</sup> Darüber hinaus ist die Reduktion von N<sub>2</sub>O unter ökologischen Ge-



**Abbildung 1.** Der bakterielle Stickstoffkreislauf und seine Thermochemie (wässrige Lösung bei pH 7). Die Werte von  $\Delta G$  (ox +  $n e^- \rightarrow$  red) beziehen sich auf N<sub>2</sub> als Standard (null), sind aber pro Mol der N-Atome angegeben.

sichtspunkten wichtig, da N<sub>2</sub>O neben CO<sub>2</sub> und CH<sub>4</sub> eines der bedeutendsten Treibhausgase ist. Es wird hauptsächlich durch Kunstdünger und bei der Erdölverbrennung erzeugt.<sup>[3,16]</sup> Das Enzym N<sub>2</sub>OR enthält zwei unterschiedliche aktive Kupferzentren, Cu<sub>A</sub> und Cu<sub>Z</sub>.<sup>[16–18]</sup> Das Cu<sub>A</sub>-Zentrum ist ein wohlbekanntes Elektronenübertragungszentrum aus zwei Kupferionen, die durch zwei Cysteinliganden verbrückt sind.<sup>[19,20]</sup>



Peng Chen, geboren in Jiangsu (China), erhielt seinen B.S. 1997 an der Universität Nanjing (China). Nach einem einjährigen Aufenthalt an der University of California in San Diego bei Prof. Yitzhak Tor wechselte er an die Stanford University zu Prof. Edward I. Solomon. Dort promovierte er mit einer Arbeit über elektronische Strukturen biologisch relevanter Cu-Zentren bei der O<sub>2</sub> und N<sub>2</sub>O-Aktivierung, wobei er durch ein Gerhard Casper Stanford Graduate Fellowship und ein Franklin Veatch Memorial Fellowship unterstützt wurde. Zurzeit ist er Postdoc bei Prof. Sunny Xie an der Harvard University.



Serge Gorelsky erhielt seinen B.S. und M.S. an der Staatlichen Universität Moskau und promovierte bei Prof. A. Barry P. Lever an der York University (Toronto) auf dem Gebiet der elektronischen Spektroskopie von Rutheniumkomplexen. Seit 2002 ist er Postdoc bei Prof. Edward I. Solomon an der Stanford University (NSERC-Stipendiat). Seine Forschung konzentriert sich auf elektronische Strukturen und spektroskopische Untersuchungen kupferhaltiger Proteine. Er erhielt 2002 die Governor General of Canada's Gold Medal for Academic Excellence.

Die Struktur des katalytisch aktiven Cu<sub>Z</sub>-Zentrums war dagegen schwerer zu ermitteln und wurde ursprünglich aufgrund spektroskopischer Messungen als zweikerniges Kupferzentrum beschrieben.<sup>[21,22]</sup> Eine später mit niedriger Auflösung (2.4 Å) gemessene Kristallstruktur von N<sub>2</sub>OR aus *Pseudomonas nautica* (*Pn*)<sup>[23]</sup> deutete auf ein völlig neues Strukturmotiv für das Cu<sub>Z</sub>-Zentrum hin, und zwar auf einen vierkernigen Kupfercluster in der N-terminalen Domäne jeder Untereinheit des dimeren Proteins. Das Cu<sub>A</sub>-Zentrum ist in der C-terminalen Domäne lokalisiert. Die benachbarten Cu<sub>A</sub>- und Cu<sub>Z</sub>-Zentren befinden sich in verschiedenen Unterheiten des dimeren Proteins (Abbildung 2). Die Ergebnisse der quantitativen Elementaranalyse und die Analyse der spektroskopischen Daten deuteten bald auf ein Cu<sub>Z</sub>-Zentrum in Form eines μ<sub>4</sub>-sulfidverbrückten vierkernigen Kupferclusters hin.<sup>[24]</sup> Dies wurde in der Folge durch eine hochauflöste Kristallstruktur (1.6 Å) der N<sub>2</sub>OR aus *Paracoccus denitrificans* (*Pd*) bestätigt, und die *Pn*-N<sub>2</sub>OR-Struktur wurde daraufhin revidiert.<sup>[25,26]</sup>

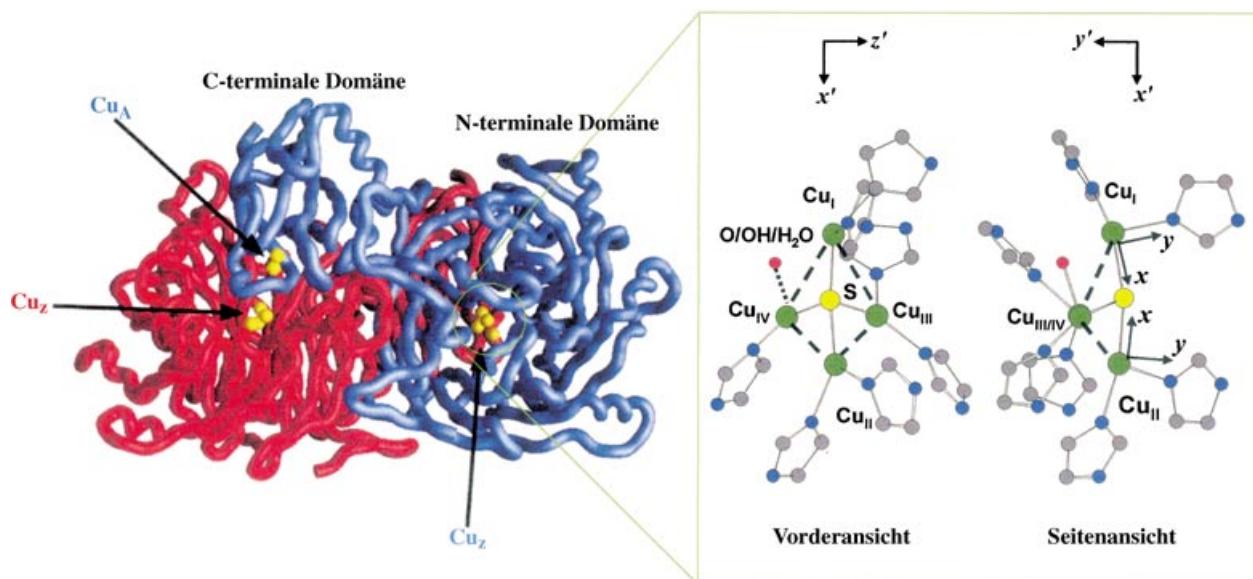
Der Cu<sub>4</sub>S-Kern des Cu<sub>Z</sub>-Zentrums hat eine angeneherte C<sub>s</sub>-Symmetrie, die Spiegelebene ist definiert durch die Cu<sub>I</sub>-S-Cu<sub>II</sub>-Ebene (siehe Abbildung 2). Der Cu<sub>I</sub>-S-Cu<sub>II</sub>-Winkel beträgt ca. 160°, die anderen Cu-S-Cu-Winkel sind ungefähr rechtwinklig. Alle Cu-S-Bindungslängen sind mit ca. 2.3 Å fast identisch, aber die Cu-Cu-Abstände sind sehr unterschiedlich: Die drei Kupferatome Cu<sub>II</sub>, Cu<sub>III</sub> und Cu<sub>IV</sub> befinden sich nahe beieinander und relativ weit entfernt vom Cu<sub>I</sub> ( $r(Cu_I-Cu_{III}) \approx r(Cu_I-Cu_{IV}) \approx 3.4$  Å,  $r(Cu_{II}-Cu_{III}) \approx r(Cu_{II}-Cu_{IV}) \approx 2.6$  Å,  $r(Cu_{III}-Cu_{IV}) \approx 2.9$  Å). Der Cu<sub>4</sub>S-Cluster wird durch sieben Histidinreste des Proteingerüsts koordiniert.



Somdatta Ghosh, geboren in Kolkata (Indien), erhielt ihren B.S. am Presidency College an der Universität Kalkutta und ihren M.S. am Indian Institute of Technology (Kanpur). Im Jahre 2002 wechselte sie als Doktorandin an die Stanford University in die Arbeitsgruppe von Prof. Edward I. Solomon. Sie interessiert sich für spektroskopische, kinetische und theoretische Untersuchungen zum Mechanismus der N<sub>2</sub>O-Reduktion und der Substratoxygenierung durch kupferhaltige Enzyme.

