

„Schnappschüsse“ von Strukturen entlang der Reaktionswege von Nicht-Häm-Eisenenzymen**

Joseph P. Emerson, Erik R. Farquhar und Lawrence Que, Jr.*

Bioanorganische Chemie · Metalloenzyme ·
Nicht-Häm-Eisenkomplexe · Sauerstoffaktivierung ·
Superoxid-Reduktase

Disauerstoff und andere reaktive Sauerstoffspezies reagieren auf verschiedenste Weise mit biologischen Nicht-Häm-Eisenzentren. Trotz vieler kinetischer und spektroskopischer Untersuchungen zu den Wechselwirkungen von Eisen mit Disauerstoff und ähnlichen reduzierten Sauerstoffspezies^[1] gibt es nur wenige Beispiele mit detaillierten Strukturdaten für die koordinationschemischen Aspekte der Reaktionen von Disauerstoffspezies mit einkernigen Nicht-Häm-Eisenkomplexen. Veröffentlichungen von Katona et al.^[2] sowie von Kovaleva und Lipscomb^[3] in *Science* fügten nun sechs weitere erstaunliche Spezies hinzu, die aus den Wechselwirkungen von O_2 oder H_2O_2 und aktiven Nicht-Häm-Eisenzentren hervorgehen. Durch diese biologischen Disauerstoff-Addukte aus *Brevibacterium-fuscum*-Homoprotocatechuat-2,3-dioxygenase (HPCD) und der *Desulfoarculus-baarsii*-Superoxid-Reduktase (SOR) Variante E114A hat sich die Zahl der strukturanalytisch charakterisierten Addukte von Disauerstoff oder reduziertem Disauerstoff an einkernige Nicht-Häm-Eisenzentren nahezu verdoppelt, sodass wir nun eine bessere Vorstellung davon haben, wie Disauerstoffspezies mit biologischen Nicht-Häm-Eisenzentren wechselwirken. Für diese Reaktionen von Disauerstoff und Superoxid mit Eisen wurde ein allgemeiner Mechanismus formuliert (Abbildung 1).^[1]

Im ersten Schritt der Disauerstoff-Aktivierung koordiniert O_2 an ein Eisen(II)-Zentrum. Das dabei entstehende Addukt wird normalerweise als eine Eisen(III)-Superoxid-Spezies beschrieben,^[4] in der ein Elektron vom Eisenzentrum auf die Disauerstoffeinheit übertragen wurde. Der nächste Schritt erfordert es, dass weitere Elektronen von einem Substrat oder einem Cofaktor, beispielsweise α -Ketoglutarat, Tetrahydrobiopterin oder anderen redoxaktiven Spezies, zum gebundenen O_2 gelangen. Dies ermöglicht die weitere Reduktion der Disauerstoff-Spezies über die Peroxostufe und führt schließlich zur Spaltung der O-O-Bindung und der ge-

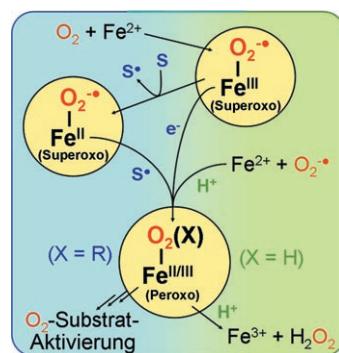


Abbildung 1. Intermediate bei der O_2 -Aktivierung und $O_2^{-\bullet}$ -Reduktion an Nicht-Häm-Eisenzentren. Die Umwandlung von S in S^\bullet geht mit einer Elektronenübertragung auf die $Fe^{III-O_2^{-\bullet}}$ -Gruppe durch das Substrat auf dem HPCD-Reaktionsweg einher.

