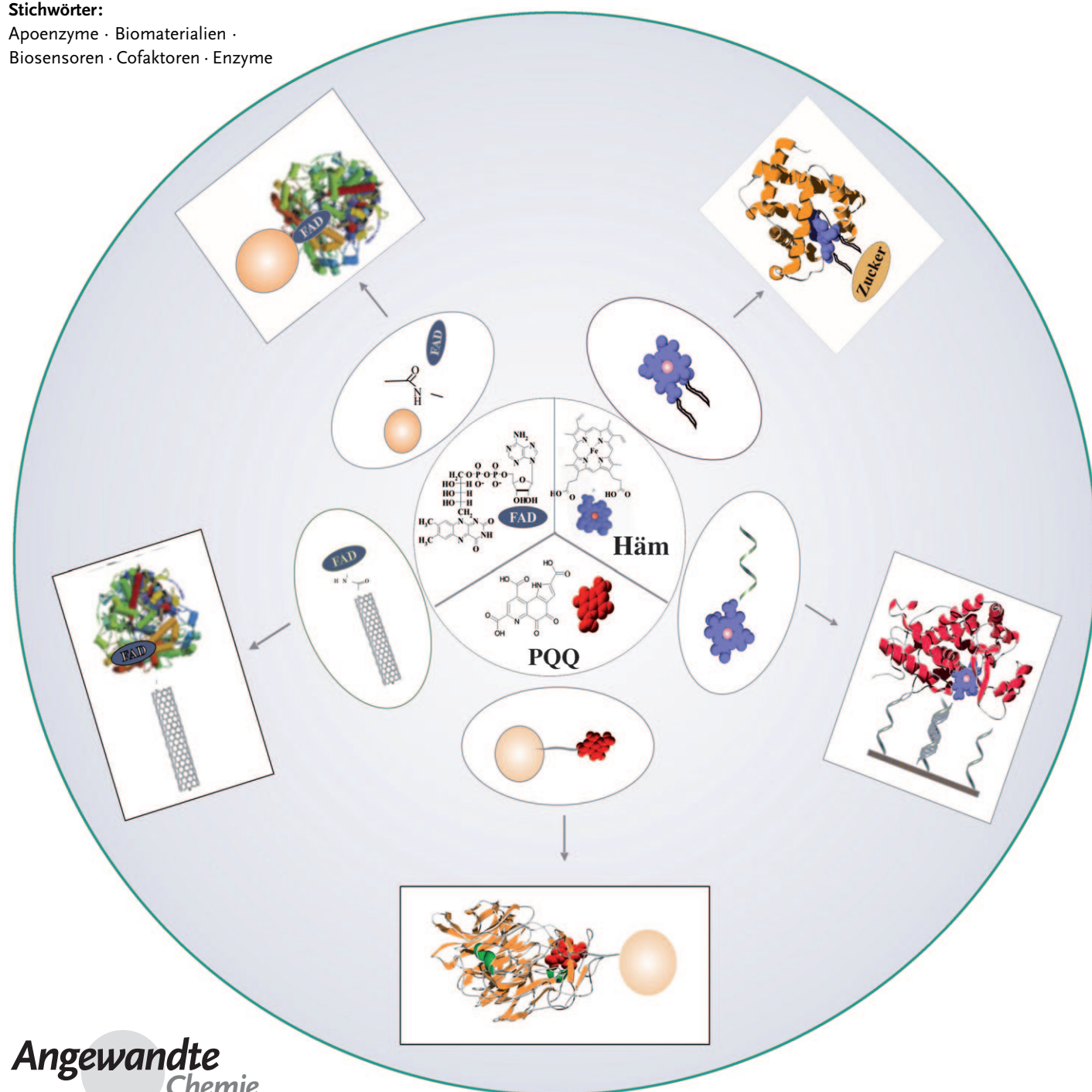


Rekonstitution von Apoenzymen als chemisches Werkzeug für die strukturelle Enzymologie und Biotechnologie

Ljiljana Fruk,* Chi-Hsien Kuo, Eduardo Torres und Christof M. Niemeyer*

Stichwörter:

Apoenzyme · Biomaterialien · Biosensoren · Cofaktoren · Enzyme



Viele Enzyme enthalten einen nicht diffusionsfähigen organischen Cofaktor, prosthetische Gruppe genannt, der im aktiven Zentrum des Enzyms platziert und essenziell für die katalytische Aktivität ist. Ein solcher Cofaktor kann oftmals aus dem Protein entfernt werden, wobei das entsprechende Apoenzym freigesetzt wird. Dieses kann wiederum mit einem künstlichen Analogon des nativen Cofaktors rekonstituiert werden. Heutzutage steht eine große Zahl künstlicher Cofaktoren zur Verfügung, die für die Rekonstitution genutzt werden können und damit die Herstellung von neuartigen halbsynthetischen Enzymen ermöglichen. Diese Methode ist in den letzten Jahrzehnten zu einem vielseitigen Hilfsmittel für die strukturelle Enzymologie weiterentwickelt worden, um Struktur-Funktions-Beziehungen zu untersuchen. Darüber hinaus kann die Rekonstitution von Apoenzymen genutzt werden, um Enzyme mit verbesserten oder sogar völlig neuartigen Funktionen herzustellen. Der vorliegende Aufsatz gibt einen Überblick über die historischen Entwicklungen auf diesem Gebiet sowie über die aktuellen Methoden zur Rekonstitution von Apoenzymen.

1. Einleitung

Viele Proteine enthalten einen nicht diffusionsfähigen Cofaktor, oft prosthetische Gruppe genannt, der nichtpeptidischen Ursprungs ist und im aktiven Zentrum des Proteins gebunden ist. Für die Funktion des Proteins ist ein solcher Cofaktor essenziell, da er für die Bindung des Substrates und

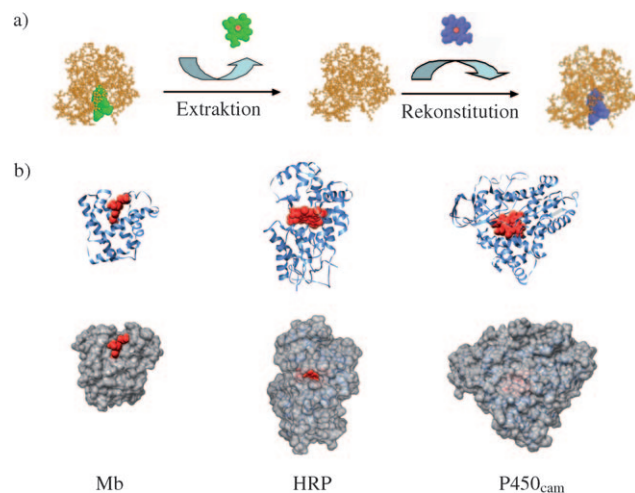


Abbildung 1. a) Rekonstitution von Apoenzymen. Die Extraktion des nativen Cofaktors (grün) ergibt das Apoenzym, das anschließend mit einem künstlichen Cofaktor (blau) rekonstituiert werden kann. b) Vergleich von drei Häm-enzymstrukturen, bei denen der Cofaktor in Rot dargestellt ist. Das Häm in Mb befindet sich nahe der Oberfläche des Proteins, während das aktive Zentrum von P450_{cam} tief im Inneren der Tertiärstruktur des Proteins verborgen ist. HRP ist ein Beispiel für ein partiell verborgenes Häm, das noch chemisch entfernt werden kann. Es ist zu beachten, dass die Strukturunterschiede deutlichen Einfluss auf die Leichtigkeit der Cofaktorextraktion und Enzymrekonstitution haben.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	1579
2. Flavin-adenin-dinucleotid-Rekonstitution	1580
3. Häm-Rekonstitution	1585
4. Andere Cofaktoren – Rekonstitution mit Pyrrolochinolinchinon	1598
5. Zusammenfassung und Ausblick	1600

anderer Reaktionspartner sowie für den katalytischen Umsatz erforderlich ist. Bedeutende Beispiele für solche prosthetischen Gruppen sind Porphyrin- und Flavinderivate,^[1] die oftmals Elektronentransferreaktionen katalysieren. Eine Besonderheit dieser Derivate ist, dass sie häufig durch chemische Methoden oder biologische Manipulation des Enzyms entfernt werden können.

Durch Modifizieren der prosthetischen Gruppe und anschließendes Wiedereinbringen des veränderten Cofaktors in das Enzym (Rekonstitution des Enzyms) können veränderte katalytische Eigenschaften erhalten werden. In Abbildung 1a ist die Methode der Rekonstitution dargestellt; man erkennt, dass dabei die Erzeugung von Apoproteinen notwendig ist. Apoproteine sind gefaltete Proteine, deren prosthetische Gruppen entfernt wurden, sodass nun native oder synthetische Cofaktoren eingeführt werden können. Dieser Ansatz ist eine vielseitige Methode zur Untersuchung von Reaktionsmechanismen und ermöglicht darüber hinaus die Einführung neuartiger Funktionen in ein bestimmtes Protein. Im weiteren Sinne wird mit dem Begriff „Rekonstitution“ auch das Einbringen metallischer Cofaktoren (nicht nur prosthetischer Gruppen) in Apoenzyme beschrieben. Als Beispiele seien hier die FeMo-Zentren von Nitrogenasen^[2–4] oder die NiFe-Zentren von Hydrogenasen^[5] genannt. Zwar ist auch dies ein interessantes Gebiet, wir wollen uns in diesem

[*] Dr. L. Fruk, C.-H. Kuo, Prof. Dr. C. M. Niemeyer
Universität Dortmund, Fachbereich Chemie,
Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik
Otto-Hahn Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-755-7082
E-Mail: ljiljana.fruk@uni-dortmund.de
christof.niemeyer@tu-dortmund.de

Dr. L. Fruk
DFG-Centrum für Funktionelle Nanostrukturen,
Universität Karlsruhe
Wolfgang Gaede Straße 1, Karlsruhe (Deutschland)

Dr. E. Torres
Universidad Autónoma Metropolitana –
Cuajimalpa, Depto. Procesos y Tecnología
México, D. F. 01120 (Mexiko)

Aufsatz jedoch auf die Rekonstitution mit nativen und modifizierten prosthetischen Gruppen konzentrieren, die ein organisches Grundgerüst haben.

Die Rekonstitution eines Apoproteins mit einem synthetischen Cofaktor kann für vielfältige Anwendungen in der (Nano-)Biotechnologie genutzt werden. Zum Beispiel können komplexe neue Bausteine, wie nanostrukturierte Oberflächen, adressierbare Katalysatoren oder auch Mikro- und Nanoarrays halbsynthetischer Proteine, generiert werden. Darüber hinaus wird das Entfernen und Wiedereinbringen eines Cofaktors bereits seit längerer Zeit als leistungsfähige Methode der strukturellen Enzymologie genutzt, um die Funktion bestimmter Atome eines Cofaktors oder verschiedener Aminosäuren im aktiven Zentrum des Proteins aufzuklären. So spielt die Umgebung der prosthetischen Gruppe beispielsweise bei den Häm-Enzymen eine wichtige Rolle, da sie die Aktivität des Enzyms maßgeblich beeinflusst.

Während der letzten 30 Jahre wurde die Rekonstitution insbesondere von Flavo- und Häm-Enzymen weiterentwickelt, um eine elektrische Kommunikation von Enzymen mit Elektroden zu ermöglichen. Auf diese Weise können Katalysemechanismen sowie Protein-Protein- und Protein-Ligand-Erkennungsprozesse untersucht und neue Biomaterialien hergestellt werden. So ist es beispielsweise aus Sicht der Synthesechemie und der Biokatalyse von großem Interesse, neuartige, halbsynthetische Metalloenzyme zu entwickeln, die unter milden Bedingungen hohe Selektivitäten und Reaktivitäten aufweisen. Auf diesem Gebiet wurden hoch-

interessante Fortschritte gemacht, sodass es heute möglich ist, mit diesen halbsynthetischen Metalloenzymen ihre natürlichen Gegenstücke zu imitieren. Ein gutes Beispiel für die Einführung neuartiger Funktionen durch Rekonstitution mit künstlich veränderten Cofaktoren bieten die Häm-Enzyme mit ihren metallhaltigen Porphyrincofaktoren. In diesem Aufsatz soll ein umfassender Überblick über die aktuellen Techniken der Rekonstitutionsmethodik gegeben werden, die sowohl zur Analyse von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Enzyme als auch zum Design neuartiger Biosensoren und Biomaterialien eingesetzt werden.

2. Flavin-adenin-dinucleotid-Rekonstitution

Flavin-adenin-dinucleotid (FAD, **1**) findet man als prosthetische Gruppe in einer Vielzahl von Enzymen. Es ist an Ein- und Zweielektronentransfers biologischer Prozesse wie der Photosynthese, der Atmungskette und verschiedener Stoffwechselwege beteiligt. Die redoxaktiven Zentren von FAD befinden sich am Isoalloxazinring, während die Ribitolphosphat- und Adenosinphosphatreste hauptsächlich zur Verankerung des Cofaktors dienen und stabilisierende Wechselwirkungen mit Aminosäureresten des Proteins eingehen (Abbildung 2). Diese spezifischen Wechselwirkungen zwischen Flavin und Protein, genauso wie die Konformation von FAD innerhalb der aktiven Tasche des Proteins, bestimmen die katalytische Aktivität des Proteins. So zeigt z.B. Abbildung 2a eine gestreckte und Abbildung 2b eine gebo-



Ljiljana Fruk studierte an der Universität Zagreb (Kroatien) Chemie und promovierte 2004 an der University of Strathclyde (Glasgow), wo sie bei E. Smith und D. Graham am Design von SERS-Sonden für die Biospektroskopie arbeitete. 2004 schloss sie sich der Arbeitsgruppe um C. M. Niemeyer an, zunächst als Humboldt- und später als Marie-Curie-Stipendiatin, um an der Synthese von DNA-Protein-Konjugaten und deren Anwendungen im Biosensordesign zu arbeiten. 2008 wurde sie Nachwuchsgruppenleiterin am Zentrum für funktionelle Nanostrukturen an der Universität Karlsruhe, wo sie biofunktionalisierte Nanopartikel untersucht.