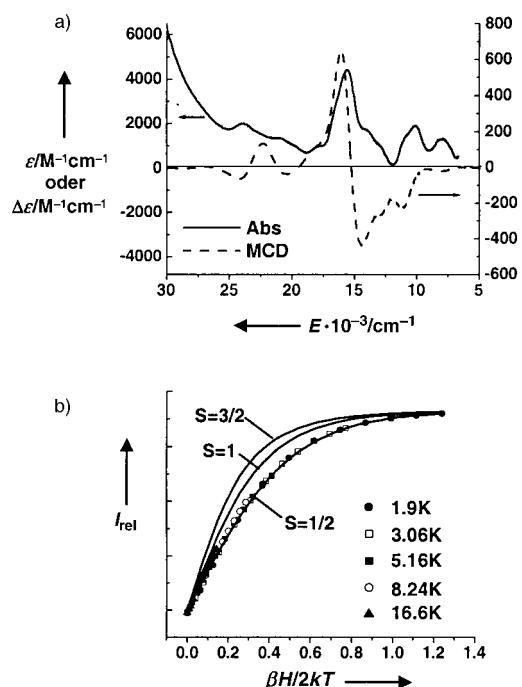


Edward I. Solomon, aufgewachsen in North Miami Beach (Florida), promovierte an der Princeton University bei D. S. McClure. Er war Postdoc am H. C. Ørsted Institute bei C. J. Ballhausen und am California Institute of Technology bei H. B. Gray. Bis 1982 war er Professor am MIT, dann wechselte er an die Stanford University, wo er nun Monroe E. Spaght Professor of Humanities and Sciences ist. Sein Forschungsschwerpunkt sind Studien zu der elektronischen Struktur, den physikalischen Eigenschaften und den Reaktivitäten von Übergangsmetallkomplexen.



**Abbildung 2.** Kristallstruktur des Cu<sub>2</sub>-Zentrums aus *Pn*. Die beiden Untergruppen des homodimeren Proteins sind rot und blau markiert. Der Cu<sub>4</sub>S-Cluster hat eine angenäherte C<sub>2</sub>-Symmetrie mit der Spiegelebene Cu<sub>I</sub>-S-Cu<sub>II</sub>.  $r(\text{Cu}_I-\text{S}) \approx 2.3$ ,  $r(\text{Cu}_I-\text{Cu}_{\text{III}}) \approx r(\text{Cu}_I-\text{Cu}_{\text{IV}}) \approx 3.4$ ,  $r(\text{Cu}_{\text{II}}-\text{Cu}_{\text{III}}) \approx r(\text{Cu}_{\text{II}}-\text{Cu}_{\text{IV}}) \approx 2.6$ ,  $r(\text{Cu}_{\text{III}}-\text{Cu}_{\text{IV}}) \approx 2.9$  Å. Der Cu<sub>I</sub>-S-Cu<sub>II</sub>-Winkel beträgt ca. 160°. Alle anderen Cu-S-Cu-Winkel sind ungefähr 90°. Der Ligand L (O<sup>2-</sup>, OH<sup>-</sup> oder H<sub>2</sub>O) ist gemäß der Kristallstruktur von N<sub>2</sub>OR aus *Pd* (Auflösung 1.6 Å) nur schwach gebunden ( $r(\text{Cu}_{\text{IV}}-\text{O}) \approx 2.6$ ,  $r(\text{Cu}_{\text{I}}-\text{O}) \approx 2.8$  Å). Ein molekulares (x'y'z')-Koordinatensystem und lokale (xyz)-Koordinatensysteme wurden für die Orbitalbezeichnungen verwendet.

niert. Ein zusätzlicher Ligand L zwischen dem Cu<sub>I</sub>- und dem Cu<sub>IV</sub>-Zentrum markiert vermutlich die Substratbindungsstelle.<sup>[23]</sup> Bisher konnte durch Kristallstrukturanalysen die Natur dieses Liganden (O<sup>2-</sup>, OH<sup>-</sup> oder H<sub>2</sub>O) nicht genau bestimmt werden.



**Abbildung 3.** a) Absorptions- und MCD-Spektrum des Cu<sub>2</sub>-Zentrums von *Pn*-N<sub>2</sub>OR bei 10 K bzw. 5 K und 7 T b) VTVH-Sättigungs-MCD-Daten (Punkte) des Cu<sub>2</sub>-Zentrums, gemessen bei 620 nm, und simulierte Sättigungskurven (durchgezogene Linien).

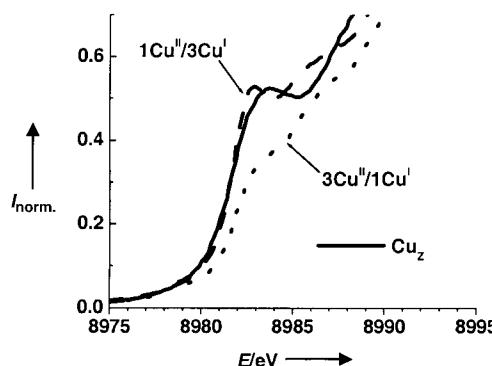
Eine Reihe spektroskopischer Daten des Cu<sub>2</sub>-Zentrums im Ruhezustand ist bereits veröffentlicht worden.<sup>[27]</sup> Darunter sind ein Absorptionsspektrum (Abbildung 3a, durchgezogene Linie), welches eine intensive Charge-Transfer(CT)-Bande bei ca. 640 nm (ca. 15 650 cm<sup>-1</sup>) zeigt, und auch ein Tieftemperaturspektrum des magnetischen Circulardichroismus (MCD; Abbildung 3a, gestrichelte Linie) mit einer Bande bei ca. 640 nm.<sup>[21, 22, 24, 28]</sup> Das EPR-Spektrum des Cu<sub>2</sub>-Zentrums zeigt einen sehr kleinen  $g_{\parallel}$ -Wert und eine komplizierte Hyperfeinstruktur.<sup>[18, 21, 28]</sup> Da jedoch die Gesamtzahl der Kupferzentren im Enzym, ihre Oxidationsstufen und auch weitere benötigte Strukturinformationen noch nicht bekannt waren, konnten die spektroskopischen Eigenschaften des Enzyms und der enzymkatalysierte Mechanismus der N<sub>2</sub>O-Reduktion bisher nicht erklärt werden. In diesem Kurzaufsatz konzentrieren wir uns auf unsere jüngsten Untersuchungen der vielen ungewöhnlichen spektroskopischen Eigenschaften der Distickstoffoxid-Reduktase und der detaillierten elektronischen Struktur ihres Cu<sub>2</sub>-Zentrums.<sup>[29-31]</sup> Außerdem präsentieren wir unsere Befunde zum Beitrag der elektronischen Struktur des Cu<sub>2</sub>-Zentrums zur N<sub>2</sub>O-Reduktion sowie einen möglichen Mechanismus für diese vom Cu<sub>2</sub>-Zentrum katalysierte Reaktion.

## 2. Elektronische Struktur des Cu<sub>2</sub>-Zentrums

Die Intensität der MCD-Banden (Abbildung 3a) ist von der Magnetfeldstärke und der Temperatur abhängig (Beitrag des C-Terms) und nimmt mit sinkender Temperatur und steigender magnetischer Feldstärke zu. Die MCD-Intensität zeigt ein Sättigungsverhalten bei hoher Feldstärke (ca. 7 T) und tiefen Temperaturen (ca. 2 K). Unterschiedliche Spinsys-

teme haben unterschiedliche Sättigungsverhalten.<sup>[32]</sup> MCD-Messungen bei variabler Temperatur und variablem Feld (VTvh-Sättigungs-MCD) können daher den Spinzustand des Cu<sub>z</sub>-Zentrums im Ruhezustand, d.h. im Zustand mit bekannter Kristallstruktur, aufklären. Ein Vergleich der VTVh-MCD-Sättigungskurven des Cu<sub>z</sub>-Zentrums (Abbildung 3 b, Punkte) mit berechneten Sättigungskurven für  $S = \frac{1}{2}$ -,  $S = 1$ - und  $S = \frac{3}{2}$ -Systeme (durchgezogene Linien) zeigt, dass der Cu<sub>z</sub>-Cluster einen  $S_{\text{gesamt}} = \frac{1}{2}$ -Grundzustand hat.<sup>[30]</sup>