wünschten Oxidation des Substrats. Das gebundene Superoxid kann anderenfalls dissoziieren, sodass reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt werden, die Biomoleküle oxidativ schädigen können.^[5] Die Natur hat mehrere Verteidigungsmechanismen entwickelt, um die Lebensdauer von Superoxid in Zellen zu minimieren. Eine solche Strategie ist die direkte Reduktion von $O_2^{-\bullet}$ zu H_2O_2 ; dieser Vorgang wird durch die Superoxid-Reduktase katalysiert, die in vielen anaeroben Bakterien und Archaea entscheidend am $O_2^{-\bullet}$ -Abbau beteiligt ist.^[1b,6] Das einkernige Nicht-Häm-Eisen(II)-Zentrum von SOR reagiert mit Superoxid vermutlich zu einer Eisen(III)-Peroxozentrum, deren Protonierungszustand allerdings noch nicht bekannt ist.^[1b]

In ihrem *Science*-Beitrag zum Mechanismus der O_2 -Aktivierung durch Arenring-spaltende Dioxygenasen beschreiben Kovaleva und Lipscomb eine neue Röntgenkristallstruktur von HPCD, an dessen Eisenzentrum das Substrat-analogon 4-Nitrocatechol (4-NC) gebunden ist.^[3] Der Kristall wurde in schwach sauerstoffhaltiger Atmosphäre gezüchtet, und die Struktur wurde mit einer Auflösung von 1.95 Å ermittelt. Bemerkenswerterweise waren in jeder homotetrameren Packungsanordnung drei unterschiedliche Spezies zu beobachten, die das 4-NC-gebundene Eisenzentrum in verschiedenen Phasen seiner Reaktion mit O_2 zeigen. Anhand der Side-on-Disauerstoff-Spezies in Untereinheit C konnte die Elektronendichte um das 4-NC-koordinierte Metallzen-

[*] Dr. J. P. Emerson, E. R. Farquhar, Prof. Dr. L. Que, Jr.
Department of Chemistry
University of Minnesota
Minneapolis, MN 55455 (USA)
Fax: (+1) 612-624-7029
E-Mail: que@chem.umn.edu

[**] Unsere Arbeiten zu Nicht-Häm-Eisenenzymen werden von den National Institutes of Health unterstützt (GM-33126 für L.Q.).

trum abgeschätzt werden, während für die Untereinheiten B und D eine Alkylperoxy-Spezies formuliert wurde, um die Elektronendichte an den Eisenzentren zu erklären. Schließlich gab das Produkt einer Ringöffnung von 4-NC die Elektronendichte am Eisenzentrum der Untereinheit A am besten wieder, was eine enzymatische Umsetzung im Kristall nahelegt.

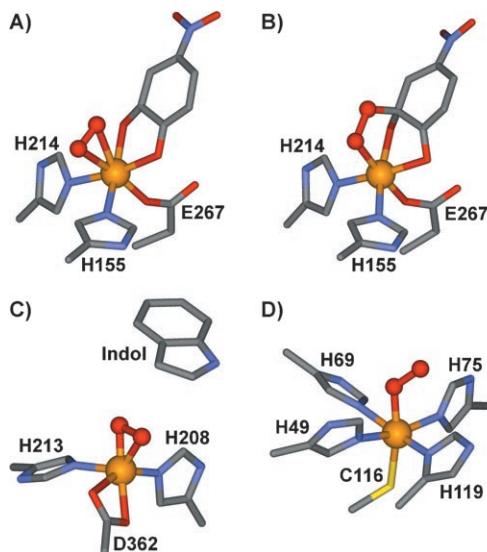


Abbildung 2. Strukturen aktiver Zentren der O_2 -Addukte verschiedener einkerniger Nicht-Häm-Eisenenzyme, die durch Röntgenkristallographie charakterisiert wurden. A) Das Side-on- O_2 -Addukt in Untereinheit C der Kristallstruktur des Komplexes aus *B. fuscum*-HPCD und dem Substrat 4-NC (2IGA.pdb). B) Das End-on- O_2 -Addukt in Untereinheit B (eine identische Struktur ist in Untereinheit D vorhanden) des Komplexes aus (A) (2IGA.pdb), die den Angriff eines Atoms von O_2 auf das 4-NC-Substrat veranschaulicht. C) Das Side-on- O_2 -Addukt in der Kristallstruktur von *Pseudomonas*-sp.-NDO in Gegenwart eines Indol-Substrats (1O7N.pdb). D) Das End-on- H_2O_2 -Addukt in der Untereinheit B der Kristallstruktur von E114A-SOR aus *D. baarsii* (2J13.pdb). Ähnliche Strukturen sind auch in den Untereinheiten C und D festzustellen.