Eduardo Torres erhielt 1994 den BSc und 1997 den MSc für Biochemie von der Universität Puebla, wo er im Jahr 2000 auch promovierte. Er arbeitete von 2000 bis 2006 im Instituto Mexicano del Petróleo mit Hämproteinen im Bereich der Petrobiotechnologie, bevor er 2006 zur Arbeitsgruppe von C. M. Niemeyer wechselte. Derzeit arbeitet er als Wissenschaftler an der Universidad Metropolitana – Cuajimalpa (Mexiko-Stadt) im Departamento de Procesos y Tecnología.



Chi-Hsien Kuo erhielt 2000 den BSc von der National Taiwan University und 2004 den MSc von der National Tsing-Hua University (Taiwan). An der National Tsing-Hua University forschte er im Bereich der Oberflächenchemie und untersuchte selbstorganisierte Monoschichten auf Silicioxidoberflächen. 2006 wechselte er zu C. M. Niemeyers Arbeitsgruppe als Doktorand und DAAD-Stipendiat. Er untersucht die Rekonstitution neuartiger Häm-Enzyme.



Christof M. Niemeyer studierte Chemie an der Universität Marburg und promovierte am MPI für Kohlenforschung (Mülheim/Ruhr) bei M. T. Reetz. Nach einem Forschungsaufenthalt am Center for Advanced Biotechnology in Boston (USA) bei C. R. Cantor habilitierte er 2000 an der Universität Bremen. Seit 2002 ist er Professor für Biologische und Chemische Mikrostrukturtechnik an der TU Dortmund. Er untersucht die Chemie von Biokonjugaten und ihre Anwendungen in der Biosensorik, Katalyse und der molekularen Nanotechnologie. Er ist Gründer der Firma Chimera Biotech, die sich mit der Kommerzialisierung von DNA-Protein-Konjugaten befasst.

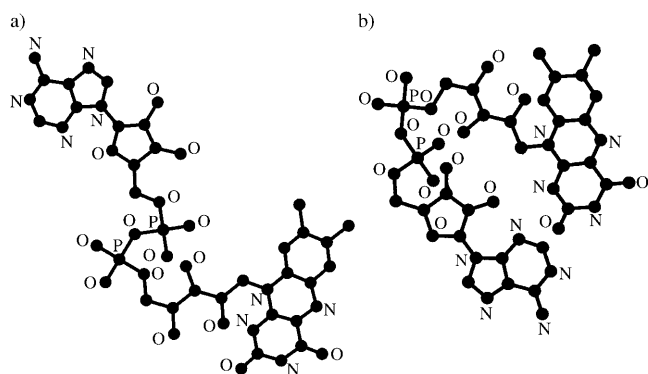
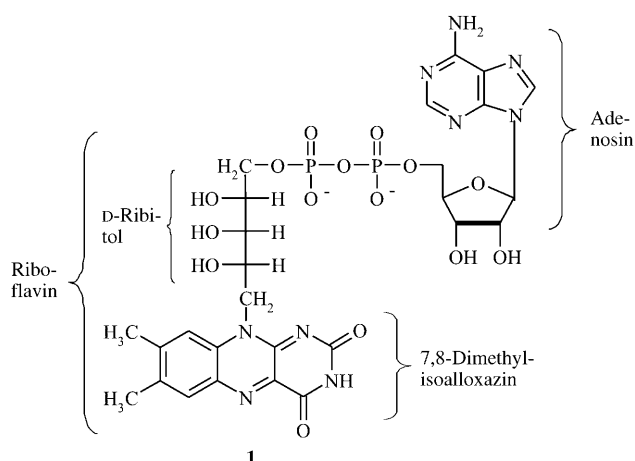


Abbildung 2. Struktur von FAD sowie seine a) gestreckte Konformation und b) gebogene Schmetterlingskonformation, die in Flavoenzymen auftritt.

gene FAD-Konformation.^[6] Erst kürzlich wurden FAD-haltige Proteine gemäß der Beziehung zwischen ihrer Aminosäuresequenz und der FAD-Konformation auf Basis ihrer Sequenz-Struktur-Beziehung in vier unterschiedliche Klassen unterteilt (Abbildung 3).^[7]

2.1. Entfernen von FAD

Bei der Mehrheit der Flavoproteine ist der Cofaktor fest, aber nicht kovalent mit dem Proteingerüst verknüpft. Allerdings wurden kürzlich einige FAD-haltige Enzyme entdeckt, bei denen FAD kovalent über einen Histidin-, Cystein- oder Tyrosinrest gebunden ist (Abbildung 4).^[8] Wegen der beiden unterschiedlichen Bindungsarten von FAD müssen verschiedene Methoden für seine Entfernung verwendet werden. Zur Extraktion von nichtkovalent gebundenem FAD aus dem Holoprotein (dem vollständig funktionellen und gefalteten Protein) wurden bereits mehrere Methoden entwickelt, dagegen besteht die einzige Möglichkeit zur Entfernung eines kovalent gebundenen FAD in der heterologen Expression des Apoflavoenzyms.^[9]

Die ersten Berichte über die Extraktion von FAD-Cofaktoren aus Flavoproteinen und deren spätere Rekonstitution reichen zurück in das Jahr 1935, als Theorell einen gelben

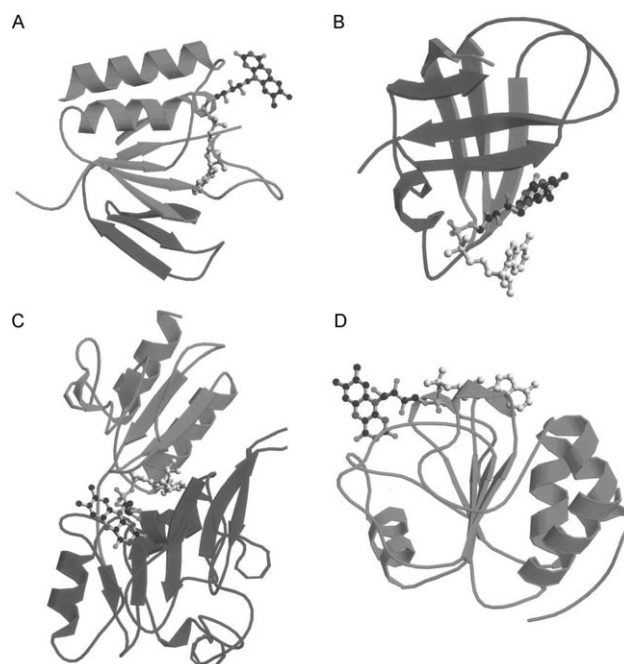


Abbildung 3. Vier Gruppen von FAD-Proteinen, basierend auf ihrer Sequenz-Struktur-Beziehung. A) Glutathion-Reduktase-Typ; B) Ferredoxin-Reduktase-Typ; C) *p*-Cresol-Methylhydroxylase-Typ; D) Pyruvat-Oxidase-Typ. Wiedergabe aus Lit. [7].

Cofaktor aus dem „Old Yellow Protein“, mittels Dialyse unter sauren Bedingungen extrahierte.^[10] Wegen der großen Stabilitäts- und Funktionsbandbreite der Flavoproteine wurde seitdem eine Reihe von Methoden zur Herstellung von Apoproteinen entwickelt, von denen jede an das jeweils interessierende Protein angepasst und optimiert wurde. Frühe Methoden nutzten beispielsweise die Destabilisierung der Flavin-Protein-Wechselwirkung bei niedrigen pH-Werten und hohen Ionenkonzentrationen, um FAD abzuspalten und anschließend auszufällen.^[11] Auch die Dialyse unter nichtnatürlichen Bedingungen wurde beschrieben.^[12] Erst kürzlich wurden weitere, chromatographische Methoden entwickelt: So ist das Apoenzym durch Immobilisierung des Holoproteins und Entfernen des Cofaktors unter leicht sauren Bedingungen zu erhalten und kann anschließend wieder rekonstituiert werden.^[13–16] An dieser Stelle soll der exzellente Übersichtsartikel von Hefti et al. genannt werden, der einen detaillierten Einblick in Vor- und Nachteile verschiedener konventioneller und chromatographischer Methoden zur Apoflavoenzym-Gewinnung gibt.^[17] Dort wird auch kurz die Bedeutung der Rekonstitutionsmethode für die Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen der Flavoproteine diskutiert.^[17] Da bereits sehr informative Übersichtsartikel über die historische Entwicklung der Verwendung künstlicher Flavincofaktoren^[18] sowie über deren Rolle für die Proteinfunktion und den Mechanismus der Flavinbindung veröffentlicht wurden,^[8,19] wollen wir uns hier auf die jüngsten Fortschritte auf diesem Gebiet konzentrieren.

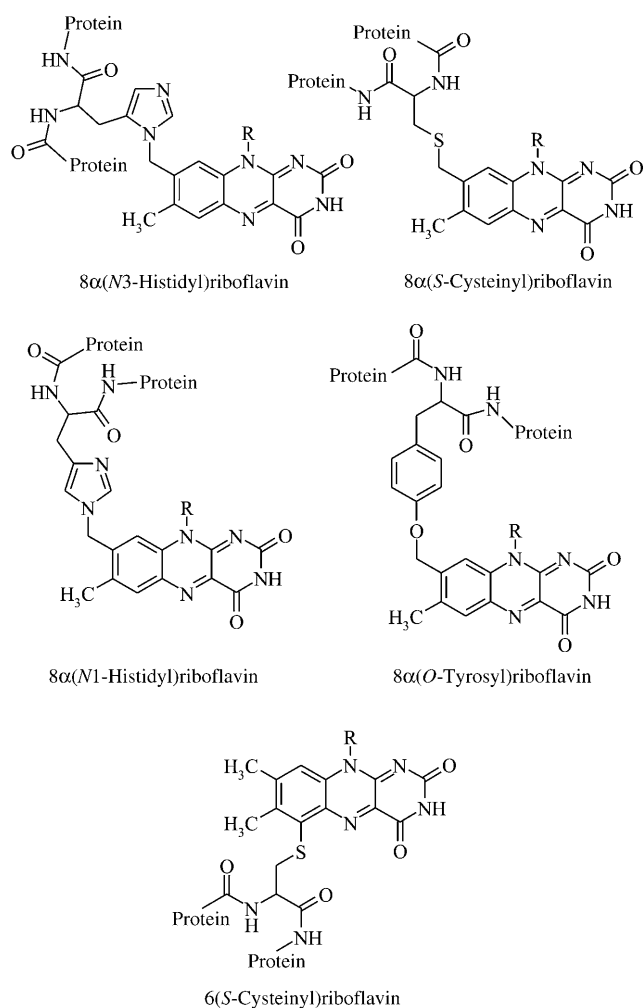


Abbildung 4. Strukturen von fünf bekannten kovalenten Bindungen zwischen FAD und Protein.^[9] R: Ribityl-5'-diphosphoadenosin.