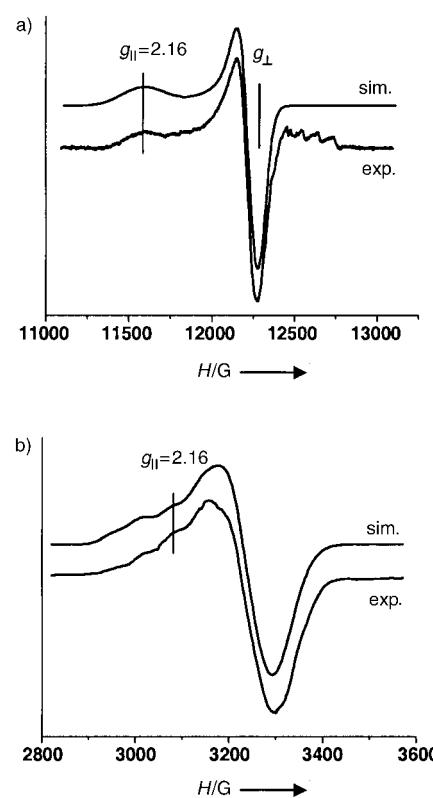
Es gibt zwei Möglichkeiten für das vierkernige Cu<sub>z</sub>-Zentrum, einen  $S_{\text{gesamt}} = \frac{1}{2}$ -Zustand zu erreichen: 1 Cu<sup>II</sup>/3 Cu<sup>I</sup> oder 3 Cu<sup>II</sup>/1 Cu<sup>I</sup> (Cu<sup>II</sup>: d<sup>9</sup>; Cu<sup>I</sup>: d<sup>10</sup>). Im zweiten Fall müssten zwei der oxidierten Kupferatome antiferromagnetisch gekoppelt sein. Mithilfe von Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) an der K-Kante von Kupfer kann zwischen diesen beiden Fällen unterschieden werden: Cu<sup>I</sup>-Komplexe haben eine intensive, charakteristische Absorptionsbande bei ca. 8984 eV des elektrisch-dipol-erlaubten Cu-1s → 4p-Übergangs; Cu<sup>II</sup>-Komplexe dagegen haben keine intensiven Bänder unterhalb von 8985 eV, sondern nur eine sehr schwache Bande des verbotenen Cu-1s → 3d-Übergangs bei ca. 8979 eV.<sup>[33]</sup> Das Kupfer-K-Kanten-Röntgenabsorptionsspektrum des Cu<sub>z</sub>-Clusters wird in Abbildung 4 zusammen mit simulierten Spektren für die 1 Cu<sup>II</sup>/3 Cu<sup>I</sup>- und 3 Cu<sup>II</sup>/1 Cu<sup>I</sup>-



**Abbildung 4.** Kupfer-K-Kanten-Röntgenabsorptionsspektrum des Cu<sub>z</sub>-Zentrums von Pn-N<sub>2</sub>OR und simulierte Spektren mit den Oxidationsstufen 1 Cu<sup>II</sup>/3 Cu<sup>I</sup> und 3 Cu<sup>II</sup>/1 Cu<sup>I</sup>.

Varianten gezeigt. Die Simulation des 1 Cu<sup>II</sup>/3 Cu<sup>I</sup>-Modells gibt den realen Kurvenverlauf wesentlich besser wieder als die des 3 Cu<sup>II</sup>/1 Cu<sup>I</sup>-Modells. Dies lässt darauf schließen, dass der Cu<sub>z</sub>-Cluster nur ein oxidiertes Cu<sup>II</sup>-Zentrum mit einem einzigen Spin (einer einzigen Kupfer-d-Elektronenlücke) enthält.<sup>[30]</sup>

Durch EPR-spektroskopische Messungen kann die Verteilung dieses einzelnen Spins über das Cu<sub>z</sub>-Zentrum bestimmt werden. Das Q-Band-EPR-Spektrum (Abbildung 5 a,  $\nu \approx 35$  GHz) zeigt ein axiales Muster mit  $g_{||} \approx 2.16 > g_{\perp} \approx 2.04 > 2.0$ , was darauf hindeutet, dass ein  $d_{x^2-y^2}$ -Kupferorbital den einzelnen Spin enthält.<sup>[34]</sup> Dieser  $g_{||}$ -Wert für Cu<sub>z</sub> ist relativ klein verglichen mit  $g_{||} = 2.3$ –2.4 für normale tetragonale Cu<sup>II</sup>-Komplexe (z.B. CuSO<sub>4</sub>). Dies kann entweder die Folge eines stark kovalenten Charakters der Metall-Ligand-Wechselwirkungen oder hoher Ligandenfeld-(d-d)-Übergangsentgien sein.<sup>[35]</sup> Die Übergangsentgien beeinflussen

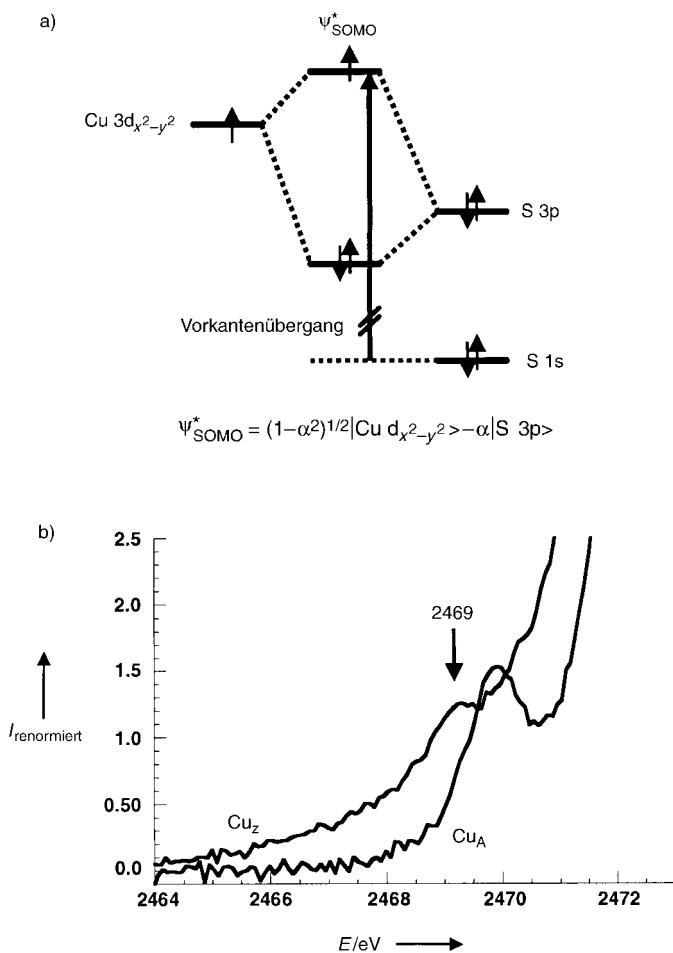


**Abbildung 5.** Experimentelle und simulierte Q-Band- (a) und X-Band-EPR-Spektren (b) des Cu<sub>z</sub>-Zentrums von Pn-N<sub>2</sub>OR.

die  $g$ -Werte, da die Spin-Bahn-Kopplung zwischen den angeregten Zuständen und dem Grundzustand zu der Abweichung der  $g$ -Werte von  $g = 2.0023$  führt und diese Abweichung mit zunehmenden Energien der angeregten Zustände abnimmt. Durch Korrelation des Q-Band-EPR-Spektrums mit dem niederfrequenten X-Band-EPR-Spektrum ( $\nu \sim 9.3$  GHz) kann die Metall-Hyperfeinkopplung in der  $g_{||}$ -Region aufgelöst werden (Abbildung 5 b). Überträgt man die  $g$ -Werte des Q-Band-EPR-Spektrums auf das X-Band-EPR-Spektrum, fällt der  $g_{||}$ -Wert (2.16) mit einem Maximum einer der Hyperfeinlinien zusammen, was auf ein Hyperfeinmuster mit einer ungeraden Linienzahl hindeutet (Abbildung 5 b). Hierin besteht der Unterschied zu EPR-Hyperfeinmustern normaler einkerniger Cu<sup>II</sup>-Komplexe, die ein Muster mit vier Linien haben (Kernspin von Kupfer:  $I = \frac{3}{2}$ ).<sup>[35]</sup> Das X-Band-Hyperfeinmuster kann durch die Berücksichtigung zweier Kupferzentren für die Hyperfeinkopplung erklärt werden: Ein Kupferzentrum dominiert die Hyperfeinaufspaltung ( $A_{||} = 61 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ), und ein zweites Kupferatom steuert mit  $A_{||} = 24 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  einen kleineren Beitrag hinzu. Das Verhältnis der Hyperfeinkopplungskonstanten, ca. 5:2, gibt ungefähr das Verhältnis der Spindichten an den beiden Kupferatomen wieder. Daher kann der Cu<sub>z</sub>-Cluster von Pn-N<sub>2</sub>OR als zum Teil delokalisiertes gemischvalentes System mit einem einzelnen Spin, der überwiegend in einem  $d_{x^2-y^2}$ -Kupferorbital lokalisiert ist, beschrieben werden.<sup>[30]</sup>

Zur Bestimmung der Kovalenz des verbrückenden Sulfids im Grundzustand wurden weitere XAS-Messungen, diesmal

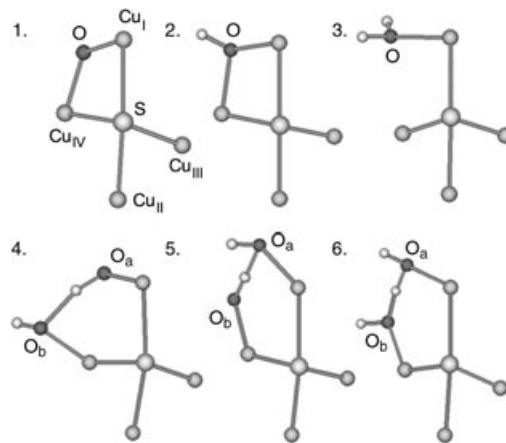
an der Schwefel-K-Kante, durchgeführt.<sup>[36]</sup> Die Vorkante an der Schwefel-K-Kante ist der Übergang vom 1s-Orbital des Schwefels zum Grundzustand-SOMO, das eine Linearkombination der Kupfer-3d- und Schwefel-3p-Orbitale ist (Abbildung 6 a). Die Intensität dieses Vorkantenübergangs ist direkt proportional zur Schwefelkovalenz  $\alpha^2$  in der Grundzustandswellenfunktion (siehe Gleichung in Abbildung 6 a).<sup>[36]</sup> Abbildung 6 b zeigt das Schwefel-K-Kantenspektrum des Cu<sub>Z</sub>-Clusters.<sup>[37]</sup> Der Schwefel-Vorkantenübergang