Tabelle 1: Kristallographische Daten verschiedener Eisenspezies mit Disauerstoff- oder reduzierten Disauerstoffliganden, zusammengestellt aus den jeweiligen PDB-Dateien.^[a]

Enzym	Untereinheit	PDB-Datei	Auflösung [Å]	Bezeichnung	$r(Fe-O1)^{[b]}$ [Å]	$r(Fe-O2)^{[b]}$ [Å]	$r(O1-O2)^{[b]}$ [Å]
HPCD ^[3]	C	2IGA	1.95	η^2 - O_2 -(4-NC)-Addukt 1	2.43	2.52	1.31
	B			O_2 -(4-NC)-Addukt 2	2.22	2.81	1.53
	D			O_2 -(4-NC)-Addukt 2	2.09	2.82	1.53
E114A SOR ^[2]	B	2J13	1.95	η^1 - H_2O_2 -Addukt	2.00	3.10	1.46
	C			η^1 - H_2O_2 -Addukt	1.97	3.08	1.47
	D			η^1 - H_2O_2 -Addukt	2.04	3.07	1.47
HADO ^[7]		1YFW	2.0	η^1 - O_2 /Cl-HAA-Addukt	2.05	3.22	1.20
BPDO ^[8]	A	2GBW	1.7	η^2 - O_2 -Addukt	2.30	2.35	1.21
	C			η^2 - O_2 -Addukt	2.20	2.36	1.20
	E			η^2 - O_2 -Addukt	2.26	2.34	1.20
CumDO ^[9]		1WQL	2.2	η^1 - O_2 -Addukt	2.07	2.70	1.23
NDO ^[10]	1O7M	1O7N	1.95	η^2 - O_2 -Addukt	2.15	2.34	1.45
	1O7N			η^2 - O_2 -Indol-Addukt	1.73	1.98	1.46
SLO ^[12]		11K3	2.0	Produktkomplex	2.01	2.79	1.22

[a] Abkürzungen: 3-Hydroxyanthranilat-3,4-dioxygenase (HADO), Biphenyl-2,3-dioxygenase (BPDO), Cumoldioxygenase (CumDO), Naphthalin-dioxygenase (NDO), 4-Nitrocatechol (4-NC), 4-Chlor-3-hydroxyanthranilat (Cl-HAA). [b] Sämtliche Abstände wurden anhand der Koordinaten der PDB-Dateien gemessen.

Abbildung 2 A zeigt die Spezies, die Kovaleva und Lipscomb als Eisen-Superoxo-Spezies beschreiben. Die O-O-Bindung in der side-on gebundenen Disauerstoff-Gruppe ist ungefähr 1.3 Å lang, und die Fe-O-Bindungslängen betragen 2.3–2.4 Å. Auf den ersten Blick ist die O-O-Bindung so ausgerichtet, dass sie mit dem Kohlenstoffatom C2 von 4-NC in Wechselwirkung treten kann. Diese in HPCD gefundene Einheit ist unmittelbar vergleichbar mit den Fe- O_2 -Addukten in vier weiteren kristallographisch charakterisierten Nicht-Häm-Eisenenzymen (Tabelle 1) sowie einer verwandten Extradiol-Dioxygenase^[7] und drei Rieske-Dioxygenasen.^[8–11] Somit können in Tabelle 1 kristallographisch ermittelte Bindungslängen für sieben verschiedene Eisen-Sauerstoff-Spezies verglichen werden. Zwei Strukturen weisen end-on gebundenen Disauerstoff auf, während der Disauerstoff in drei weiteren side-on gebunden ist. Da die strukturanalytisch bestimmten O-O-Bindungslängen zwischen 1.2 und 1.4 Å schwanken, ist eine Zuordnung der Oxidationsstufen für diese O_2 -Addukte anhand der mäßig aufgelösten Protein-kristallstrukturen erschwert. Im Fall der HPCD-Struktur ist jedoch offensichtlich, dass das gebundene 4-NC nicht planar ist, sondern eine gefaltete Konformation einnimmt: Hier weicht das Kohlenstoffatom C2 von 4-NC bemerkenswert von einer sp^2 -Hybridisierung ab, was im Einklang mit einer Ein-elektronenoxidation des Catecholrings zu einem Semichinonring ist. Der nichtplanare Ring im gebundenen Substrat des HPCD-(4-NC)- O_2 -Addukts in Untereinheit C ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass in diesem Komplex eine Elektronenübertragung von 4-NC auf O_2 ausgelöst wurde. Daher kann man von einem Eisen(II)-Superoxo- oder Eisen(III)-Peroxo-Intermediat ausgehen.