2.2. Flavin-Rekonstitution in Struktur- und Katalysestudien

Die Rekonstitution von Apoflavoproteinen mit nativen,^[20,21] künstlichen^[22–24] oder isoto-penmarkierten^[25] Flavinen wurde sowohl für das Studium der Struktur der Flavoproteine als auch zur Aufklärung des Mechanismus der Redoxkatalyse genutzt. Das an der Synthese von Galactofuranose beteiligte Enzym UDP-Galp-Mutase kann mit 1- und 5-Desazaflavinderivaten (**2** bzw. **7** in Abbildung 5) rekonstituiert werden, was zur Aufklärung des Katalysemechanismus dieses Enzyms führte. Es stellte sich heraus, dass die Ringverkleinerungsreaktion während der Umwandlung von UDP-D-Galactopyranose (UDP-Galp; UDP: Uridin-5'-diphosphat) zu UDP-Galactofuranose (UDP-Galf) unerwarteterweise über einige Radikalspezies verläuft.^[26] Ein weiteres Beispiel für den Nutzen der FAD-Rekonstitution in Struktur- und Katalysestudien ist die Untersuchung der Oxyanionenkavität in Acyl-CoA-Dehydrogenase (CoA: Coenzym A) mithilfe der Raman-Spektroskopie. Hierfür wurde der 2'-Desoxy-FAD-Cofaktor (**3**) zur Rekonstitution verwendet, um mögliche Mutationsstellen für die Erhöhung der Enzymaktivität zu identifizieren.^[27] In einer anderen vielbeachteten

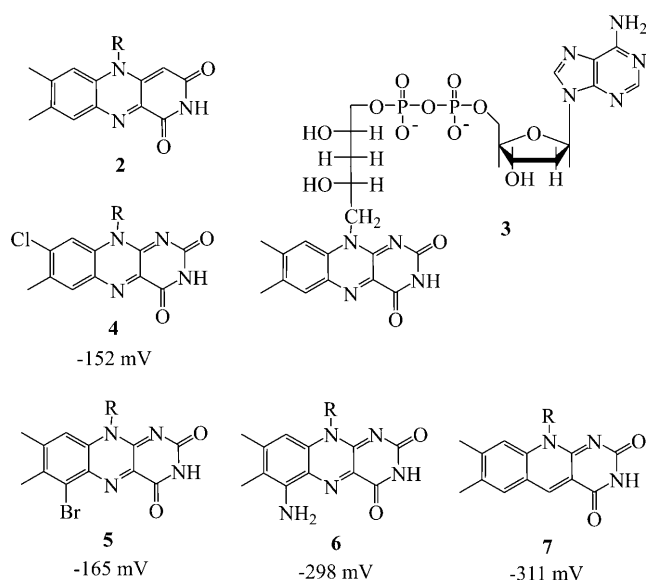


Abbildung 5. Künstliche FAD-Cofaktoren, die bei Rekonstitutionsstudien verwendet wurden. Die FAD-Derivate **4–7** wurden für die Rekonstitution und Untersuchung von pCMH und dessen Aktivität eingesetzt. R: Ribityl-5'-diphosphoadenosin. Die Aktivität von pCMH nimmt mit dem Redoxpotential zu (**4**→**7**).^[27]

Studie wurde das native FAD aus Superoxid-Reduktase entfernt und in einer In-vitro-Rekonstitution wieder eingebracht, um einen genaueren Einblick in den H₂O₂-abhängigen Reduktionsmechanismus des Enzyms zu erhalten.^[28]

Wie bereits erwähnt, wächst die Zahl an bekannten Flavoenzymen mit kovalent gebundenen Flavinresten stetig. Die Rekonstitution dieser Enzyme mit nativen oder künstlichen Cofaktoren wurde genutzt, um einerseits die Entstehung der kovalenten Verknüpfung zwischen der Methylgruppe des Isoalloxazinrings und den Proteinresten und andererseits die Bedeutung dieser Verknüpfung für die katalytische Aktivität des Proteins zu untersuchen.^[29–33] Ein neueres Beispiel für solche Arbeiten ist die Herstellung des löslichen Apoenzyms der monomeren Sarkosin-Oxidase (MSOX) durch kontrollierte Expression in einem Riboflavin-abhängigen *Escherichia coli*-Stamm. Bei anschließender Rekonstitution mit nativem Flavin wurden ungefähr 80 % der ursprünglichen Aktivität des nativen Enzyms mit kovalent gebundenem Flavin erhalten, und die spektralen und katalytischen Eigenschaften der rekonstituierten MSOX unterschieden sich nicht von denen der nativen MSOX.^[34] Diese Befunde bestätigten die Beobachtungen anderer Gruppen zur kovalenten Flavinylie-rung,^[31,35] dass eine kovalente Verknüpfung von Cofaktor und Proteingerüst auch möglich ist, wenn das Flavin nach der Expression durch Rekonstitution in das Apoenzym eingebracht wird. Eine dieser Arbeiten befasste sich mit dem Enzym *p*-Cresol-Methylhydroxylase (pCMH), das vier prosthetische Gruppen aufweist: zwei FAD- und zwei Häm-domänen. Die Untersuchung der Rekonstitution von FAD mit dem rekombinantem apopCMH ermöglichte es Kim et al. 1995, für dieses Enzym einen Vorschlag für den Mechanismus der Bildung der kovalenten FAD-Bindung zu machen. Es stellte sich heraus, dass die Häm-domäne essenziell nicht nur für die katalytische Aktivität des Enzyms, sondern auch für

die kovalente Bindung von FAD ist: Das Häm speichert die zwei Elektronen, die bei der Reduktion des kovalent gebundenen FAD entstehen.^[9] Diesen Mechanismus entwickelten Efimov et al. weiter und diskutierten zwei Phasen der kovalenten Flavinylierung: In Phase I erfolgt eine schnelle Aufnahme und Bindung von FAD durch das Apoprotein, was zu einem Anstieg des Redoxpotentials führt. Dieser Anstieg begünstigt wiederum die kovalente Bindung von FAD (Phase II) in seiner reduzierten Form, wobei die entstehenden Elektronen von FAD auf die zwei verschiedenen Hämdomänen des Enzyms übertragen werden.^[36] Für das Enzym pCMH konnte auch gezeigt werden, dass das reduzierte FAD deutlich an Stabilität gewinnt, wenn es eine kovalente Verknüpfung mit dem Protein eingeht. So war es ebenfalls möglich, verschiedene Derivate des nativen FAD, wie 8-Chlor- (**4**), 6-Brom- (**5**), 6-Amino- (**6**) und 5-Desaza-FAD (**7**; Abbildung 5), kovalent an das Protein zu binden. Hierbei wurde beobachtet, dass der Prozess der Bindungsbildung hauptsächlich vom Phase-I-Redoxpotential der Cofaktoren abhängig ist^[37] und dass ein höheres Potential der FAD-Analoga zu einer Erhöhung der pCMH-Aktivität führt (Abbildung 5). Diese Befunde könnten in zukünftigen Arbeiten für das Design von Flavoenzymen mit kovalent gebundenen prosthetischen Gruppen genutzt werden, die über maßgeschneiderte Redox- und Katalyse-Eigenschaften verfügen.

2.3. Bioelektronik und Nanobiotechnologie

Die Beispiele in Abschnitt 2.2 zeigen deutlich, wie die Cofaktor-Rekonstitution für die Untersuchung von Struktur und Funktion von Redoxenzymen verwendet werden kann. Dieser Abschnitt beschäftigt sich nun mit der Verwendung dieser Methode für das Design neuartiger Funktionseinheiten auf den noch jungen Gebieten der Bioelektronik und der Nanobiotechnologie. Auf dem schnell wachsenden Gebiet der Bioelektronik werden komplexe Biomoleküle verwendet, um Signalumwandler und Auslesesysteme für neuartige Biosensoren herzustellen, in denen Biomaterialien mit elektronischen Bauteilen kombiniert sind.^[38–40] Das Grundprinzip solcher bioelektronischen Systeme ist die Detektion von Elektronen, die sowohl in elektronischen Bauteilen als auch in Biomolekülen während signalgebender und katalytischer Prozesse übertragen werden. Folglich ist es für die Bioelektronik entscheidend, den elektrischen Kontakt zwischen Biomolekülen (oftmals Redoxproteinen wie Flavo- oder Hämenzymen) und Elektroden zu gewährleisten, sodass ein direkter Elektronentransfer möglich wird. Leider verhindert die Proteinhülle der Redoxenzyme oftmals eine direkte elektrische Kommunikation zwischen Redoxzentrum und Elektrode, da nach der Marcus-Theorie der Abstand zwischen Donor und Akzeptor maßgeblichen Einfluss auf die Effizienz des Elektronentransfers hat. Um dennoch einen direkten Elektronentransfer zu gewährleisten, wurden verschiedenste Methoden untersucht, beispielsweise das Einbetten der Enzyme in leitende Polymerfilme^[41] oder die Verwendung von diffundierenden Mediatoren wie Chinonen oder Ferrocenderivaten.^[42] Ein neues Konzept für die Herstellung elektrochemischer Biosensoren wurde von der Ar-

beitsgruppe Willner vorgestellt. Es beruht auf der Rekonstitution von Apoenzymen mit modifizierten Cofaktoren, die eine direkte Enzym-Elektroden-Kommunikation ermöglichen.^[43] Für eine möglichst hohe Effizienz des Biosensors ist es jedoch notwendig, Anordnung und Abstand der Redoxzentren so zu steuern, dass die korrekte Orientierung der Enzyme gewährleistet ist. Zu diesem Zweck rekonstituierten Willner und Mitarbeiter Apoflavoenzyme mit modifiziertem FAD, um den direkten Elektrodenkontakt herzustellen und um die Aktivität der Enzyme elektrochemisch verfolgen zu können.^[39,44] Ein Beispiel ist der Austausch der nativen prosthetischen FAD-Gruppe in Glucose-Oxidase (GOx) gegen ein Ferrocenderivat von FAD (**8**; Abbildung 6), um eine präzise Anbindung und direkte Kommunikation mit der Goldelektrode zu erleichtern. Mit dieser Methode blieben ungefähr 60 % der nativen Enzymaktivität erhalten.^[43]

Weiterentwicklungen auf Basis des Konzepts von Willner zur GOx-Rekonstitution wurden bereits in verschiedenen Übersichtsartikeln zusammengefasst,^[45–47] weshalb wir uns hier auf einige aktuelle Beispiele beschränken wollen. Zur Verbesserung der elektrischen Kommunikation wurden verschiedene Elektrodenmodifikationen – z. B. Relais mit Pyrrolochinolinchinon (PQQ),^[48] Phenylboronsäurederivaten,^[49] rotaxanartigen Molekülen,^[50] funktionalisierten Polymeren^[51] oder mit zusätzlichen Gruppen modifizierten FAD-Derivaten (z. B. **9**; Abbildung 7) – eingesetzt.^[40,52,53]

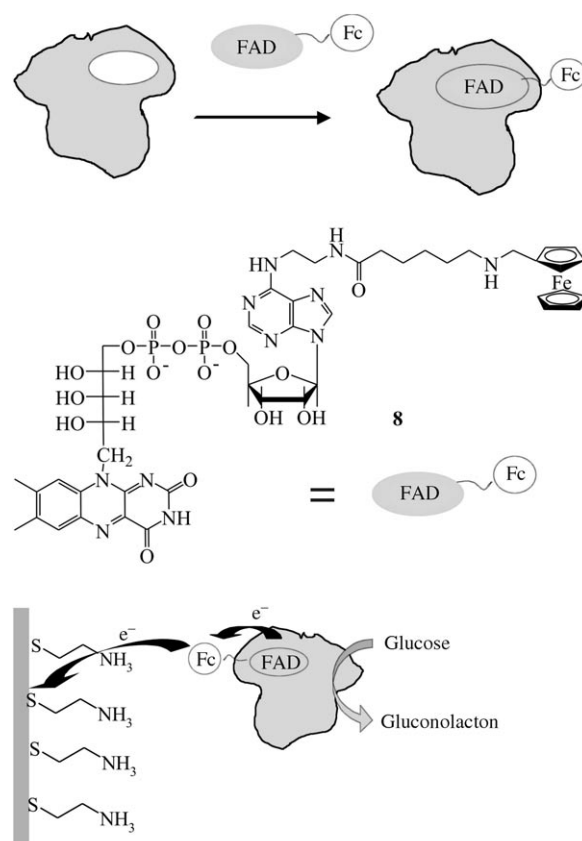


Abbildung 6. Rekonstitution von apoGOx mit Ferrocen-modifiziertem FAD. Das Enzym wurde anschließend auf Goldelektroden adsorbiert. Wiedergabe aus Lit. [39]. Der graue Balken repräsentiert die Goldelektrode.

Mit dem Aufkommen der Nanobiotechnologie, die sich mit der Biofunktionalisierung von Systemen in Nanometergröße und der Verwendung von Nanosystemen zur Erforschung biologischer Systeme befasst,^[45,54–56] wurde die Rekonstitution von Apoenzymen auch für die Herstellung neuartiger Nanosysteme genutzt. So wurde die FAD-Rekonstitution verwendet, um Goldnanopartikel zu Brücken zwischen Elektroden und Redoxzentren eines Biokatalysators zu machen (Abbildung 7 a).^[45,57] Der Einbau von Goldnanopartikeln in das elektrochemische System führte zu einer siebenfachen Erhöhung der Elektronentransfergeschwindig-

keit gegenüber jener des analogen Systems aus nativer GOx, die ohne Goldnanopartikel immobilisiert wurde. Daher wird vermutet, dass die Goldnanopartikel als eine Art „Stromkabel“ wirken und so den direkten elektrischen Kontakt zwischen Redoxzentrum und Elektrode herstellen. Des Weiteren könnten sie auch die Rolle eines Nanoströmkollektors übernehmen.^[57,58] In einem ähnlichen Versuch wurden die Goldnanopartikel gegen Kohlenstoffnanoröhren ausgetauscht, die mit FAD funktionalisiert waren (Abbildung 7 b). Die In-situ-Rekonstitution mit apoGOx führte zu einer besseren Oberflächenbedeckung der Goldelektroden und einem exzellen-