**Abbildung 6.** a) Methodik der Schwefel-K-Kanten-Röntgenabsorptionspektroskopie. SOMO: einfach besetztes Molekülorbital; b) Schwefel-K-Kantenspektrum des Cu<sub>Z</sub>-Zentrums von *Achromobacter-cycloclastes-N<sub>2</sub>OR* und des Cu<sub>A</sub>-Zentrums.

liegt bei 2469 eV, und seine schwache Intensität ist im Einklang mit einem Schwefelcharakter von 15–22 % in der Wellenfunktion des Grundzustands. Das Schwefel-K-Kantenspektrum des Cu<sub>A</sub>-Zentrums (ebenfalls in Abbildung 6 b) hat dagegen ein viel intensiveres Vorkantenprofil bei 2470 eV. Die Intensität dieses Cu<sub>A</sub>-Vorkantenübergangs entspricht einem Schwefelcharakter von 46 % im Grundzustand des Cu<sub>A</sub>-Zentrums, was gut belegt ist.

Dichtefunktionaltheorie(DFT)-Rechnungen lieferten eine detaillierte Beschreibung der Grundzustandswellenfunktion des Cu<sub>Z</sub>-Zentrums. Abbildung 7 und Tabelle 1 zeigen die optimierten Strukturen bzw. atomaren Spindichten des Cu<sub>Z</sub>-Spin-Dubletts, wobei verschiedene Liganden L verbrückend an die Cu<sub>I</sub>- und Cu<sub>IV</sub>-Zentren koordinieren. Die Rechnungen lassen erkennen, dass die Wellenfunktion des Grundzustands und die Spindichteverteilung im Cu<sub>Z</sub>-Cluster von der Art dieses Liganden abhängen. In den meisten Fällen ist Cu<sub>I</sub> das am höchsten oxidierte Kupferzentrum (Tabelle 1). Dies ist erklärbar durch die Vierfachkoordination des Cu<sup>1+</sup>-Ions ge-



**Abbildung 7.** Optimierte Strukturen des Cu<sub>Z</sub>-Clusters mit unterschiedlichen Liganden L zwischen den Cu<sub>I</sub>- und Cu<sub>IV</sub>-Zentren aus „spin-unrestricted“ DFT-Rechnungen auf dem BP86/LanL2DZ-Niveau. Die Koordinaten des Cu<sub>Z</sub>-Kerns und des Liganden L wurden optimiert, während die Positionen der Histidinliganden (Imidazol im Modell, hier nicht gezeigt) auf den entsprechenden Koordinaten der Kristallstruktur von *Pd-N<sub>2</sub>OR* festgehalten wurden; Liganden: 1. O<sup>2-</sup>; 2. OH<sup>-</sup>; 3. H<sub>2</sub>O; 4. und 5. zwei OH<sup>-</sup>; 6. H<sub>2</sub>O und OH<sup>-</sup>; Komplexe mit L=H<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup> und L=O<sub>2</sub>H<sub>2</sub><sup>2-</sup> wurden ebenfalls betrachtet; diese Ergebnisse werden an anderer Stelle präsentiert. Die Rechnungen für den Komplex mit zwei H<sub>2</sub>O-Liganden führten nicht zu einer stabilen Struktur.

**Tabelle 1:** Atomare Spindichten des Cu<sub>Z</sub>-Clusters mit verschiedenen Liganden L an Cu<sub>I</sub> und Cu<sub>IV</sub> (Abbildung 7).<sup>[a]</sup>

Ligand L	Verhältnis <sup>[b]</sup>	Cu <sub>I</sub>	Cu <sub>II</sub>	Cu <sub>III</sub>	Cu <sub>IV</sub>	S	O <sub>a</sub>	O <sub>b</sub>
1. O <sup>2-</sup>	5.7 (19)	0.31 (0.40)	0.02 (0.01)	0.01 (0.01)	0.06 (0.02)	0.11 (0.13)	0.48 (0.42)	–
2. OH <sup>-</sup>	3.4 (5.2)	0.41 (0.45)	0.07 (0.08)	0.05 (0.07)	0.12 (0.01)	0.22 (0.26)	0.07 (0.06)	–
3. H <sub>2</sub> O <sup>[49]</sup>	2.4 (2.0)	0.42 (0.39)	0.18 (0.19)	0.07 (0.07)	0.04 (0.05)	0.15 (0.16)	0.01 (0.01)	–
4. O-H-OH <sup>2-</sup>	5.1	0.47	0.00	0.01	0.09	0.11	0.28	0.01
5. HO-H-O <sup>2-</sup>	1.4	0.24	0.00	0.00	0.34	0.08	0.04	0.28
6. HO-H-OH <sup>-</sup>	1.7 (3.6)	0.41 (0.51)	0.06 (0.06)	0.02 (0.02)	0.24 (0.14)	0.13 (0.11)	0.02 (0.05)	0.04 (0.01)

[a] Die „spin-unrestricted“ DFT-Rechnungen wurden auf B3LYP6-311G\*\*-Niveau und basierend auf den mit BP86/LanL2DZ und B3LYP6-311G\*\* optimierten Strukturen für den Spin-Dublett-Grundzustand ausgeführt. Die Spindichten, die für die B3LYP6-311G\*\*-optimierten Strukturen berechnet wurden, sind in Klammern aufgelistet. [b] Verhältnis der atomaren Spindichten der beiden Kupferatome mit den größten und zweitgrößten Werten.

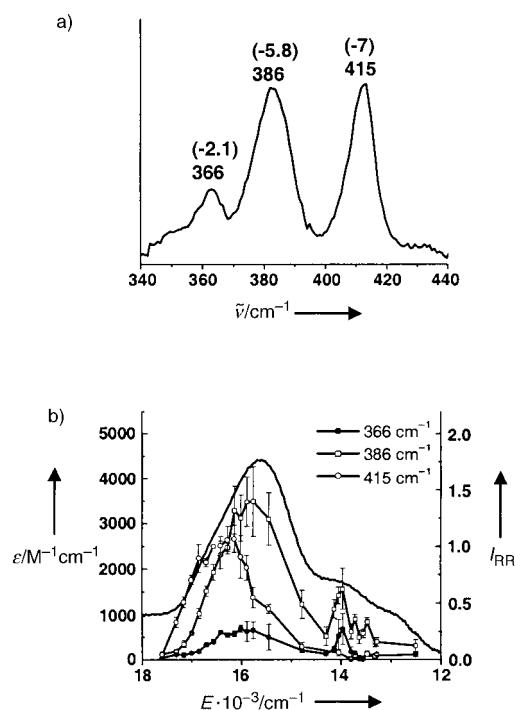
genüber den niedrigeren Koordinationszahlen der anderen Kupferionen. Die Spinverteilungen im Cluster zwischen den Cu<sub>I</sub>- und Cu<sub>II</sub>-Zentren mit L = H<sub>2</sub>O und zwischen den Cu<sub>I</sub>- und Cu<sub>IV</sub>-Zentren mit L = HO-H-OH<sup>-</sup> haben ein Verhältnis von ungefähr 2:1. Dieses Verhältnis ist im Einklang mit den Q/X-Band-EPR-Ergebnissen, welche auf ein Verhältnis von ca. 5:2 deuten. Die Komplexe mit anderen, von Wasser abstammenden Liganden L haben Spinverteilungen, die von diesem 5:2-Verhältnis abweichen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der Ligand L im Cu<sub>Z</sub>-Cluster entweder H<sub>2</sub>O oder HO-H-OH<sup>-</sup> ist. In diesen Modellen trägt das μ<sub>4</sub>-verbrückende Sulfid 13–16% zur Wellenfunktion des Grundzustands bei, was mit der Schwefelkovalenz der Schwefel-K-Kantenuntersuchungen übereinstimmt (Abbildung 6b). Die Delokalisierung der Elektronen im Cu<sub>Z</sub>-Cluster ist sehr wichtig, da sie zu einer niedrigen Reorganisationsenergie des Cu<sub>Z</sub>-Zentrums beim Redoxprozess beiträgt und seine oxidierte Form nach der Reduktion von N<sub>2</sub>O stabilisiert.