Kovaleva und Lipscomb deuten dieses Disauerstoff-Addukt als Eisen(II)-Superoxo-Spezies, denn die Fe-O-Bindungen sind mit etwa 2.5 Å wesentlich länger als in side-on-gebundenen O_2 -Addukten (Tabelle 1). Besonders der in Abbildung 2C gezeigte (η^2 - O_2)-Indol-Komplex der Naphthalin-Dioxygenase (NDO) hat viel kürzere Fe-O-Bindungen (durchschnittlich 1.9 Å) und ist demnach als Eisen(III)-Per-

oxo-Spezies zu beschreiben. Die durchschnittlichen Fe-O-Bindungslängen der übrigen Fe-(η^2 -O₂)-Addukte liegen mit 2.2–2.3 Å zwischen den Extremen von NDO und HPCD, was eine Formulierung als Eisen(III)-Superoxo-Spezies nahelegt.

Die aktiven Zentren der HPCD-(4-NC)-O₂-Komplexe in den Untereinheiten B und D spiegeln schon einen späteren Zustand im Katalysezyklus wider. Die Eisen-Alkylperoxo-Spezies mit einem dreizähnigen Alkylperoxo-Ligand (Abbildung 2B) wird wahrscheinlich durch die Verknüpfung der oben beschriebenen reduzierten Disauerstoffeinheit mit dem oxidierten Catecholring erzeugt. Die O-O-Einheit (Bindungslänge 1.5 Å) wird hier end-on gebunden, weshalb Kovaleva und Lipscomb von einer Eisen(II)-Alkylperoxo-Spezies ausgehen. Das proximale Sauerstoffatom O1 verbleibt nahe am Eisenzentrum, während das distale Sauerstoffatom O2 etwa 2.8 Å vom Eisenzentrum entfernt ist und an das C2-Kohlenstoffatom von 4-NC bindet. Die einzige vergleichbare End-on-Alkylperoxo-Spezies, die strukturanalytisch nachgewiesen werden konnte, wurde in einem Enzym-Produkt-Komplex der Sojabohnen-Lipoxygenase (SLO) entdeckt und hat eine ähnliche Fe-O1-Bindungslänge wie die im System HPCD/4-NC/O₂ vermutete Alkylperoxo-Spezies, allerdings ist die O-O-Bindung in der SLO-Struktur mit 1.2 Å eigenartig kurz.^[12]

Die Arbeit von Kovaleva und Lipscomb liefert somit einzigartige dreidimensionale „Schnappschüsse“ des aktiven Zentrums von HPCD im Verlauf der Disauerstoffaktivierung. Diese Strukturen untermauern die mechanistischen Konzepte der Disauerstoffaktivierung durch das Substrat in Nicht-Häm-Eisenenzymen, die vor über 30 Jahren vorgeschlagen wurden.^[13] Zusätzliche spektroskopische Untersuchungen der kristallographisch beobachteten Intermediate sollten dazu beitragen, einen Mechanismus für Arenring-spaltende Di-oxygenasen wie HPCD zu formulieren.