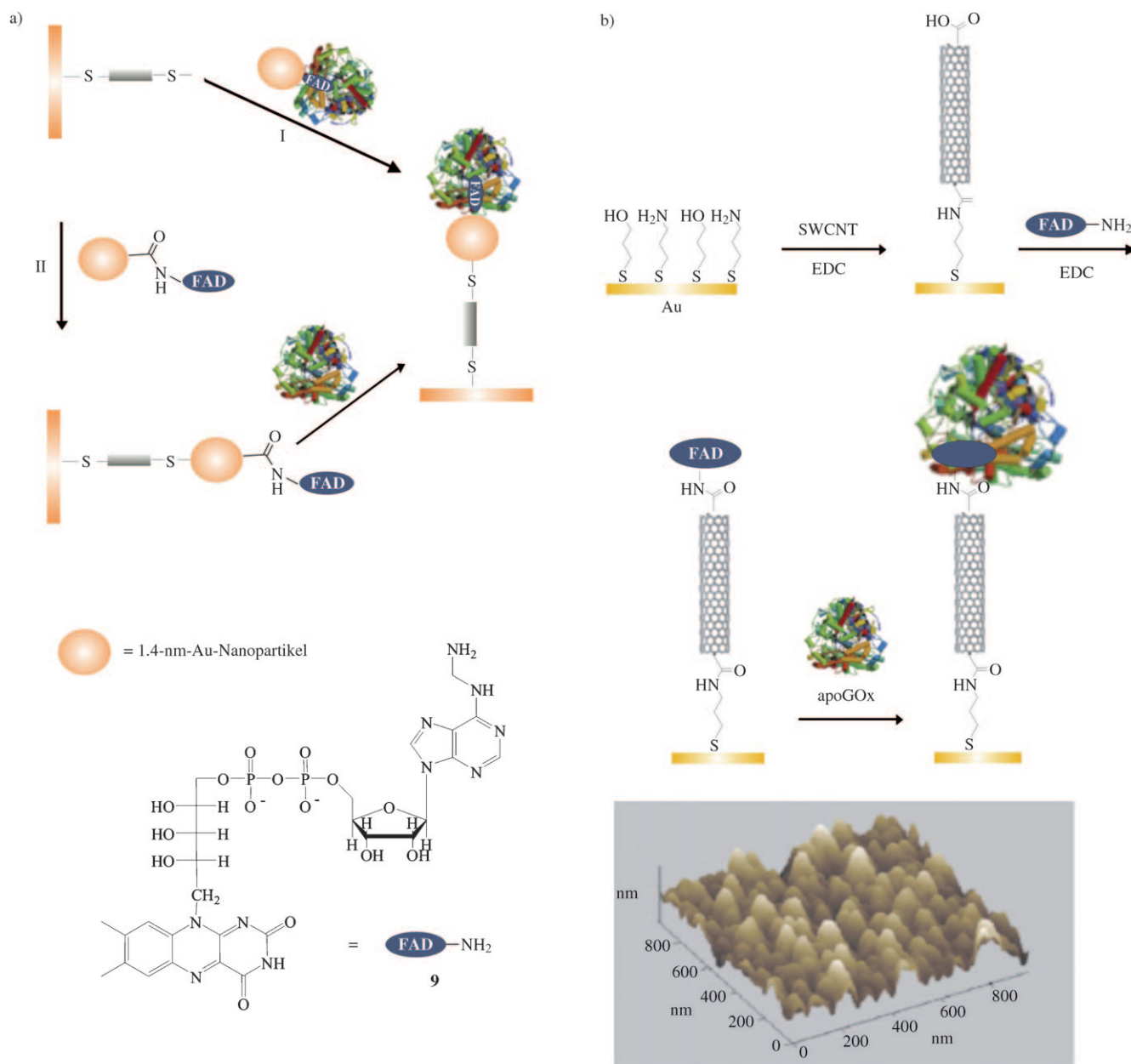


Abbildung 7. a) Herstellung von GOx-modifizierten Elektroden unter Verwendung von Goldnanopartikeln als elektrochemisches Relais. I) Rekonstitution des apoGOx mit FAD-modifizierten Nanopartikeln und anschließende Bindung an die Elektrode. II) Bindung der FAD-modifizierten Au-Nanopartikel und anschließende In-situ-Rekonstitution. Wiedergabe aus Lit.[57] mit Genehmigung. Copyright 2003 Science/AAAS. b) Rekonstitution von apoGOx auf Goldelektroden, die unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) mit FAD-modifizierten, einwandigen Kohlenstoffnanoröhren (SWCNT) funktionalisiert wurden. Eine AFM-Aufnahme der Elektrodenbeschichtung ist unten gezeigt. Wiedergabe aus Lit. [59].

ten Elektroden-Enzym-Kontakt.^[59,60] So wurde für die Glucoseoxidation ein sechsfach höherer Wert als bei der Kontrollreaktion mit GOx ohne Kohlenstoffnanoröhren gefunden. Interessanterweise zeigte sich bei elektrochemischer Analyse der Oxidation von Glucose zudem, dass eine Abhängigkeit zwischen Länge der Nanoröhren und amperometrischer Antwort besteht: Kürzere Nanoröhren (25 nm) ermöglichen offenbar einen schnelleren Elektronentransfer als längere (150 nm).^[59]

Außer GOx wurden von Willner et al. und anderen Gruppen auch weitere FAD-Enzyme, wie Glucose-Dehydrogenase (GDH),^[51] D-Aminosäure-Oxidase^[43] und Cholesterol-Oxidase (CHO),^[61] in Rekonstitutionsreaktionen eingesetzt, um einen elektrischen Kontakt sowie Aktivitätsmessungen zu ermöglichen. Diese Arbeiten demonstrierten, dass die Apoenzymrekonstitution eine vielseitige und effiziente Methode für die elektronische Kontaktierung von Redoxenzymen ist, was diesen Ansatz vielversprechend für die Entwicklung amperometrischer Biosensoren und Biokraftstoffzellen macht.^[45–47,62] Zukünftig dürften durch ein detailgenaueres Verständnis der Flavoenzyme noch weitere Verbesserungen bei der Steuerung und Nutzung der Enzymaktivität erreicht werden. Es ist anzunehmen, dass weiterentwickelte Funktionselemente für die Bioelektronik sowie neuartige Hybridmaterialien realisiert werden können. Wie in Abschnitt 3 beschrieben, wurden in dieser Richtung bereits einige Fortschritte mit Hämenzymen erzielt.

3. Häm-Rekonstitution

Ein großer Teil der Kenntnisse über die Rekonstitution von Apoenzymen beruht auf Untersuchungen von Hämenzymen. Daher wollen wir hier zunächst Herangehensweisen zur Aufklärung mechanistischer Details der katalytischen Aktivität von Hämproteinen vorstellen, um uns anschließend Modellen und Beispielen für das Design halbsynthetischer Hämenzyme zu widmen. Die vorgestellten Arbeiten werden zeigen, dass teilweise völlig neuartige Eigenschaften solcher halbsynthetischen Enzyme entstehen, die sich deutlich von denen der nativen Enzyme unterscheiden.

Hämproteine haben drei allgemeine Funktionen: den Transport von Elektronen (z.B. Cytochrom *b*₅) und Sauerstoff (z.B. Hämoglobin) sowie die Katalyse von verschiedensten metabolischen Reaktionen. Bei der Katalysfunktion spielen beispielsweise die Familien der Cytochrom-P450-Monooxygenasen^[63] und der Peroxidasen^[64] eine wichtige Rolle. Ungeachtet dieser verschiedenen Funktionen haben alle erwähnten Enzyme eine Eisen-Protoporphyrin-IX-Gruppe (Häm; **10** in Abbildung 8) als prosthetische Gruppe gemeinsam, die sich im aktiven Zentrum des Proteins befindet. Die Orientierung der prosthetischen Hämgruppe innerhalb der Proteinhülle sowie ihre Wechselwirkung mit dem Substrat sind oft ausschlaggebend für die Enzymaktivität. Es ist von theoretischem wie auch praktischem Interesse, die Mechanismen zu verstehen, welche die intrinsische Reaktivität der Proteine bestimmen. Die katalytischen Eigenschaften der Hämenzyme werden durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, darunter die Struktur und Konformation der pro-

sthetischen Gruppe, die das Eisenatom koordinierenden Liganden, Aminosäurereste des Proteins in Nachbarschaft zum Cofaktor sowie die allgemeinen topologischen und physikochemischen Eigenschaften des aktiven Zentrums. Folglich kann der Austausch des Cofaktors wertvolle Einblicke in verschiedenste Aspekte der Enzymkinetik liefern. Darüber hinaus können durch einen solchen Austausch neuartige chemische Funktionalitäten in ein bestehendes Proteingerüst eingeführt werden, um so neue Anwendungsgebiete zu erschließen.

3.1. Entfernung des Hämcofaktors

Eines der ersten Modellsysteme in Enzymstudien zur Hämassoziaton und -dissoziaton war Myoglobin.^[65–67] Dieses kleine (17 600 kDa) Protein dient der Sauerstoffspeicherung und kann leicht aus dem Muskelgewebe des Pottwals oder Herzgewebe (Pferd, Rind) gewonnen werden. Myoglobin lässt sich problemlos isolieren und ist leicht aufzureinigen; zudem ist seine gefaltete Tertiärstruktur stabil genug, um eine Entfernung und Wiedereinführung von Häm **10** unbeschadet zu überstehen. Die ursprünglich für Myoglobin entwickelte Methode^[68] zur Entfernung und Rekonstitution von Häm leitete eine Vielzahl von Untersuchungen an anderen Enzymen ein, die zuvor unzugängliche Daten über die Stabilität, Struktur und Funktion der Enzyme lieferten. Im Folgenden werden wir sowohl etablierte als auch neue Verfahren zur Häm-Rekonstitution vorstellen.

Die Methode von Teale basiert auf der Tatsache, dass es möglich ist, nichtkovalent gebundenes Häm aus einem partiell denaturierten Enzym^[69] zu extrahieren.^[70] Nach der ersten Veröffentlichung wurde diese Methode für die Hämextraktion aus zahlreichen anderen Enzymen angepasst. Hierzu zählen neben Myoglobin (Mb) auch Meerettich-Peroxidase (HRP), Hämoglobin (Hb) sowie verschiedene Hämproteine aus der Familie der Cytochrome,^[71,72] darunter die Cytochrom-*c*-Peroxidase (CCP)^[73] und P450-Enzyme (Abbildung 1b).^[74,75] Teales Methode beruht auf der Ansäuerung einer Proteinlösung zur partiellen Denaturierung des Proteins. Anschließend wird der Cofaktor Häm mit einem organischen Lösungsmittel wie 2-Butanon (Methyl-ethylketon) extrahiert. Dieses Verfahren ist schnell und auch für sehr geringe Mengen an Enzymlösung geeignet. Obwohl saure Bedingungen zur partiellen Denaturierung des Proteins benötigt werden, sind viele der auf diese Art hergestellten Apoproteine ausreichend stabil, sodass eine anschließende Rekonstitution mit Hämderivaten möglich ist. Allerdings variiert die Ausbeute von Rekonstitutionsreaktionen stark und hängt dabei wesentlich von der Struktur des untersuchten Proteins ab. Eine weitere wichtige Rolle spielt die Position der Hämtasche innerhalb der dreidimensionalen Proteinstruktur.

Ein Beispiel ist die Apocytochrom-*c*-Peroxidase (apoCCP), die stabil genug ist, um kristallisiert zu werden^[73] – interessanterweise ist es jedoch nicht möglich, apoCCP nach der Kristallisierung zu rekonstituieren. Dieses Phänomen ist einerseits auf die starre Proteinkonformation im Kristall und andererseits auf die kleinen Kristallporen zurückzuführen,^[73]

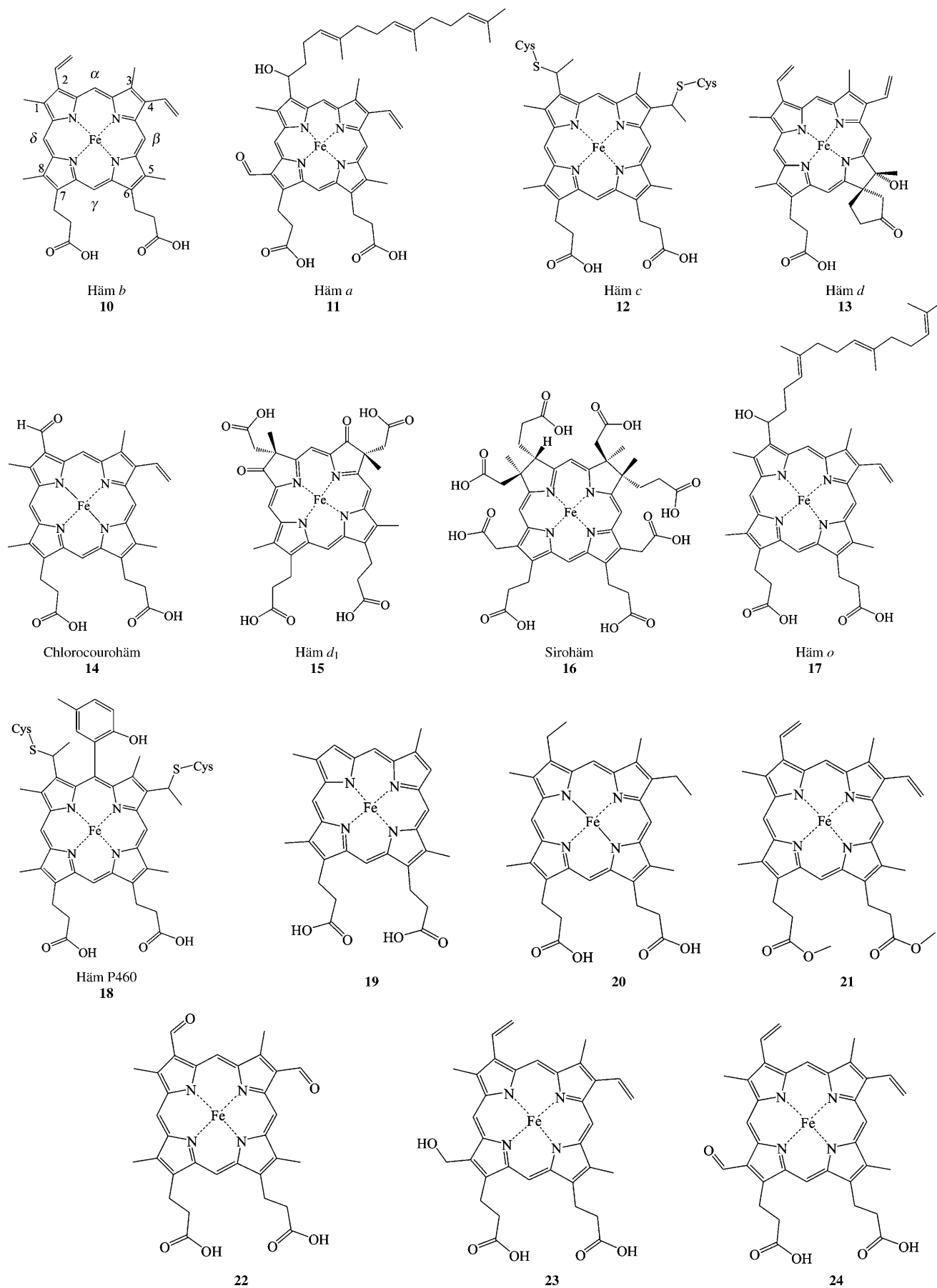


Abbildung 8. Strukturen natürlich vorkommender (10–18) und synthetischer Cofaktoren (19–24), die in Rekonstitutionsuntersuchungen verwendet wurden.