Die Beschreibung der Grundzustandswellenfunktion des Cu<sub>Z</sub>-Zentrums vereinfacht auch das Verständnis seiner anderen charakteristischen spektroskopischen Eigenschaften erheblich. Abbildung 8a zeigt das Resonanz-Raman-Spektrum des Cu<sub>Z</sub>-Zentrums (Anregungswellenlänge λ = 624.4 nm).<sup>[29]</sup> Drei dominierende Banden bei 366, 386 und 415 cm<sup>-1</sup> sind zu sehen, alle werden durch <sup>34</sup>S-Isotopenmarkierung in Richtung niedrigerer Frequenzen verschoben.<sup>[38]</sup> Die Lage der Banden und die <sup>34</sup>S-Isotopenverschiebung lassen darauf schließen, dass diese drei Schwingungen auf Cu-S-Streckschwingungen basieren. Die beobachteten

Schwingungen können mithilfe eines Cu<sub>4</sub>S-Clustermodeells mit angenäherter C<sub>S</sub>-Symmetrie und einer Cu<sub>I</sub>-S-Cu<sub>II</sub>-Spiegelebene verstanden werden (Abbildung 2).<sup>[25]</sup> Im Cluster gibt es vier Cu-S-Bindungen und daher insgesamt vier Cu-S-Streckschwingungsmoden: zwei symmetrische (mit A'-Symmetrie in der C<sub>S</sub>-Punktgruppe) Cu<sub>I</sub>-S- und Cu<sub>II</sub>-S-Schwingungsmoden in der Cu<sub>I</sub>-S-Cu<sub>II</sub>-Spiegelebene („in plane“) und zwei Schwingungsmoden „out of plane“, wovon eine die symmetrische(plus)-Kombination der Cu<sub>III</sub>-S- und Cu<sub>IV</sub>-S-Schwingungsmoden und die andere die antisymmetrische Kombination (minus, A"-Symmetrie) der Cu<sub>III</sub>-S- und Cu<sub>IV</sub>-S-Schwingungsmoden ist. Antisymmetrische Schwingungsmoden werden nicht resonanzverstärkt,<sup>[39]</sup> daher werden nur die drei symmetrischen Schwingungsmoden im Resonanz-Raman-Spektrum erwartet und auch experimentell beobachtet (Abbildung 8a). Die individuellen Cu-S-Bindungsstärken können durch eine Normalkoordinatenanalyse der beobachteten Schwingungsfrequenzen und der <sup>34</sup>S-Isotopenverschiebungen bestimmt werden.<sup>[29]</sup> Die Cu<sub>I</sub>-S-Bindung ist die stärkste Bindung (ca. 3.3 mdyn Å<sup>-1</sup>), die Cu<sub>II</sub>-S-Bindung die zweitstärkste (ca. 3.1 mdyn Å<sup>-1</sup>), und die Cu<sub>III</sub>-S- und Cu<sub>IV</sub>-S-Bindungen sind die schwächsten Bindungen (ca. 1.3 mdyn Å<sup>-1</sup>). Das Bindungsstärkenmuster der vier Cu-S-Bindungen spiegelt die elektronische Struktur des Cu<sub>Z</sub>-Clusters mit L = H<sub>2</sub>O wider: Cu<sub>I</sub> ist am stärksten oxidiert, Cu<sub>II</sub> erhält einen leicht oxidierten Charakter durch Elektronendelokalisierung über die Sulfidbrücke zu Cu<sub>I</sub>, und Cu<sub>III</sub> sowie Cu<sub>IV</sub> sind hauptsächlich reduziert.

Abbildung 8b enthält die Anregungsprofile der beobachteten Resonanz-Raman-Schwingungen, überlagert mit dem Absorptionsspektrum des Cu<sub>Z</sub>-Zentrums.<sup>[29]</sup> Alle drei Cu-S-Streckschwingungen werden durch Anregung im Bereich der breiten CT-Absorptionsbande bei ca. 640 nm (ca. 15650 cm<sup>-1</sup>) resonanzverstärkt, was auf ihre S → Cu-CT-Natur hinweist. Drei individuelle elektronische Übergänge, bei ca. 14300, 15700 und 16500 cm<sup>-1</sup>, konnten mithilfe der Resonanz-Raman-Anregungsprofile bestimmt werden. Diese drei Übergänge stammen von Anregungen aus den drei p-Orbitalen des μ<sub>4</sub>-verbrückenden Sulfids.

In den Absorptions- und MCD-Spektren des Cu<sub>Z</sub>-Clusters, die am Anfang dieses Kurzaufsatzes angesprochen wurden (Abbildung 3a), können die Banden experimentell durch eine Gauß-Analyse bestimmten Übergängen zugeordnet werden (Abbildung 9).<sup>[29]</sup> Die Wellenfunktion des Grundzustands (Spin-down-LUMO) – eine σ-antibindende Kombination hauptsächlich des Cu<sub>I</sub>-d<sub>x<sup>2</sup>-y<sup>2</sup></sub>- und des Schwefel-p<sub>x'</sub>-Orbitals – ist das Acceptororbital für alle elektronischen Übergänge. Drei CT-Banden für S → Cu wurden durch die Resonanz-Raman-Anregungsprofile identifiziert (Abbildung 8b und die Banden 5, 6, 7 in Abbildung 9). Bande 6 hat im Absorptionsspektrum die größte Intensität dieser drei Banden und kann dem Übergang Schwefel-p<sub>x'</sub> → Spin-down-LUMO zugeordnet werden. Bei diesem Übergang ist das Donororbital das direkte bindende Gegenüber des Acceptororbitals; daher hat dieser Übergang die größte Donor-Acceptor-Orbitalüberlappung und die größte Intensität im Absorptionsspektrum. Bande 5 kommt vom schwächsten S → Cu-CT-Übergang, nämlich dem Übergang aus dem Schwefel-p<sub>z'</sub>-Orbital. Dieses Schwefel-p<sub>z'</sub>-Orbital steht senkrecht zum



**Abbildung 8.** a) Resonanz-Raman-Spektrum des Cu<sub>Z</sub>-Zentrums (Anregungswellenlänge λ = 624.4 nm). In Klammern sind die <sup>34</sup>S-Isotopenverschiebungen angegeben. b) Anregungsprofile der resonanzverstärkten Cu<sub>Z</sub>-Schwingungen, überlagert mit dem Tieftemperaturabsorptionspektrum. RR = Resonanz-Raman

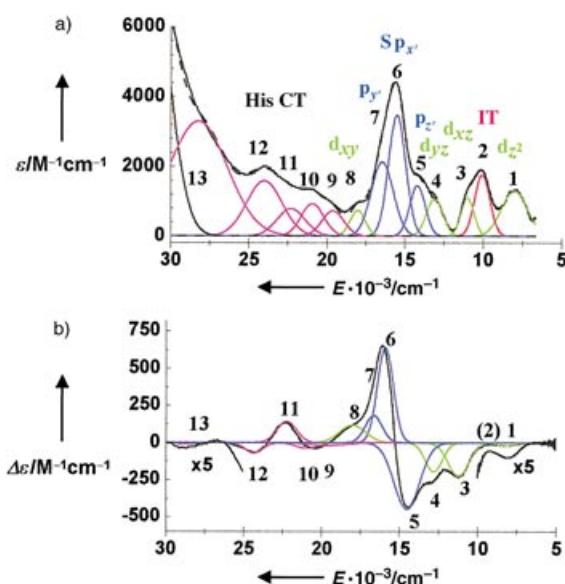


Abbildung 9. a) Absorptionsspektrum und b) MCD-Spektrum bei 10 K bzw. 5 K und 7 T des Cu<sub>2</sub>-Clusters mit durch Gauß-Analyse aufgelösten Banden.

Cu<sub>1</sub>-d<sub>x<sub>2</sub>-y<sub>2</sub></sub>-Acceptororbital (d.h. schlechte Donor/Acceptor-Überlappung), was zu einer schwachen Bandenintensität führt. Bande 7 ist von mittlerer Intensität und röhrt vom CT-Übergang aus dem Schwefel-p<sub>y'</sub>-Orbital her. Nur das oxidierte Cu<sup>I</sup> kann Ligandenfeld(d-d)-Übergänge vorweisen (Banden 1, 3, 4 und 8, Abbildung 9). Diese d-d-Übergänge haben wegen der starken Spin-Bahn-Kopplung des Kupferzentrums ( $\xi(\text{Cu}^{\text{II}}) \approx -830 \text{ cm}^{-1}$ ) ein großes MCD/Absorptions-Intensitätsverhältnis.<sup>[40]</sup> Interessanterweise findet der Übergang d<sub>xy</sub>→Spin-down-LUMO bei ca. 18000 cm<sup>-1</sup> statt, d.h. bei sehr hoher Energie im Vergleich zu jener in normalen tetragonalen Cu<sup>II</sup>-Komplexen.<sup>[41]</sup> Die hohe Energie ist in der Koordinationsgeometrie des Cu<sub>1</sub>-Zentrums begründet, in der zwei Histidinliganden und ein Sulfidligand eine verzerrte T-Struktur bilden.<sup>[29]</sup> Diese hohe Energie des d<sub>xy</sub>-Übergangs ist die Ursache für den kleinen g<sub>||</sub>-Wert (ca. 2.16) des Cu<sub>2</sub>-Clusters, denn die Kovalenz des verbrückenden Sulfids ist zu niedrig (ca. 15–22 % Schwefelcharakter im Grundzustand, Abbildung 6b) um einen Grund für diesen kleinen g<sub>||</sub>-Wert zu sein. Bande 2 im Absorptionsspektrum kann als Intervallenz-Charge-Transfer(IT)-Übergang identifiziert werden.<sup>[29]</sup> Dieser IT-Übergang ist in nur eine Richtung polarisiert und hat daher keine MCD-Intensität bei tiefen Temperaturen (Abbildung 9 b).<sup>[42]</sup> Formal gesehen entspricht er einem Cu<sup>I</sup>(d<sup>10</sup>)→Cu<sup>II</sup>(d<sup>9</sup>)-Elektronenübergang und spiegelt die elektronische Kopplung und die Delokalisierung der Elektronen zwischen den Kupferatomen, vermittelt durch das verbrückende Sulfid, wider. Die Banden bei höheren Energien (9 – 13, Abbildung 9) können Histidin → Kupfer-CT-Übergängen zugeordnet werden. Verglichen mit CT-Übergängen in tetragonalen Kupfer-Imidazol-Modellkomplexen<sup>[41]</sup> haben sie niedrige Energien, was auf die niedrige Dreifachkoordination des Cu<sub>1</sub>-Zentrums im Cu<sub>2</sub>-Cluster zurückgeführt werden kann.