Der zweite Artikel in *Science* beschreibt die Struktur eines H₂O₂-Addukts einer varianten Superoxid-Reduktase, das wahrscheinlich mit dem Produkt der Bindung von Superoxid verwandt ist.^[2] In diesem Fall wurden jedoch auch spektroskopische Untersuchungen am Kristall ausgeführt, um den vorgeschlagenen Mechanismus der Superoxid-Reduktion zu erhärten.

Die Einzelheiten des SOR-Reaktionsmechanismus wurden auf der Grundlage von etwas unterschiedlichen Ergebnissen diskutiert.^[1b] So schlugen Kurtz und Mitarbeiter zunächst ein Eisen(III)-(Hydro)Peroxo-Intermediat vor, nachdem sie beobachtet hatten, dass aus der Reaktion von Superoxid mit Eisen(II)-SOR stöchiometrisch ein Chromophor mit intensiver Absorption im sichtbaren Bereich hervorging ($\lambda_{\text{max}} = 650 \text{ nm}$, $\epsilon_{650} \approx 1500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).^[14] 2002 wurde eine Eisen(III)-Peroxo-Spezies, die von einer SOR-Mutante über einen H₂O₂-Shunt-Reaktionsweg gebildet wird, durch Elektronenabsorptionsspektroskopie entdeckt und mithilfe von EPR- und Resonanz-Raman-Spektroskopie charakterisiert.^[15] Die Beobachtung, dass sich die Resonanz-Raman-Schwingungen bei 850 und 438 cm⁻¹ durch Sauerstoffisotopenmarkierung verschoben, veranlasste die Autoren, eine side-on gebundene Peroxoeinheit vorzuschlagen, obgleich das entscheidende Mischisotopenexperiment zur Bestimmung der Bindungsart nicht beschrieben wurde.

Die Hinweise aus den kristallographischen Studien von Katona et al. auf die Bildung einer Eisen(III)-(Hydro)Peroxo-Spezies im aktiven Zentrum von SOR bieten eine bei-spiellose Gelegenheit, die möglichen Ausrichtungen einer end-on gebundenen Eisen-Peroxo-Spezies in diesem Enzym zu erkennen.^[2] Die Autoren beschreiben drei Eisen-Peroxo-Komplexe mit verschiedenen Strukturen in drei der vier Untereinheiten des kristallographisch untersuchten Homotetramers. Beachtenswert ist, dass diese Peroxokomplexe nach einem Wasserstoffperoxid-Shunt-Mechanismus entstehen (reduzierte SOR-Kristalle wurden in einer Wasserstoffperoxid-Lösung anaerob inkubiert). Obwohl dies nicht dieselbe Zwischenstufe sein mag, die durch Oxidation mit Superoxid entsteht, zeigen die Strukturen, wie die aus O₂^{·-} gebildeten Peroxo-Zwischenstufen aussehen und reagieren könnten. Alle drei Eisen-Peroxo-Spezies in der homotetrameren Struktur sind end-on gebunden, und ihre Fe-O1- und Fe-O2-Bindungslängen reichen von 1.9 bis 2.0 Å bzw. 3.0 bis 3.1 Å; die O-O-Bindungslängen liegen bei etwa 1.4–1.5 Å. Zudem wurden verschiedene Reste identifiziert, die Wasserstoffbrücken zu der Eisen-Peroxo-Einheit bilden könnten.

Um die kristallographischen Ergebnisse dieser Untersuchung zu erweitern, entwickelten die Autoren ein Raman-Spektrometer, mit dem sie Daten am Kristall aufnehmen konnten. So beschreiben sie Banden bei 838 und 567 cm⁻¹, die sich bei Sauerstoffisotopenmarkierung verschieben und die Zuordnung als End-on-Peroxo-Eisen(III)-Spezies unterstützen. Die zweite, mit der ν(Fe^{III}–OOH)-Mode verknüpfte Schwingung unterscheidet sich stark von der in der früheren Untersuchung bei 438 cm⁻¹ beobachteten,^[15] was die vorgeschlagenen unterschiedlichen Bindungsarten des Peroxoliganden bestätigt, die schon aus Spektren von synthetischen Eisen-Peroxo-Komplexen bekannt waren.^[1a,16] Offensichtlich werden in Lösung und im Kristall unterschiedliche Peroxo-Intermediate gebildet. Die Verbindung von Protein-Röntgenkristallographie mit schwingungsspektroskopischen Methoden ergab somit sowohl geometrische Strukturparameter als auch Erkenntnisse über Oxidationsstufen, die andeuten, wie eine Peroxospezies an das Nicht-Häm-Eisenzentrum von SOR gebunden sein könnte.