die es dem größeren Hämolekül unmöglich machen, seine Bindungsstelle im Protein zu erreichen. Allerdings gibt es auch viele Proteine, die einer Entfernung des Hämcofaktors nicht standhalten. Beispielsweise führte der Versuch der Cofaktorextraktion bei Cytochrom P450_{sec} zu einer Präzipitation des Apoproteins, sodass dessen weitere Verwendung in Rekonstitutionsansätzen unmöglich wird. Das Apoprotein kann lediglich in 6 M Guanidinium-Hydrochlorid oder 10-proz. NaOH-Lösung unter Erhitzen wieder gelöst werden. Diese Behandlung führt jedoch zu einem Enzym, das nicht korrekt zurückgefaltet ist, sodass kein funktionelles Holo-protein entsteht.^[76]

Um die Extraktion von Häm aus Enzymen zu ermöglichen, die zu empfindlich für die Säure/Keton-Behandlung sind, wurden mildere Methoden entwickelt. Eine davon beruht auf der Inkubation des Proteins mit einer Apomyoglobinlösung (apoMb) oder einer Lösung des Proteins Hämopexin aus menschlichem Blutserum. In einigen Fällen konnte hiermit ein Hämtransfer vom untersuchten Protein zum apoMb-Akzeptor ausgelöst werden.^[77,78] Da dieser Ansatz auf den relativen Affinitäten der beiden konkurrierenden Apoproteine beruht, konnten Thermodynamik und Kinetik der Rekonstitution untersucht werden. In einer solchen Studie wurde eine Mutante von Myoglobin (His64Tyr/Val68Phe-apoMb) entwickelt, die eine sehr hohe Affinität zu Häm aufweist. Diese Mutante wurde verwendet, um Häm-dissoziationskonstanten verschiedener Wildtypmyoglobine aus unterschiedlichen Quellen zu bestimmen. Des Weiteren wurden Myoglobinmutanten untersucht, bei denen bestimmte Aminosäuren in Nachbarschaft zur Hämbindungsstelle ausgetauscht wurden.^[79,80] Es stellte sich heraus, dass einer der Schlüsselfaktoren für die Stabilisierung der Hämbindung in Myoglobin die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den unpolaren Resten in der Hämtasche und dem Porphyrinring sind. Darüber hinaus scheinen ausgeprägte Wechselwirkungen zwischen His93 und dem Fe³⁺, die bereits zuvor von Rose und Olsen beschrieben wurden,^[81] sowie Wasserstoffbrücken zwischen distalen Resten und koordiniertem Wasser^[82] für die Bindung des Cofaktors essenziell zu sein. Die Dissoziation von Häm aus dem Enzym sowie der anschließende Hämtransfer zur hochaffinen His64Tyr/Val68Phe-Apoenzymmutante wurden UV/Vis-spektroskopisch verfolgt.^[80] Mit dieser Methode wurde auch der Einfluss bestimmter Aminosäuren, insbesondere der Histidinreste in der Nähe der Hämbindungstasche, auf die Häm-Rekonstitution und die Substratbindung studiert.^[79] Dabei wurde gefunden, dass die Aminosäureseitenketten in der Nähe der Propionatreste des Häms nur einen geringen Einfluss auf Ligandenbindung und Autooxidation haben. Interessanterweise widersprechen diese Befunde früheren Modellen.^[79]

Während das Häm bei einer Reihe von Globinen und Cytochromen nur partiell im Polypeptidgerüst eingebettet ist, befindet es sich bei der P450-Enzymfamilie fast komplett im Inneren der Tertiärstruktur (Abbildung 1b). Demzufolge lassen sich P450-Cytochrome nur sehr schwer rekonstituieren, da zur Cofaktorentnahme eine beinahe komplette Denaturierung des Proteins erforderlich ist. Die Herstellung von P450-Apoproteinen erfordert daher ein vorsichtiges Einstellen der Extraktionsbedingungen, für das Correia und

Meyer^[83] eine Behandlung mit sauren Pufferlösungen vorschlugen. Diese Methode sieht keine Extraktion des Cofaktors vor, sondern beruht auf einer In-situ-Zersetzung der Hämgruppe durch die Behandlung mit konzentrierter Wasserstoffperoxidlösung oder Detergenzien in Gegenwart von 1 % β -Mercaptoethanol und ergibt Ausbeuten von bis zu 90 % an rekonstitutionsfähigem Apoenzym.^[83,84] Sadano und Omura untersuchten diese Methode zur Entfernung des Häms aus P450-Enzymen. Hierbei beobachteten sie, dass die Halbwertszeit der Polypeptidkette von Cytochrom P450 in vivo deutlich größer ist als die der Hämgruppe.^[85] Diese Beobachtung liefert auch einen Hinweis auf den Umsatz des Cofaktors innerhalb der Zelle, denn sie lässt darauf schließen, dass die Cytochrom-P450-Enzyme während ihrer Lebenszeit die prosthetische Gruppe mehrmals wechseln können.

Wegen der drastischen Bedingungen, die zur Herstellung von P450-Apoenzymen benötigt werden, ist es sehr schwer, funktionelle Enzyme durch anschließende Rekonstitution zu gewinnen; dementsprechend finden sich bis heute nur wenige Literaturbeispiele. Eines davon beschreibt die Behandlung von mikrosomalem P450_{LM2} mit Wasserstoffperoxid durch Uvarov et al. 50 % des damit generierten Apoenzyms konnten anschließend zum aktiven Holoenzym rekonstituiert werden.^[76] Dieselbe Methode wurde bei bakteriellem P450_{sec} angewendet, das anschließend mit Hämderivaten mit veresterten Propionatresten rekonstituiert wurde, um den Einfluss dieser Gruppen auf die Enzymstabilität und -aktivität zu untersuchen.^[86]

Großes Interesse besteht nicht nur an der Entwicklung von Methoden zur Hämentfernung, sondern auch am Mechanismus der Aufnahme der prosthetischen Gruppe durch ein Apoenzym. Vasudevan und McDonald beschrieben vier verschiedene Phasen der Apohämoglobinrekonstitution mit Häm und bestimmten Geschwindigkeitskonstanten für jede dieser Phasen unter Einsatz spektrophotometrischer Hämtitrationen.^[87] Die vier Phasen umfassen die Häminsertion (Phase I), lokale Reorganisation der Proteinstruktur (Phase II), globale konformative Antwort (Phase III) sowie die langsamste Phase, die irreversible Histidin-Eisen-Kupplung (Phase IV). In vorausgehenden Arbeiten war es Rose und Olson bereits gelungen, die Gleichgewichtsdissociationskonstante der Häm-Hämoglobin-Komplexbildung (6.2 μ M) durch Stopped-Flow-Spektroskopie zu bestimmen.^[81] Die Theorie der verschiedenen Rekonstitutionsphasen^[88–91] wird mittlerweile durch weitere spektroskopische und kinetische Untersuchungen gestützt, die mit Hämoglobin und anderen Hämproteinen durchgeführt wurden. Daher ist dieses Modell inzwischen als der allgemeine Rekonstitutionsmechanismus akzeptiert. Obwohl die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten besagen, dass sich die Wechselwirkung von freiem Häm und Apoproteinen schnell einstellt [so liegt z.B. die Halbwertszeit der Phase I (Häminsertion in das Apohämoglobin) ungefähr bei 10 ms, während die der Phase II (Reorganisation der Polypeptidkette) bei ungefähr 40 s^[88] liegt], dauert der komplette Prozess bis zur Bildung des kompletten, aktiven Holoenzym Stunden bis Tage. Der Grund hierfür ist vermutlich die Zeit, die für die Äquilibrierung der korrekten Hämorientierung während der Phasen III und IV benötigt wird. Des Weiteren hängt die Geschwindigkeit dieses Pro-

zesses stark von den Umgebungsbedingungen, wie Temperatur und pH-Wert, ab. Auch kann die Abfolge der einzelnen Phasen I–IV von einem Apoprotein zum anderen variieren. So ist beispielsweise bei der Rekonstitution von apoMb dessen Tertiärstruktur nahezu genauso stabil wie die von nativem Mb;^[90] daher scheint hier die Phase II völlig zu fehlen.^[92] Andererseits ist es aber auch möglich, dass für das Apoenzym 30 % der nativen helicalen Strukturelemente verloren gehen und alle vier Phasen während der Rekonstitution experimentell beobachtet werden können.^[88] Dies wurde beispielsweise für apoHb beobachtet.

Eine der Schlüsselfragen ist die nach der Zeitspanne, die für das Aufnehmen des Häms benötigt wird. Die Konformationszustände während der Rückfaltung von HRP und CCP, nach Entfernen und Wiedereinbringen von Häm, weichen deutlich voneinander ab.^[93] Untersucht wurden die Konformationszustände mithilfe von Circular dichroismus (CD)- und Fluoreszenzspektroskopie. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde auch beobachtet, dass CCP Häm zeitgleich mit der Faltung der Polypeptidkette einbaut; bei apoHRP geschieht dies hingegen erst nach der kompletten Rückfaltung der Polypeptidkette. Demnach erkennt und bindet das denaturierte apoHRP seinen Hämcofaktor erst, wenn es vollständig und korrekt zurückgefaltet ist. Die Halbwertszeit der Entfaltung von HRP ist deutlich länger (519 s) als bei CCP (14 s), was auf eine höhere kinetische Stabilität von HRP gegenüber CCP schließen lässt.^[93] Laut Vasudevan und McDonald verläuft die Häm-Rekonstitution von nativem HRP ebenfalls über einen vierphasigen Mechanismus, allerdings mit anderer Phasenabfolge: So beobachtet man zunächst Phase II und III, und erst anschließend folgen Phase I und IV. Für die Rekonstitution von apoCCP gibt es Hinweise für einen gleichen Verlauf wie bei Hämoglobin.^[93]

Ein ähnlicher Mechanismus lässt sich auch für P450-Enzyme vermuten, wenngleich bisher keine Daten zur deren Rekonstitutionskinetik veröffentlicht wurden. Uvarov et al. berichteten auf Grundlage von Schätzungen aus CD-Spektren, dass fünf Sekundärstrukturen in nativem, Apo- und rekonstituiertem holoP450_{LM2} vorliegen.^[76] Die Autoren beobachteten, dass der helicale Anteil nach Entfernung der prosthetischen Hämgruppe aus dem nativen Enzym von 34 auf 60 % ansteigt und dass dieses Verhältnis durch Zugabe eines Überschusses an Cofaktor umgekehrt werden kann.^[76]

Andere Enzyme hingegen, insbesondere stark glycosylierte Hämproteine wie die Chlorperoxidase (CPO), ließen sich bislang trotz Erprobung verschiedenster Methoden nicht in eine aktive Konformation zurückzufalten.^[94] CPO ist ein vielseitiger Biokatalysator für eine Reihe von Reaktionen, wie die peroxidative Chlorinierung,^[95] die Desalkylierung von Heteroatomen^[96] und die Alkenepoxidierung.^[97] CPO bindet Häm in seinem aktiven Zentrum über eine Cysteinyligation.^[98] Im Verlauf von heterologen Expressionsstudien gelang es, apoCPO direkt aus *E. coli*-Zellen zu isolieren und anschließend mit nativem Häm zu rekonstituieren, allerdings erhielt man unter normalen Bedingungen nur 1 % holoCPO. Auch eine Verschärfung der Bedingungen durch Anlegen von hohem Druck erhöhte die Ausbeute lediglich auf 5 %. Dies ist bis zum heutigen Zeitpunkt die beste Ausbeute an rekonstituiertem CPO.^[99]

3.2. Rekonstitution von Apoenzymen mit nichtnatürlichen Hämderivaten

Die chemische Modifizierung der Hämgruppe kann eine oder mehrere der oben beschriebenen Rekonstitutionsphasen beeinflussen und auch zur Änderung der Funktion von Hämproteinen führen. Die Hämgruppe kann an mehreren Positionen modifiziert werden; dabei sind die am häufigsten modifizierten Positionen des Porphyrinringes die Positionen 2, 4, 6 und 7 (Abbildung 8) sowie das Metallzentrum (Austausch gegen ein anderes Metall). Unter allen Hämzymen wurde das Myoglobin am intensivsten untersucht und hat daher Modellcharakter. Da frühere Arbeiten an Myoglobin umfassend in den empfehlenswerten Übersichtsartikeln von Roncone et al.^[100] oder Hayashi und Ogoshi^[101] beschrieben sind, werden wir uns hier auf eine Zusammenfassung genereller Rekonstitutionsstrategien und aktueller Fortschritte bei anderen Hämzymen konzentrieren.