### 3. Der katalytisch aktive Zustand des Cu<sub>2</sub>-Zentrums

Untersuchungen haben gezeigt, dass N<sub>2</sub>OR in vitro durch Inkubation mit Methylviologen, das mit Dithionit reduziert wurde, aktiviert werden kann und dass längere Inkubationszeiten zu höherer Enzymaktivität führen.<sup>[28,43–46]</sup> Um die katalytisch aktive Form des Cu<sub>2</sub>-Zentrums zu bestimmen, wurden X-Band-EPR-Spektren von N<sub>2</sub>OR nach unterschiedlichen Inkubationszeiten in einer Lösung von überschüssigem Methylviologen und Dithionit gemessen (Abbildung 10 a).<sup>[31]</sup>

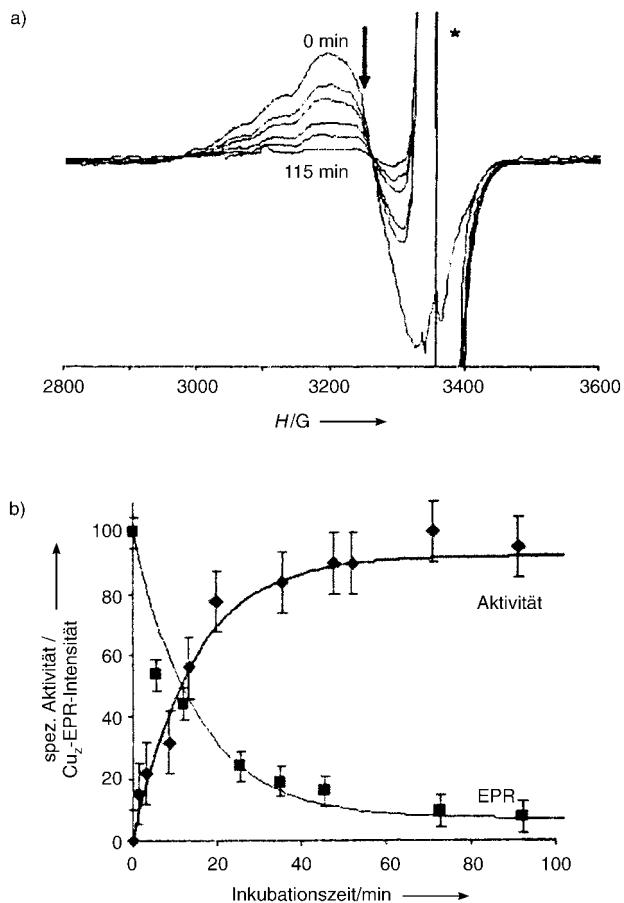


Abbildung 10. a) Zeitabhängigkeit des Cu<sub>2</sub>-EPR-Signals. \*: Methylviologen-Radikalsignal. b) Zeitliche Korrelation zwischen der Pn-N<sub>2</sub>OR-Aktivität (100% bezieht sich auf die Reduktion von 275 μmol N<sub>2</sub>O min<sup>-1</sup> (mg Enzym)<sup>-1</sup>) und dem Cu<sub>2</sub>-EPR-Signal (100% bezieht sich auf den 1 Cu<sup>II</sup>/3 Cu<sup>I</sup>-Zustand des Cu<sub>2</sub>-Clusters).

Bei  $t = 0$  zeigt das Spektrum das charakteristische EPR-Signal des Cu<sub>2</sub>-Zentrums im Ruhezustand (1 Cu<sup>II</sup>/3 Cu<sup>I</sup>) mit  $g_{||} = 2.16$ . Die Signalintensität nimmt allmählich mit zunehmender Inkubationszeit ab. Da das Cu<sub>2</sub>-Zentrum im 1 Cu<sup>II</sup>/3 Cu<sup>I</sup>-Zustand nur eine Elektronenlücke aufweist, deutet die Abnahme des Cu<sub>2</sub>-EPR-Signals in dieser reduzierenden Lösung darauf hin, dass alle vier Kupferionen des Cu<sub>2</sub>-Clusters in ihrer reduzierten Form vorliegen. Aktivitätsuntersuchungen mit ähnlichen Inkubationszeiten zeigen eine steigende Enzymaktivität mit zunehmender Inkubationszeit. Die Aktivitätszunahme kann direkt mit der Abnahme des EPR-Signals des Cu<sub>2</sub>-Clusters korreliert werden (Abbildung 10b).<sup>[31]</sup> Dieser

direkte Zusammenhang der Enzymaktivität mit der Reduktion des Cu<sub>Z</sub>-Clusters weist darauf hin, dass die katalytisch aktive Form des Cu<sub>Z</sub>-Clusters der vollständig reduzierte 4Cu<sup>I</sup>-Zustand ist.<sup>[47]</sup> Aktuelle Absorptionsspektroskopie-Versuche und Versuche mit markiertem Stickstoff sind im Einklang mit diesen Ergebnissen.<sup>[48]</sup>

#### 4. N<sub>2</sub>O-Aktivierung und die Rolle des vierkernigen Cu<sub>Z</sub>-Clusters

Mit der Beschreibung der elektronischen Struktur des Cu<sub>Z</sub>-Clusters im Ruhezustand und der Bestimmung des katalytisch aktiven Zustands kann die von diesem Cluster katalysierte Zweielektronenreduktion von N<sub>2</sub>O zu N<sub>2</sub> nun genauer betrachtet werden. Die katalytisch aktive, elektronenreiche Form des Cu<sub>Z</sub>-Clusters besteht aus vier reduzierten Cu<sup>I</sup>-Ionen. An der Substratbindungsstelle zwischen den Cu<sub>I</sub>- und Cu<sub>IV</sub>-Ionen (Abbildung 2) kann das Substrat N<sub>2</sub>O sowohl mit Cu<sub>I</sub> als auch mit Cu<sub>IV</sub> wechselwirken, möglicherweise in einer verbrückenden Bindungsweise (Abbildung 11). Zwei

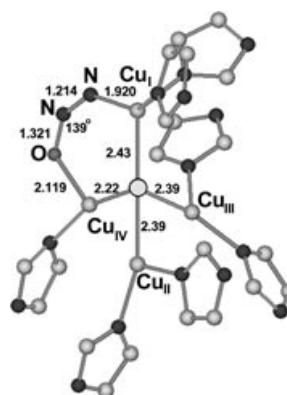


Abbildung 12. DFT-optimierte Geometrie des N<sub>2</sub>O-Komplexes im 4Cu<sup>I</sup>-Zustand des Cu<sub>Z</sub>-Clusters.<sup>[31]</sup>

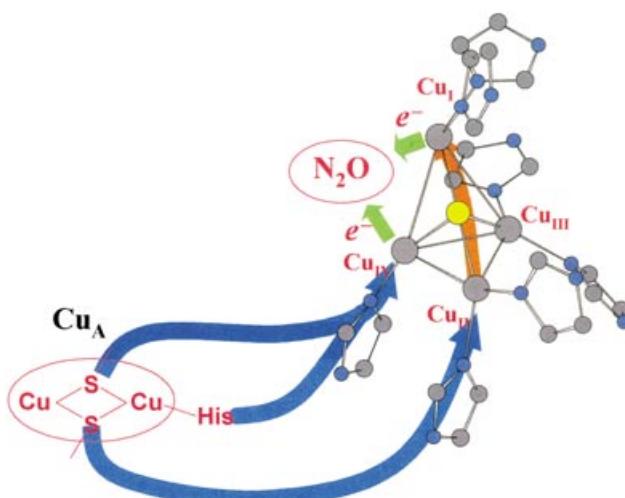


Abbildung 11. Reduktion von N<sub>2</sub>O am Cu<sub>Z</sub>-Zentrum.