Zusammenfassend liefern diese eleganten kristallographischen Untersuchungen von HPCD und SOR einzigartige Strukturdaten zur Wechselwirkung von Disauerstoff und seinen Reduktionsprodukten mit Eisenzentren im Inneren eines Proteins. Darüber hinaus veranschaulichen sie, welche Informationen fortschrittliche Methoden der Proteinkristallographie über die Wechselwirkungen von Disauerstoff mit Nicht-Häm-Eisenzentren beitragen können.^[17] Diese Ergebnisse ermutigen zweifellos zu weiteren Untersuchungen über Disauerstoffeinheiten und ihre Koordination an Eisenzentren.

Online veröffentlicht am 8. Oktober 2007

[1] a) M. Costas, M. P. Mehn, M. P. Jensen, L. Que, Jr., *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 939–986; b) A. S. Pereira, P. Tavares, F. Folgosa, R. M. Almeida, I. Moura, J. J. G. Moura, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 2569–2581; c) A.-F. Miller in *Comprehensive Coordination Chemistry II* (Hrsg.: J. A. McCleverty, T. J. Meyer), Vol. 8

- (Hrsg.: L. Que, Jr., W. B. Tolman), Elsevier, Amsterdam, **2004**, S. 479–506.
- [2] G. Katona, P. Carpentier, V. Nivière, P. Amara, V. Adam, J. Ohana, N. Tsanov, D. Bourgeois, *Science* **2007**, *316*, 449–453.
- [3] E. G. Kovaleva, J. D. Lipscomb, *Science* **2007**, *316*, 453–457.
- [4] S. J. Lippard, J. M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA, **1994**, S. 284–313.
- [5] J. M. McCord, *Am. J. Med.* **2000**, *108*, 652–659.
- [6] D. M. Kurtz, Jr., *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 902–908.
- [7] Y. Zhang, K. L. Colabroy, T. P. Begley, S. E. Ealick, *Biochemistry* **2005**, *44*, 7632–7643.
- [8] D. J. Ferraro, E. N. Brown, C.-L. Yu, R. E. Parales, D. T. Gibson, S. Ramaswamy, *BMC Struct. Biol.* **2007**, *7*, 10.
- [9] X. Dong, S. Fushinobu, E. Fukuda, T. Terado, S. Nakamura, K. Shimizu, H. Nojiri, T. Omori, H. Shoun, T. Wakagi, *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 2483–2490.
- [10] A. Karlsson, J. V. Parales, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund, S. Ramaswamy, *Science* **2003**, *299*, 1039–1042.
- [11] D. J. Ferraro, L. Gakhar, S. Ramaswamy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 175–190.
- [12] E. Skrzypczak-Jankun, R. A. Bross, R. T. Carroll, W. R. Dunham, M. O. Funk, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10814–10820.
- [13] L. Que, Jr., J. D. Lipscomb, E. Münck, J. M. Wood, *Biochim. Biophys. Acta Enzymol.* **1977**, *485*, 60–74.
- [14] E. D. Coulter, J. P. Emerson, D. M. Kurtz, Jr., D. E. Cabelli, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11555–11556.
- [15] C. Mathé, T. A. Mattioli, O. Horner, M. Lombard, J.-M. Latour, M. Fontecave, V. Nivière, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4966–4967.
- [16] J.-J. Girerd, F. Banse, A. J. Simaan, *Struct. Bonding (Berlin)* **2000**, *97*, 145–177.
- [17] M. A. Carrondo, I. Bento, P. M. Matias, P. F. Lindley, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 429–442.