3.2.1. Struktur-Funktions-Beziehungen

Apoenzymmodelle wurden zum Studium der Struktur-faktoren eingesetzt, die die Enzymstabilität und -aktivität bestimmen. Eine Vielzahl unterschiedlicher Hämstrukturen ist bekannt, die sich hauptsächlich in ihren Protoporphyrin-substituenten unterscheiden (Abbildung 8). Diese Substituentengruppen beeinflussen die Aktivität von Enzymen in hohem Maße. Ein interessantes Beispiel für den Einfluss der Porphyrin-substituenten bietet die Cytochrom-Oxidase aus *Pseudomonas aeruginosa*, die keinerlei Oxidaseaktivität mehr zeigt, wenn ihre native Häm-d₁-Gruppe (**15**; Abbildung 8) gegen Deuterohäm (**19**), Mesohäm (**20**) oder Protohäm (Porphyrin ohne Eisen) ausgetauscht wird. Dagegen führt die Rekonstitution mit Häm *a* (**11**) nur zu geringen Änderungen der Oxidaseaktivität. Dieses Ergebnis wurde sowohl auf die kompakte Struktur der Hämgruppen als auch auf das Fehlen von gesättigten Bindungen zwischen C7 und C8 und der Hydroxygruppe an C2 zurückgeführt, welche die Enzym-Cofaktor-Wechselwirkung beeinflussen.^[102]

Während der 1960er und 1970er Jahre wurden zur Erforschung der Wechselwirkungen zwischen Cofaktor und aktivem Zentrum auf molekularer Ebene zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, die sich ausschließlich mit der Proteinfunktion beschäftigten, da die kristallographischen Daten vieler Enzyme noch nicht zugänglich waren.^[103] Später folgten detailliertere Untersuchungen der Enzyme, beispielsweise an Myoglobin, in denen die enzymatischen Eigenschaften untersucht und Möglichkeiten zur Verbesserung der nativen Aktivität geprüft wurden.^[104–111] Ein Beispiel hierfür sind Untersuchungen der CO-Bindung an halbsynthetischen Mb-Derivaten. Diese waren mit vier verschiedenen Hämgruppen rekonstituiert worden, um Struktureinflüsse auf die Ligan-denbindung aufzuklären. In diesen Arbeiten zeigte sich, dass die CO-Assoziation bis zu 20fach und die CO-Dissoziation bis zu 36fach gesteigert werden kann, wenn die Zugänglichkeit zum aktiven Zentrum durch Verwendung kleinerer Cofaktoren verändert wird.^[107] In anderen Untersuchungen wurden die elektrochemischen Eigenschaften der rekonstituierten Myoglobinderivate analysiert, mit dem Ziel der

Entwicklung elektrochemischer Biosensoren. Dabei stellte sich heraus, dass die Einführung von z. B. Stickstoffatomen in den Porphyrinring einen deutlich geringeren Einfluss auf die elektrochemischen Eigenschaften hat als eine Veränderung der Hämumgebung in der Proteinhülle.^[112]

Als Folge der ersten Arbeiten zur Häm-Rekonstitution wuchs das Interesse am Mechanismus der Neuorientierung des Häms im aktiven Zentrum der Globine während der In-vivo-Biosynthese oder der Rekonstitution nativer Proteine. Verschiedene Methoden wurden angewendet, um den Einfluss der Hämorientierung auf die Enzymstabilität und -funktion zu untersuchen.^[113,114] Dazu zählte unter anderem die Verwendung von Cofaktoren, die z. B. mit fluormarkierten Substituenten für die ¹⁹F-NMR-Spektroskopie modifiziert waren.^[115] In einer anderen Studie untersuchten Tomlinson und Ferguson die Proteinfaltung während der Proteinbiosynthese, indem sie zwei Cysteinreste von Cytochrom *c*, die Häm kovalent binden [Häm *c* (**12**)], gegen Alanin austauschten. Diese Apocytochrom-*c*-Mutante wurde mit Häm *b* (**10**) rekonstituiert.^[116] Strukturchemische Untersuchungen der resultierenden, zu Cytochrom *b* analogen Proteine, bei denen das Häm nicht kovalent gebunden war, ließen die Vermutung zu, dass die Faltung des Apoproteins während der Cytochrom-*c*-Biosynthese bereits abgeschlossen ist und erst anschließend das Häm aufgenommen wird. Dieses Resultat stellte die lange bestehende Theorie infrage, dass Cytochrome ausschließlich durch cotranslationale Bindung entstehen, da die Bedingungen zur Holoenzymbildung von Cytochrom *c* und *b* bereits vor der Hämaufnahme erfüllt sind.^[116] Weitere Informationen zur In-vivo-Biosynthese von Holoenzymen lieferte kürzlich eine Studie zur Myoglobinrekonstitution, in der gezeigt werden konnte, dass erst nach der Faltung des Proteins eine kompakte Cofaktor-Protein-Struktur gebildet wird.^[117]

3.2.2. Modifikationen der Hämstruktur

Die Rekonstitution von Apoenzymen mit modifizierten Cofaktoren ist eine leistungsfähige Methode für die Suche nach neuen und verbesserten Enzymaktivitäten, auch wenn ihr Potenzial erst noch voll ausgeschöpft werden muss. Um die Substratbindung von HRP zu verstehen und um bessere Aktivitäten zu erhalten, tauschten Harris et al. das native Häm **10** gegen zwei Hämderivate mit verschiedenen *δ-meso*-Substituenten aus.^[118] Dieses Konzept ermöglichte die Aufklärung des Oxidationsmechanismus verschiedener Substrate und führte zur Identifizierung einer neuartigen HRP mit erhöhter Sulfoxidationsaktivität. Frühere Arbeiten zur Peroxidaseaktivität von HRP hatten gezeigt, dass eine Modifikation der Carboxygruppen an den Hämpositionen 6 und/oder 7 (Mono- bzw. Dimethylester) zur drastischen Reduzierung der ursprünglichen Peroxidaseaktivität führt. Dagegen hatten Veränderungen an den Vinylgruppen in Position 2 und 4 keinerlei Einfluss auf die Peroxidaseaktivität.^[119] Diese Effekte sind gegensätzlich zu denen, die für Hämoglobin^[120] und Myoglobin^[121] beobachtet wurden: Bei Hb und Mb beeinflusst eine Substitution in den Positionen 2 und 4 die Sauerstoffbindungskapazität immens, während eine Funktionalisierung der Positionen 6 und 7 keine Auswirkung auf

die Bindung von Sauerstoff hat. DiNello et al. zeigten, dass eine Modifikation der Propionatreste (Verlängerung um eine Methylengruppe) die Rekonstitution von HRP nur wenig beeinträchtigt, während die Aktivität drastisch reduziert wird. Diese Beobachtung macht deutlich, dass nicht nur das bloße Vorhandensein der Carboxygruppen, sondern auch ihr Abstand vom aktiven Zentrum essenziell für die Enzymaktivität ist. Aus diesem Grund müssen bei der Entwicklung neuartiger Enzyme sowohl die Gestalt des aktiven Zentrums als auch spezifische Wechselwirkungen der ionisierbaren Carboxygruppen mit positiv geladenen Seitenketten auf der Proteinoberfläche beachtet werden.^[122] Die Abschnitte 3.2.2.1–3.2.2.4 werden sich nun detaillierter mit der Verwendung von modifizierten Hämderivaten zur Aufklärung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und zur Modifizierung von katalytischen Eigenschaften beschäftigen.

3.2.2.1. Modifizierung der Positionen 6 und 7

Die Propionatreste (Positionen 6 und 7; Abbildung 8) mancher Hämproteine wie Myoglobin und Cytochrom *b*₅ bilden mit benachbarten Aminosäureseitenketten der Proteinoberfläche Wasserstoffbrücken, die wahrscheinlich den Häm-Protein-Komplex stabilisieren.^[123] Deswegen kann eine Rekonstitution mit Hämcofaktoren, die über modifizierte Propionatreste verfügen, nicht nur zu einer signifikanten Veränderung von Rekonstitutionsmechanismus und Rekonstitutionskinetik, sondern auch zu veränderten Proteinfunktionen führen. So konnten Hunter et al. zeigen, dass allein die Eliminierung einer einzelnen Wasserstoffbrücke durch ortsgerichtete Mutagenese zu einer signifikanten Veränderung der Gleichgewichtskonstante bei der Hämorientierung führt.^[124] Auch kam es durch die Eliminierung dieser Wasserstoffbrücke zu einer deutlich verringerten thermischen Stabilität und zur Erhöhung der Häm dissoziationskonstanten. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Veresterung der Propionatreste im Cytochrom *b*₅ zu einer Herabsetzung der Denaturierungstemperatur um 10 K führt. Die Rekonstitution von Apomyoglobin mit einem Häm, das veresterte Propionatreste trägt, bewirkt eine 40fache Erhöhung der Häm dissoziationskonstanten. Diese deutlichen Veränderungen wurden der allgemeinen Destabilisierung des Häms im aktiven Zentrum zugeschrieben, da durch die Veresterung drei Wasserstoffbrücken verloren gehen.^[124]

Hayashi et al. berichteten von einer chemischen Modifikation der Hämpropionatreste mit acht Carboxygruppen (**25**; Abbildung 9). Dies führte zur Veränderung der Substratspezifität und -reaktivität von Mb, obwohl die UV/Vis-, CD- und NMR-Spektren des modifizierten **rMb25** (r: rekonstituiert) denen des nativen Mb ähnelten.^[125,126] Ferner wurde beobachtet, dass die Bildungskonstante der entstehenden, Peroxidase-ähnlichen Oxoferrylspezies II für das rekonstituierte **rMb25** um das Zehnfache gegenüber der von nativem Mb anstieg, wenn Wasserstoffperoxid zugegeben wurde.^[125] Aus diesen Befunden wurde abgeleitet, dass durch die Strukturveränderungen des Hämgerüsts die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für Wasserstoffperoxid verbessert wurde. Zudem beobachtete man bei kinetischen Messungen unter stationären Bedingungen, dass Affinität und Umsatz von

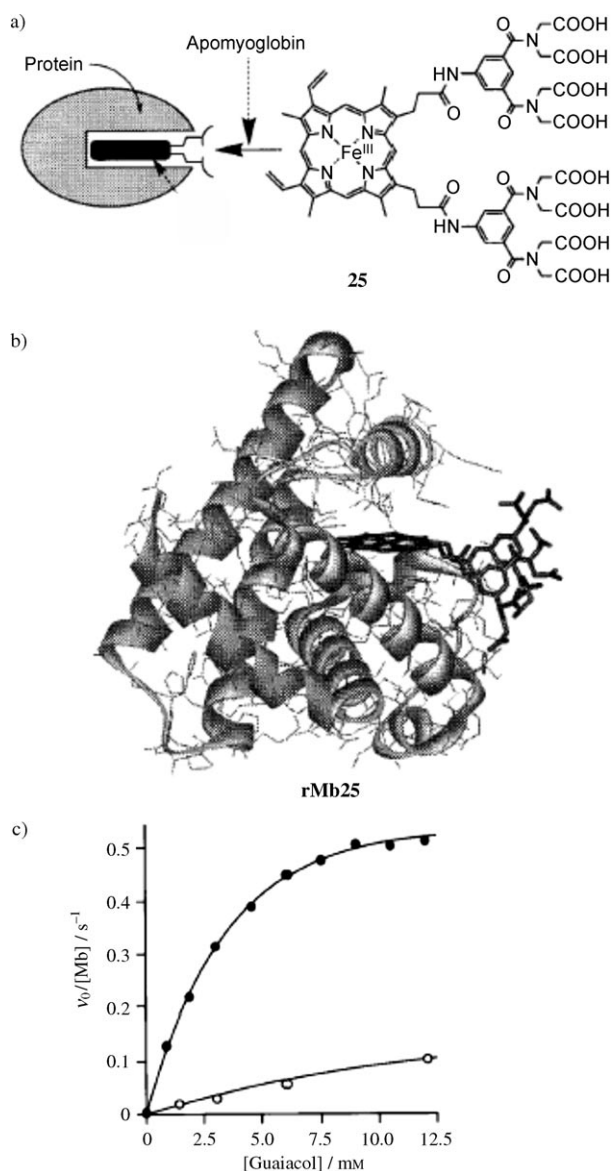


Abbildung 9. a) Häm mit modifizierten Propionatresten (**25**) und Rekonstitution von apoMb zu **rMb25**. b) Struktur des von Hayashi et al. rekonstituierten **rMb25**.^[125] c) Mit diesem modifizierten Protein (●) wird eine höhere Aktivität der Guaiacoloxydation als mit nativem Mb (○) beobachtet; v_0 : Anfangsgeschwindigkeit. Wiedergabe aus Lit. [125] mit Genehmigung. Copyright 1999 American Chemical Society.

rMb25 gegenüber Guaiacol deutlich erhöht waren, sodass auch die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M 30-mal höher war als die von nativem Mb. Eine ähnliche Studie beschäftigte sich mit den Eigenschaften von rekonstituiertem Mb, dessen Hämpropionatreste mit vier Carboxygruppen (anstatt mit acht, wie in **25**) modifiziert worden waren. Hierbei zeigte sich eine um den Faktor 810 erhöhte Selektivität für die Bindung von Sauerstoff gegenüber Kohlenmonoxid.^[127]