Elektronen könnten gleichzeitig von Cu<sub>I</sub> und Cu<sub>IV</sub> abgegeben werden, um die Reaktionsbarriere der N<sub>2</sub>O-Reduktion zu überwinden. Vom benachbarten Cu<sub>A</sub>-Zentrum in der zweiten Untereinheit des dimeren N<sub>2</sub>OR-Proteins zu den Cu<sub>II</sub>- und Cu<sub>IV</sub>-Zentren existieren gute Elektronenübertragungspfade,<sup>[30]</sup> die in Kombination mit der delokalisierten elektronischen Struktur des Cu<sub>Z</sub>-Clusters dessen schnelle Rückreduktion im enzymatischen Katalysekreislauf ermöglichen. Die Delokalisierung der Elektronen über das verbrückende Sulfid trägt zu einer niedrigen Reorganisationsenergie beim Redoxprozess bei und führt zu einer Stabilisierung der oxidierten Form des Cu<sub>Z</sub>-Zentrums nach der N<sub>2</sub>O-Reduktion.

Die möglichen Wechselwirkungen zwischen N<sub>2</sub>O und der katalytisch aktiven 4Cu<sup>I</sup>-Form des Cu<sub>Z</sub>-Clusters wurden auch mit theoretischen Methoden untersucht.<sup>[31]</sup> Abbildung 12 zeigt die energetisch günstigste Struktur des Cu<sub>Z</sub>(4Cu<sup>I</sup>)-N<sub>2</sub>O-Komplexes mit einem gewinkelten  $\mu$ -1,3-verbrückenden

N<sub>2</sub>O zwischen den Cu<sub>I</sub>- und Cu<sub>IV</sub>-Ionen (N-N-O = 139°). Das endständige N-Atom ist an Cu<sub>I</sub> koordiniert; andere Bindungsarten von N<sub>2</sub>O an den Cu<sub>Z</sub>-Cluster sind energetisch ungünstiger. Die Krümmung des gebundenen N<sub>2</sub>O im Cu<sub>Z</sub>(4Cu<sup>I</sup>)-N<sub>2</sub>O-Komplex führt zu einer Aufspaltung des im freien N<sub>2</sub>O zweifach entarteten LUMO in zwei  $\pi^*$ -Orbitale ( $\Delta E \approx 2$  eV). Das  $\pi^*$ -LUMO in der N-N-O-Ebene ist wegen seines verringerten antibindenden Charakters um ca. 3 eV stabilisiert (Abbildung 13b). Dadurch rückt das Energieniveau dieses N<sub>2</sub>O- $\pi^*$ -Orbitals näher an diejenigen der vollbesetzten d-Orbitale des Cu<sub>Z</sub>(4Cu<sup>I</sup>)-Clusters, wodurch der N<sub>2</sub>O-Ligand zu einem sehr guten Elektronenacceptor wird. Das LUMO des Cu<sub>Z</sub>(4Cu<sup>I</sup>)-N<sub>2</sub>O-Komplexes (Abbildung 13a) hat einen N<sub>2</sub>O- $\pi^*$ -Charakter von 54 % mit einem d-Orbitalanteil von 12 % Cu<sub>I</sub> und 10 % Cu<sub>IV</sub>; dies weist auf beträchtliche Cu-d $\rightarrow$ N<sub>2</sub>O- $\pi^*$ -Rückbindungswechselwirkungen vom vollständig reduzierten Cu<sub>Z</sub>-Zentrum zum gebun-

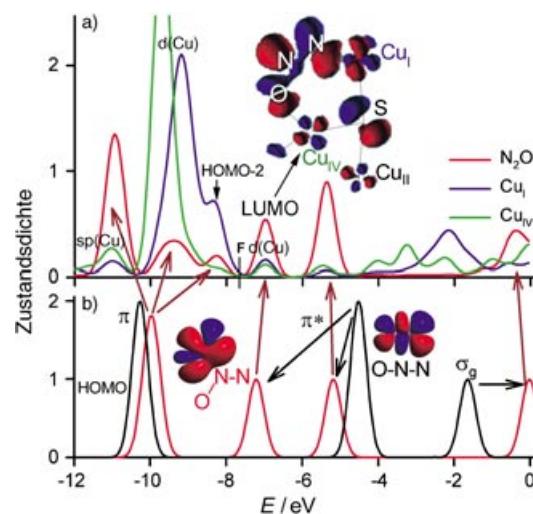
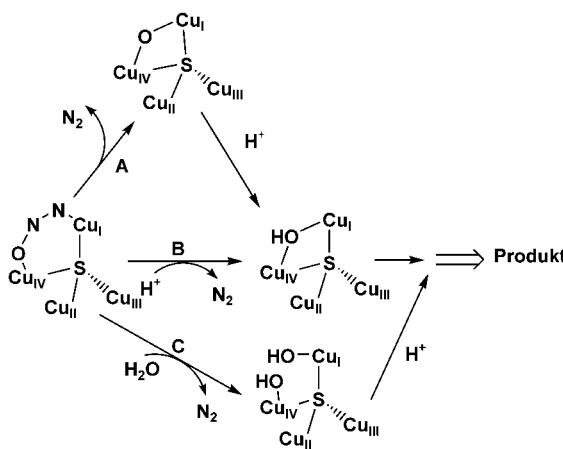


Abbildung 13. a) Beiträge von N<sub>2</sub>O, Cu<sub>I</sub> und Cu<sub>IV</sub> zur Zustandsdichte des Cu<sub>Z</sub>(4Cu<sup>I</sup>)-N<sub>2</sub>O-Komplexes. Das Fermi-Niveau ist als F angezeigt. Bild: LUMO des Cu<sub>Z</sub>(4Cu<sup>I</sup>)-N<sub>2</sub>O. b) Zustandsdichte des N<sub>2</sub>O-Moleküls in linearer Anordnung (schwarze Linie) und in der gewinkelten Anordnung des N<sub>2</sub>O-Liganden im gleichen Coulomb-Potential wie im Cu<sub>Z</sub>(4-Cu<sup>I</sup>)-N<sub>2</sub>O-Komplex (rote Linie). Bilder: LUMO des gewinkelten (links) und linearen N<sub>2</sub>O (rechts).

denen N<sub>2</sub>O hin. Diese werden in der Ladung des gebundenen N<sub>2</sub>O von -0.53 und der Verlängerung der N-N- und N-O-Bindungen (+0.03 bzw. +0.07 Å) deutlich. Diese starken Rückbindungswechselwirkungen vom Cu<sub>2</sub>(4Cu<sup>I</sup>) zum N<sub>2</sub>O sind nur dann vorhanden, wenn N<sub>2</sub>O in einer gewinkelten, μ-1,3-verbrückenden Weise zwischen dem Cu<sub>I</sub>-und dem Cu<sub>IV</sub>-Ion koordiniert ist. Andere Bindungsarten weisen wesentlich (vier- bis fünfmal) kleinere Rückbindungswechselwirkungen auf. Die elektronischen Wechselwirkungen zwischen dem vollständig reduzierten Cu<sub>2</sub>-Cluster und dem koordinierten N<sub>2</sub>O-Liganden spielen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung und Reduktion von N<sub>2</sub>O und führen letztendlich zur Spaltung der N-O-Bindung. Die N-O-Bindung wird durch die Cu-d→N<sub>2</sub>O-π\*-Rückbindungswechselwirkungen erheblich geschwächt, und bei gleichzeitiger Übertragung zweier Elektronen vom Cu<sub>2</sub>-Zentrum zum μ-1,3-verbrückenden N<sub>2</sub>O kann sie direkt gespalten werden (Schema 1, Reaktions-



**Schema 1.** Mögliche Reaktionswege (A–C) für die Reduktion von N<sub>2</sub>O am Cu<sub>2</sub>-Zentrum.

weg A). Zudem erhöhen diese Rückbindungswechselwirkungen die Elektronendichte am Sauerstoffatom des gebundenen N<sub>2</sub>O-Moleküls (Ladung = -0.5) und aktivieren es so für den elektrophilen Angriff durch ein Proton (Schema 1, Reaktionsweg B). Das HOMO-2 des Cu<sub>2</sub>(4Cu<sup>I</sup>)-N<sub>2</sub>O-Komplexes, das nahe am HOMO liegt und einen starken Sauerstoffcharakter hat (Abbildung 13 a), kann gut als Donorgrenzmolekülorbital für die Protonierung fungieren. Dieser und andere mögliche Reaktionswege (Schema 1, Reaktionsweg C), die zur reduktiven Spaltung der N-O-Bindung in N<sub>2</sub>O führen, werden zurzeit genauer untersucht. DFT-Rechnungen<sup>[50]</sup> weisen auf B als sehr günstigen Reaktionsweg hin: Eine Protonierung des Sauerstoffatoms von koordiniertem N<sub>2</sub>O führt zu einer barrierelosen Spaltung der N–O-Bindung.