Eine Modifikation der Propionatreste kann auch zu einer signifikanten Gleichgewichtsänderung der Hämorientierung in den rekonstituierten Mb-Proteinen führen. In einer Studie von Monzani et al. wurde der Propionatrest von Häm an

Position 6 gegen Histidin (Mb-H) oder das Arginin-Alanin-Dipeptid (Mb-RA) ausgetauscht und anschließend in Mb eingebaut.^[128] Für natives Mb sind zwei verschiedene Orientierungen der Hämgruppe möglich, die sich durch eine Rotation um 180° entlang der α/γ -meso-Hämachse (**10** in Abbildung 8) unterscheiden. Normalerweise liegen 92 % des gebundenen Häms in der nativen und 8 % in der um 180° gedrehten Orientierung vor. Dagegen wurde für Mb-H eine Mischung aus vier Isomeren beobachtet, von denen zwei ein High-Spin- und zwei ein Low-Spin-Eisenzentrum aufwiesen. Beim Vergleich der rekonstituierten Myoglobine mit dem nativen Enzym waren jedoch nur geringe Veränderungen in der Soret-Region (402–412 nm) und keine augenscheinlichen Unterschiede im sichtbaren Bereich des Spektrums zu erkennen. Die Ähnlichkeiten der Spektren legten nahe, dass durch die Modifikation der Propionatreste lokale Konformationsänderungen auftreten, die globale Konformation jedoch nicht gegenüber jener von nativem Mb verändert ist. Eine Veresterung der Propionatreste kann auch die Hydrophobie des aktiven Zentrums beeinflussen und damit die Affinität des Enzyms für hydrophobe Substrate erhöhen. Dieses Phänomen wurde für das mit verestertem Häm rekonstituierte Hämoglobin beobachtet. Dieses Enzym zeigte eine 30-mal höhere Affinität für Phenolsubstrate als das native Hämoglobin.^[129]

Mithilfe von Amidkuppelungsreaktionen können weitere funktionelle Gruppen in die Propionatreste des Porphyrins eingebracht werden. So wurden beispielsweise Phenylboronsäurefunktionen durch Rekonstitution mit dem modifizierten Häm **26** (Abbildung 10) in Mb eingeführt.^[130] Da Phenylbo-

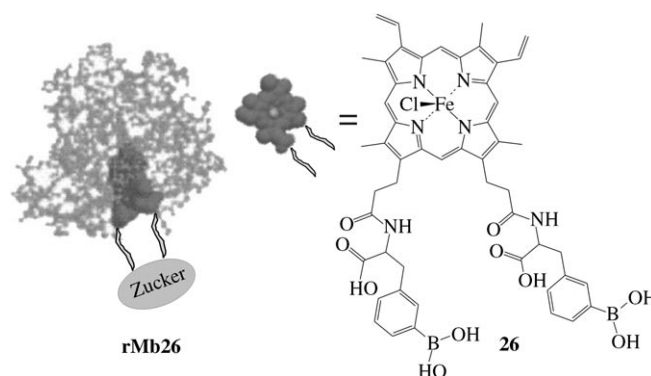


Abbildung 10. Mb, rekonstituiert mit Phenylboronsäure-modifiziertem Häm, um die Bindung von Monosacchariden zu ermöglichen.^[130]

ronsäurederivate spezifische Wechselwirkungen mit Kohlenhydraten wie D-Fructose eingehen, sollte dies eine Stabilisierung der Hämcofaktor-Apoprotein-Wechselwirkung ermöglichen. Interessanterweise verbesserte die Kohlenhydratwechselwirkung auch deutlich die Fähigkeit des halbsynthetischen Myoglobins **rMb26** zur Sauerstoffspeicherung.^[131] Dies war eines der ersten Beispiele für einen neuartigen Biosensor, der durch Einführung neuer funktioneller Gruppen an den Propionatresten des Häms erhalten wurde. Dieses Konzept wurde in nachfolgenden Arbeiten weiterentwickelt.^[132, 133]

Für die Familie der P450-Enzyme gibt es nur wenige entsprechende Studien zur Modifizierung der Hämpositionen 6 und 7, allerdings wurde ein Beispiel für das bakterielle P450_{BM3} beschrieben. In dieser Arbeit wurde das natürliche Häm gegen den Eisenprotoporphyrin-IX-Dimethylester **21** ausgetauscht (Abbildung 8).^[74] Hierdurch wurde ein Enzym generiert, das eine höhere Affinität für Dodecansäure sowie ähnliche Katalysekonstanten wie das native Enzym aufweist. Konsequenterweise katalysiert das rekonstituierte Enzym die Hydroxylierung von Dodecansäure bis zu dreimal effizienter als seine native Vorstufe. Die verbesserte Affinität wurde der erhöhten Hydrophobie des aktiven Zentrums zugeschrieben, da die negativen Ladungen der Propionatreste in Nachbarschaft zur Fettsäurebindungstelle durch Veresterung entfernt wurden. Das UV/Vis-Spektrum des halbsynthetischen Enzyms glich dem seines nativen Gegenstücks. Dies ließ die Vermutung zu, dass keine signifikante globale Strukturänderung durch den artifiziellen Cofaktor induziert wurde.

3.2.2.2. Modifizierung der Positionen 2 und 4

Einige Untersuchungen beschäftigten sich mit den Auswirkungen von Modifikationen des Porphyrinrings an den Positionen 2 und 4. Seybert und Moffat führten Röntgenstrukturanalysen von Pferdehäemoglobin durch, das mit Deuterohäm (**19**) und Mesohäm (**20**) rekonstituiert worden war, die sich in ihren Substituenten an den Positionen 2 und 4 unterscheiden; die Produkte der Rekonstitution sind **rHb19** bzw. **rHb20**. Im Vergleich mit nativem Hb zeigte **rHb20** zahlreiche Strukturveränderungen in unmittelbarer Nähe des Hämzentrums; der Einbau von **19** verursachte hingegen nur kleinere und stark lokalisierte Strukturveränderungen in **rHb19**.^[134,135] Nachfolgende NMR-spektroskopische Untersuchungen ergaben, dass eine Modifizierung der Seitenketten in den Positionen 2 und 4 des Porphyrins (wie in **20**) die Tertiär- und Quartärstruktur des Hämoglobins stark verändern kann. Ferner induziert die Modifizierung bei **rHb20** eine Veränderung in den Kontaktregionen von Häm und Proteingerüst, da eine Verzerrung der eingebundenen Wasserstoffbrücken auftritt.^[136,137] Durch eine Enzymaktivitätsstudie konnten La Mar et al. zeigen, dass die Rekonstitution von apoHb mit unmodifiziertem Häm ein komplett funktionelles Hb liefert, während der Austausch gegen **19** und **20** die Stabilität des Enzyms gegenüber denaturierenden Reagentien wie Harnstoff um den Faktor 25 bzw. 100 verringert.^[89]

Die Substitution an den Positionen 2 und 4 hat auch großen Einfluss auf die Konformationsstabilität des Häms innerhalb des aktiven Zentrums. ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen der Hämrotation in Pottwalmyoglobin zeigten, dass das Gleichgewichtsverhältnis zwischen der nativen (90 %) und der ungeordneten Hämorientierung (10 %) beinahe unverändert bleibt, während die Umwandlungskonstante von der einen zur anderen Konfiguration drastisch von den Substituenten an Position 2 und 4 abhängt. Die Geschwindigkeiten steigen vom nativen Häm (**10**; 2,4-Divinyl-substituiert) über das Mesohäm (**20**; 2,4-Diethyl-substituiert) bis zum Deuterohäm (**19**; 2,4-Dihydro-substituiert).^[138]

Katalysestudien mit rekonstituierten HRP-Derivaten wiesen darauf hin, dass die Substituenten der Positionen 2

und 4 sterisch mit dem Proteingerüst wechselwirken.^[122] Allerdings scheinen diese Positionen konformativ sehr flexibel zu sein, da eine große Zahl an 2,4-disubstituierten Hämderivaten in apoHRP eingebaut werden konnte. Die katalytischen Aktivitäten der resultierenden HRP-Derivate variierten beträchtlich je nach Hämmodifikation. So zeigten (im Vergleich zu nativem HRP mit 100 % Aktivität) mit **19** und **20** modifizierte HRP-Varianten Peroxidaseaktivitäten von 75 bzw. 35 %, und eine mit 2,4-Diformyl-Häm (**22**) modifizierte HRP hatte eine Aktivität von 60 %.^[122] Der Austausch von nativem Häm gegen **20** in Cytochrom P450_{BM3} lieferte ein Protein, das eine unveränderte Affinität für Dodecansäure, aber einen reduzierten katalytischen Umsatz zeigte.^[74] Dieser Befund ließ darauf schließen, dass die Struktur des Hämrestes eine entscheidende Rolle bei der Bildung der Substratbindungstasche spielt und dass sich eine Veränderung der Elektronendichte des Eisenzentrums im Häm auf die katalytischen Eigenschaften auswirken kann. Ein Austausch der Vinylgruppen von **10** gegen Ethylgruppen, wie in **20**, hat einen Anstieg der Elektronendichte des Hämeisenzentrums zur Folge. Offenbar führt dieser Anstieg zu einer Abnahme der Reduktionskraft und infolgedessen zu einem Rückgang der Substrathydroxylierung.

3.2.2.3. Modifizierung der Position 8

Die Position 8 des Porphyrinrings wurde ebenfalls modifiziert, und die erhaltenen Hämderivate wurden in Rekonstitutionsreaktionen mit Peroxidasen eingesetzt. Harris et al. berichteten, dass die Spektren von „Compound I“ und „Compound II“, die Schlüsselintermediate des Peroxidasezyklus sind,^[139] für die Meerettichperoxidasen mit dem nativen Häm **10**, 8-Hydroxymethyl-Häm (**23**; Produkt: **rHRP23**) oder 8-Formylhäm (**24**; Produkt: **rHRP24**) identisch waren.^[140] Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Bildungskonstanten von „Compound I“ für natives HRP und **rHRP23** gleich waren, während „Compound I“ für **rHRP24** bedeutend weniger stabil war und nur als kurzlebige Spezies detektiert werden konnte. **rHRP23** katalysierte auch die Oxidation von Guaiacol, Iodid und Thioanisol in gleichem Maße wie das native Enzym. **rHRP24** erwies sich hingegen als kaum aktiv bei diesen Umsetzungen, z.B. katalysierte sie die Oxidation von Guaiacol viermal langsamer.^[117,118] Diese Befunde demonstrieren, dass durch eine Veränderung an Position 8 des Hämgerüsts sowohl die Enzymaktivität als auch die Stabilität der Intermediate des Peroxidasezyklus beeinflusst werden können.

3.2.2.4. Austausch des Eisenzentrums

Um mithilfe verschiedener spektroskopischer Methoden einen Einblick in die Struktur aktiver Enzyme und Intermediate zu erhalten, wurde das Eisenzentrum des Häms gegen verschiedene andere Metallionen, z.B. Co-, Zn- oder Mn-Ionen, ausgetauscht. So wurden beispielsweise durch eine einfache Komplexierung von Cobaltsalzen wie CoCl₂ oder Co(OAc)₂ mit einem Porphyrin Cobaltporphyrinanaloga hergestellt und anschließend zur Rekonstitution von Mb, Hb,^[141–144] HRP^[145] und P450_{cam}^[75] verwendet. Die erhaltenen

Enzyme ermöglichten den Einsatz der EPR-Spektroskopie, da Cobaltspezies hier als vielseitige Sonden fungieren können. So konnten detaillierte Untersuchungen der Bindung molekularen Sauerstoffs und anderer Substrate an den künstlichen Cofaktor durchgeführt werden. Weiterhin wurden Co- und Mn-Derivate eingesetzt, um rekonstituierte Myoglobine zu herzustellen, die dann umfassend mit elektrochemischen Methoden studiert wurden, um mögliche Anwendungen in der Biosensorik zu erforschen.^[146,147]

3.3. Einführung neuer Funktionen

Der Austausch des nativen Hämcofaktors gegen ein synthetisches Derivat mit nichtnatürlichen funktionellen Gruppen bietet die Möglichkeit, Enzyme mit geänderten, verbesserten und sogar völlig neuen Funktionen zu erschließen. Einen Überblick über repräsentative Modifikationen und

deren Einfluss auf die Aktivität gibt Abbildung 11. In diesem Abschnitt werden einige ausgewählte Beispiele für solche künstlichen Hämenzyme und deren Anwendungen vorgestellt und diskutiert.