## 5. Zusammenfassung

Spektroskopische Methoden in Verbindung mit DFT-Rechnungen wurden angewendet, um den Spinzustand, die Oxidationsstufen der Kupferatome, die Spinverteilung und die Grundzustandswellenfunktion des Cu<sub>2</sub>-Zentrums zu be-

stimmen. Damit können die ungewöhnlichen Eigenschaften seiner Schwingungsspektren und optischen Spektren besser verstanden werden. Die Beschreibung der elektronischen Struktur des Cu<sub>2</sub>-Zentrums im Ruhezustand und die Aufklärung der katalytisch aktiven Form als vollständig reduzierte 4Cu<sup>I</sup>-Stufe führte zum Verständnis der Rolle des μ<sub>4</sub>-sulfidverbrückten vierkernigen Kupferclusters bei der Aktivierung von N<sub>2</sub>O für die Zweiselektronenreduktion. Die starken Rückbindungswechselwirkungen zum N<sub>2</sub>O-Liganden im Cu<sub>2</sub>(4Cu<sup>I</sup>)-N<sub>2</sub>O-Komplex – in dem N<sub>2</sub>O in einer gewinkelten, μ-1,3-verbrückenden Weise koordiniert ist – aktivieren die reduktive Spaltung der O–N<sub>2</sub>-Bindung.

Eingegangen am 19. Dezember 2003 [M1734]

Online veröffentlicht am 30. Juni 2004

- [1] R. A. Sheldon, J. K. Kochi, *Metal-Catalyzed Oxidations of Organic Compounds*, Academic, New York, **1981**.
- [2] D. R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 76. Aufl., CRC, New York, **1996**.
- [3] W. L. Jolly, *The Inorganic Chemistry of Nitrogen*, W. A. Benjamin, New York, **1964**.
- [4] F. Bottomley, I. J. B. Lin, M. Mukaida, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5238.
- [5] G. A. Vaughan, G. L. Hillhouse, R. T. Lum, S. L. Buchwald, A. L. Rheingold, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7215.
- [6] G. A. Vaughan, P. B. Rupert, G. L. Hillhouse, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5538.
- [7] P. T. Matsunaga, G. L. Hillhouse, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2075.
- [8] F. Bottomley, J. Darkwa, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1983**, 399.
- [9] J. N. Armor, H. Taube, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6874.
- [10] J. T. Groves, J. S. Roman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5594.
- [11] M. R. Smith III, P. T. Matsunaga, R. A. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7049.
- [12] K. Koo, G. L. Hillhouse, A. L. Rheingold, *Organometallics* **1995**, *14*, 456.
- [13] F. Bottomley, W. V. F. Brooks, *Inorg. Chem.* **1976**, *15*, 501.
- [14] J. N. Armor, H. Taube, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1971**, 287.
- [15] A. Zecchina, L. Cerruti, E. Borello, *J. Catal.* **1972**, *25*, 55.
- [16] W. G. Zumft, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, *61*, 533.
- [17] W. G. Zumft, P. M. H. Kroneck in: *Mechanisms of Metallocenter Assembly* (Hrsg.: R. P. Hausinger, G. L. Eichhorn, L. G. Marzilli), Wiley-VCH, Weinheim, **1996**, S. 193.
- [18] F. Neese, Dissertation, Universität Konstanz, **1996**.
- [19] F. Neese, W. G. Zumft, W. E. Antholine, P. M. H. Kroneck, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8692.
- [20] D. R. Gamelin, D. W. Randall, M. T. Hay, R. P. Houser, T. C. Mulder, G. W. Canters, S. d. Vries, W. B. Tolman, Y. Lu, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5246.
- [21] J. A. Farrar, A. J. Thomson, M. R. Cheesman, D. M. Dooley, W. G. Zumft, *FEBS Lett.* **1991**, *294*, 11.
- [22] J. A. Farrar, W. G. Zumft, A. J. Thomson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9891.
- [23] K. Brown, M. Tegoni, M. Prudencio, A. S. Pereira, S. Besson, J. J. Moura, I. Moura, C. Cambillau, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 191.
- [24] T. Rasmussen, B. C. Berks, J. Sanders-Loehr, D. M. Dooley, W. G. Zumft, A. J. Thomson, *Biochemistry* **2000**, *39*, 12753.
- [25] K. Brown, K. Djinovic-Carugo, T. Haltia, I. Cabrito, M. Saraste, J. J. G. Moura, I. Moura, M. Tegoni, C. Cambillau, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 41133.
- [26] T. Haltia, K. Brown, M. Tegoni, C. Cambillau, M. Saraste, K. Mattila, K. Djinovic-Carugo, *Biochem. J.* **2003**, *369*, 77.

- [27] Cu<sub>Z</sub> im Ruhezustand wurde durch Behandlung des isolierten N<sub>2</sub>OR-Enzyms mit einer Lösung von Dithionit im Überschuss hergestellt; dadurch wird das Cu<sub>A</sub>-Zentrum im Protein zu der spektroskopisch inaktiven Cu<sup>I</sup>/Cu<sup>I</sup>-Stufe reduziert und trägt nicht zu den Absorptions-, MCD- und EPR-Spektren bei. Siehe Lit. [28] und [30].
- [28] M. Prudêncio, A. S. Pereira, P. Tavares, S. Besson, I. Cabrito, K. Brown, B. Samyn, B. Devreese, J. VanBeeumen, F. Rusnak, G. Fauque, J. J. G. Moura, M. Tegoni, C. Cambillau, I. Moura, *Biochemistry* **2000**, *39*, 3899.
- [29] P. Chen, I. Cabrito, J. J. G. Moura, I. Moura, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10497.
- [30] P. Chen, S. DeBeer George, I. Cabrito, W. E. Antholine, J. J. G. Moura, I. Moura, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 744.
- [31] S. Ghosh, S. I. Gorelsky, P. Chen, I. Cabrito, J. J. G. Moura, I. Moura, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15708.
- [32] F. Neese, E. I. Solomon, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 1847.
- [33] L. S. Kau, D. J. Spira-Solomon, J. E. Penner-Hahn, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6433.
- [34] E. I. Solomon, *Comments Inorg. Chem.* **1984**, *3*, 227.
- [35] B. R. McGarvey, *Transition Metal Chemistry*, Vol. 3 (Hrsg.: R. L. Carlin), Dekker, New York, **1966**, S. 89.
- [36] F. Neese, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 4854.
- [37] S. DeBeer George, S. Ghosh, S. I. Gorelsky, J. M. Chan, D. M. Dooley, E. I. Solomon, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [38] M. L. Alvarez, J. Y. Ai, W. Zumft, J. Sanders-Loehr, D. M. Dooley, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 576.
- [39] R. S. Czernuszewicz, T. G. Spiro in *Inorganic Electronic Structure and Spectroscopy*, Vol. 1 (Hrsg.: E. I. Solomon, A. B. P. Lever), Wiley, New York, **1999**, S. 353.
- [40] A. A. Gewirth, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3811.
- [41] A. B. P. Lever, *Inorganic Electronic Spectroscopy*, 2. Aufl., Elsevier Science, Amsterdam, **1984**.
- [42] E. I. Solomon, E. G. Pavel, K. E. Loeb, C. Campochiaro, *Coord. Chem. Rev.* **1995**, *144*, 369.
- [43] S. Ferretti, J. G. Grossmann, S. S. Hasnain, R. R. Eady, B. E. Smith, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *259*, 651.
- [44] J. K. Kristjansson, T. C. Hollocher, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 704.
- [45] S. W. Snyder, T. C. Hollocher, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 6515.
- [46] B. C. Berks, D. Baratta, D. J. Richardson, S. J. Ferguson, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 467.
- [47] Die niedrige Reduktionsgeschwindigkeit des Cu<sub>Z</sub>-Zentrums im Ruhezustand ( $1\text{Cu}^{\text{II}}/3\text{Cu}^{\text{I}}$ ) weist darauf hin, dass diese Spezies nicht an der Katalyse beteiligt ist, und dass die Geschwindigkeit der Rückreduktion des durch N<sub>2</sub>O oxidierten Cu<sub>Z</sub>-Zentrums im enzymatischen Katalyzykreislauf sehr hoch ist.
- [48] J. M. Chan, J. A. Bollinger, C. L. Grewell, D. M. Dooley, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3030.
- [49] Vorausgegangene Rechnungen für den Cu<sub>Z</sub>-Cluster mit L = H<sub>2</sub>O wurden mit einem vereinfachten Modell ausgeführt, in dem die Histidinliganden durch NH<sub>3</sub> modelliert wurden (P. Chen, S. DeBeer George, I. Cabrito, W. E. Antholine, J. J. G. Moura, I. Moura, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 744; P. Chen, I. Cabrito, J. J. G. Moura, I. Moura, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10497). Die hier präsentierten Ergebnisse sind den früheren Werten sehr ähnlich.
- [50] S. I. Gorelsky, S. Ghosh, E. I. Solomon, unveröffentlichte Ergebnisse