3.3.1. Design photoaktiver Zentren

Die Photoaktivierung von Hämzymen wird intensiv untersucht, da sich auf diese Weise nicht nur die Aktivierung des Enzyms zeitlich steuern ließe, sondern auch die Verwendung von oxidativen Aktivatoren [z.B. H₂O₂ für Peroxidasen oder Nicotinamid-adenin-dinucleotid(-phosphat) (NAD(P)H) für Oxygenasen] vermieden werden könnte. Um dieses anspruchsvolle Ziel zu erreichen, müssen die natürlichen Enzyme mit photoaktivierbaren Gruppen modifiziert werden, die es dem Enzym ermöglichen, Licht zu sammeln und die gewonnene Energie für Redoxreaktionen zu nutzen. Des Weiteren sollten sie die produzierten Elektronen auf das

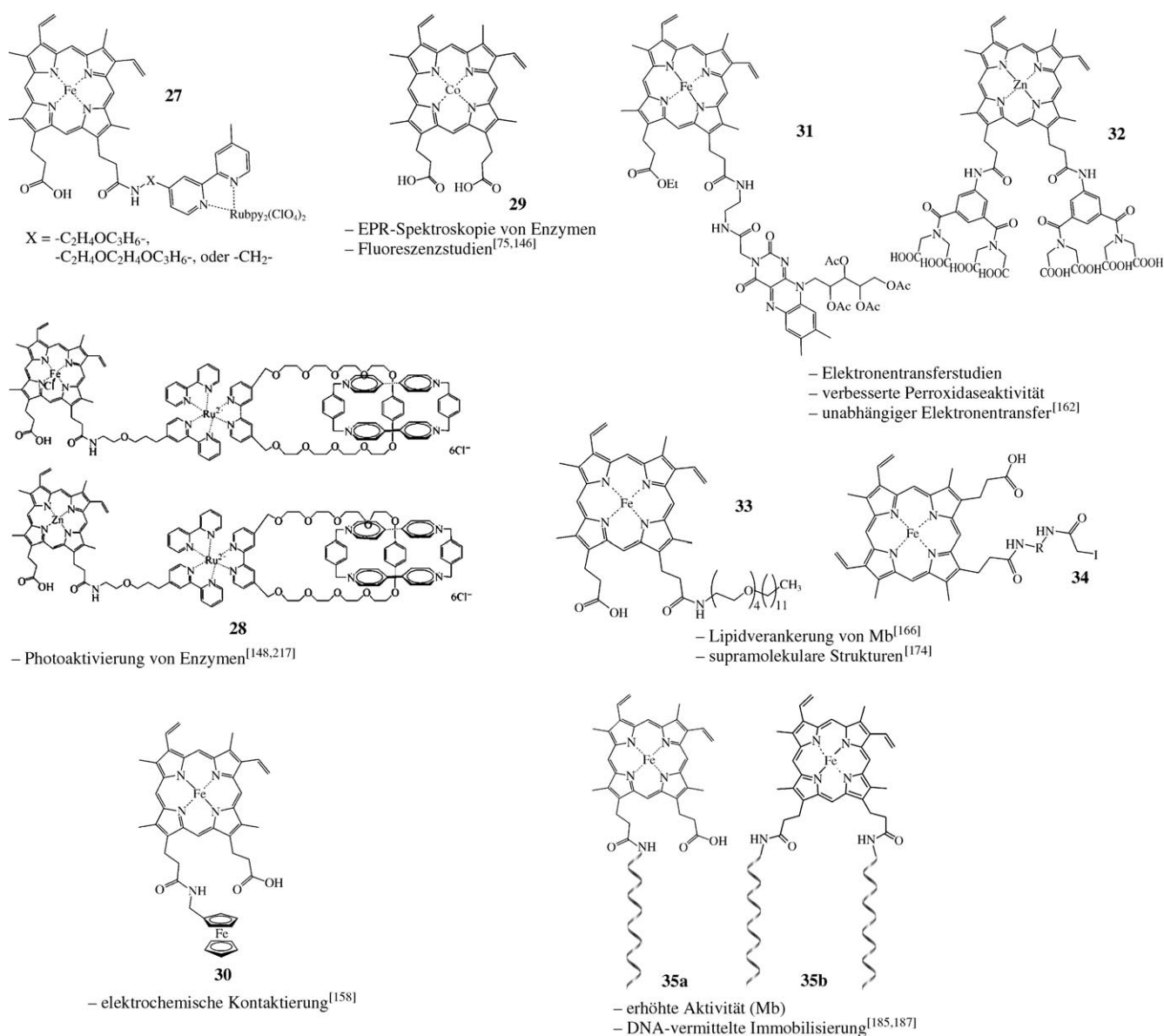


Abbildung 11. Modifizierte Cofaktoren und Anwendungen der rekonstituierten Enzyme; bpy: 2,2'-Bipyridin.

Metallzentrum des Häm übertragen können. Einen guten Ausgangspunkt für eine Modifizierung durch ortsgerichtete, einfache chemische Methoden bietet der natürliche Hämcofaktor mit seinen beiden Carbonsäurefunktionen. Viele der bahnbrechenden Arbeiten zur Einführung photoaktivierbarer Spezies in Myoglobin mithilfe der Rekonstitutionsmethode stammen von den Arbeitsgruppen um Hayashi und Shinkai. So synthetisierten beispielsweise Shinkai und Mitarbeiter das Hämderivat **27** (Abbildung 11), das eine photoempfindliche Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-Einheit trägt. **27** kann mit sichtbarem Licht^[148] effektiv aktiviert werden und wurde in apoMb unter Bildung von **rMb27** eingeführt (Abbildung 12). Der gebundene Cofaktor kann durch den pho-

die Chromophore für definierte Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen enthalten. Ihrer wegweisenden Arbeit von 1993^[148] folgend, berichteten Hamachi et al., dass die Photoaktivierung von halbsynthetischem Myoglobin, das mit dem künstlichen Cofaktor **27** rekonstituiert wurde (Abbildung 11), zur Bildung von Compound II des Peroxidasezyklus (Oxoferrylzustand, $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) führt. Dies geschieht allerdings nur in Gegenwart von Elektronenakzeptoren wie $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$.^[150] Die $\{\text{Ru}(\text{bpy})_3\}^{2+}$ -Gruppe aus Häm **27** wird zunächst photoaktiviert und anschließend durch den Akzeptor $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+}$ gelöscht, sodass $\{\text{Ru}(\text{bpy})_3\}^{3+}$ entsteht, das wiederum vom Porphyrinring ein Elektron abstrahieren und so Compound II generieren kann. Durch Laserphotolyse von **rMb27** konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die Photogenerierung von Compound II über ein Porphyrinradikal-kation verläuft. Dieses konnte nur wegen des beschleunigten intramolekularen Elektronentransfers nachgewiesen werden. Diese Befunde vertieften das Verständnis des Photoaktivierungsmechanismus von **rMb27** und machten die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für jeden Schritt des Zyklus möglich. Die erhaltenen Daten sind nicht nur wertvoll für das Verständnis des komplexen Enzymaktivierungsmechanismus, sondern auch für die zukünftige Entwicklung anderer photoaktivierbarer Enzyme von großem Nutzen.

Weiterführende Arbeiten beschäftigten sich mit der Synthese von Hämcofaktoren, bei denen Brückeneinheiten verschiedener Länge zwischen dem Rutheniumkomplex und der Hämgruppe eingebaut sind.^[149] Die Rekonstitution von apoMb mit den erhaltenen Hämderivaten und ein Vergleich der resultierenden rekonstituierten Myoglobine bezüglich Brückenlänge und Photoreaktivität ergab, dass die kürzeste Brücke die geringste Transfereffizienz aufweist. Vermutlich ist dies auf die geringe Lebensdauer der Ladungstrennung zurückzuführen, die nachfolgende Reaktionen verhindert. Ähnliche Studien mit photoaktivierbaren Ru^{2+} -Spezies führten Low et al. mit der Mikroperoxidase durch,^[151] allerdings erfolgte in diesen Arbeiten keine Rekonstitution mit dem Häm **27**; vielmehr wurden das $\{\text{Ru}(\text{bpy})_3\}^{2+}$ und der unterstützende Elektronenakzeptor der Lösung des nativen Enzyms zugegeben. Spektroskopische Studien dieses Systems und des Photooxidationszyklus von Mikroperoxidase-8 (MP8) konnten erstmals das Porphyrin-Kation-Radikal identifizieren, das bei der intramolekularen Elektronenabstraktion durch $\{\text{Ru}(\text{bpy})_3\}^{2+}$ generiert wird.^[151]

Hamachi und Mitarbeitern versuchten, die Zugabe von unterstützenden Elektronenakzeptoren unnötig zu machen, indem sie die erforderlichen Gruppen direkt am Hämcofaktor anbrachten.^[152] Zu diesem Zweck wurden Mb-basierte Donor-Sensibilisator-Akzeptor-Triaden synthetisiert, die außer Häm- oder Zn-Porphyrin auch eine Elektronenakzeptorgruppe [Cyclobis(paraquat-*p*-phenyl)] und den Sensibilisator $\{\text{Ru}(\text{bpy})_3\}^{2+}$ enthielten (**28**; Abbildung 11). Die beiden letztgenannten Gruppen sind catenanartig, nichtkovalent verbunden, während der $\{\text{Ru}(\text{bpy})_3\}^{2+}$ -Sensibilisator kovalent mit dem Hämendon verknüpft ist. Dieser Cofaktor wurde anschließend in Myoglobin eingeführt, und das resultierende Enzym hinsichtlich seines schrittweisen, vektoriellen Elektronentransfers analysiert. Nach Bestrahlung konnten langlebige Ladungstrennungen beobachtet werden.^[153] Alle

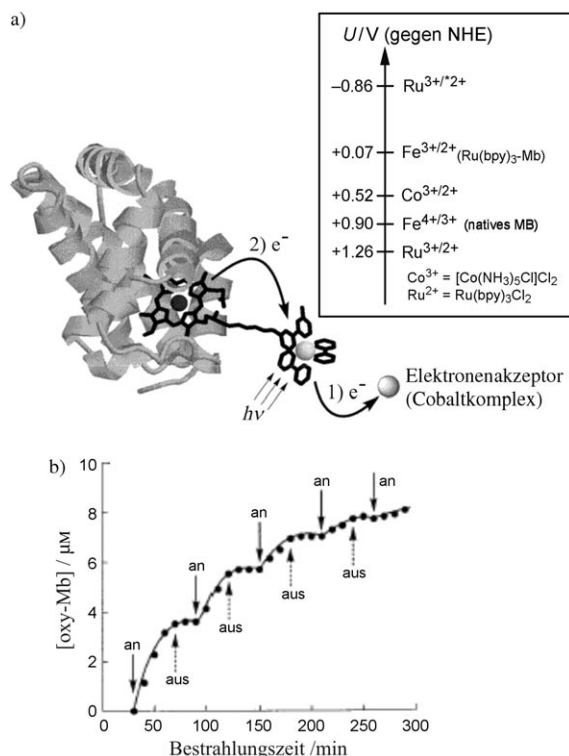


Abbildung 12. a) Elektronenabstraktion aus **rMb27**, das mit photoaktivierbarem **27** rekonstituiert wurde. Einschub: Spezies, die an der Reaktion beteiligt sind. b) Photochemische Erzeugung des Disauerstoffkomplexes oxy-Mb aus **rMb27**; an/aus: An- und Ausschalten des sichtbaren Lichts. oxy-Mb wird nur gebildet, wenn Licht eingestrahlt wird. Wiedergabe aus Lit. [148, 150] mit Genehmigung. Copyright 1993–1999 American Chemical Society.

toinduzierten Elektronentransfer von Eisen(III) zu Eisen(II) reduziert werden, was eine Koordination von molekularem Sauerstoff an das Fe^{2+} -Ion möglich macht. Zwar war eine lichtinduzierte Aktivierung des Enzyms nur möglich, wenn Ethylendiamintetraacetat (EDTA) als Elektronendonator in hoher Konzentration vorhanden war, allerdings konnte das halbsynthetische Enzym bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht ($>450\text{ nm}$) reversibel an- und ausgeschaltet werden (Abbildung 12).^[149]

Auch mithilfe anderer Protoporphyrinderivate wurden künstliche photoaktivierbare Reaktionszentren entwickelt,

genannten Prozesse sind essenziell für die natürliche Photosynthese. Daher kann man erwarten, dass das Design und die Untersuchung solcher halbsynthetischen Proteine künftig auch die Entwicklung künstlicher Photosynthesesysteme erleichtern werden.

Eine andere effiziente Strategie zum Design photoaktivierbarer Biokatalysatoren durch Modifikation des Häms mit photoaktiven Resten wurde von Willner und Mitarbeitern entwickelt.^[154] Durch den Austausch des natürlichen eisenhaltigen Häms gegen Co^{II} -Porphyrin **29** und durch eine sich der Rekonstitution anschließende Modifikation mit Eosin-Isouthiocyanat wurde das photoaktivierbare $\text{Eo}_2\text{-MbCo}^{\text{II}}$ (**rMb29**; Abbildungen 11 und 13) erhalten. Dieses System

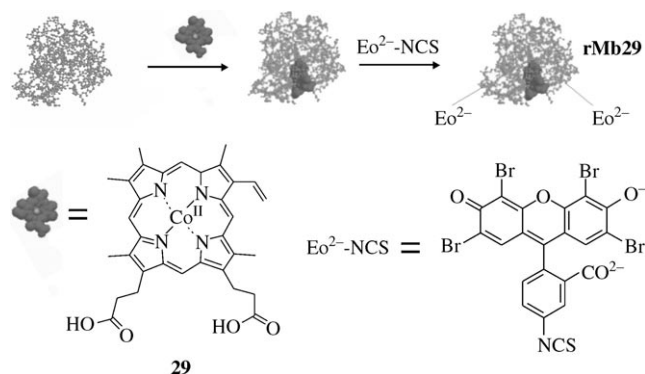


Abbildung 13. Herstellung von photoaktivierbarem Mb, das zur Hydrierung von Acetylen befähigt ist.^[154]

wurde durch Bestrahlung aktiviert, und in Gegenwart des unterstützenden Elektronendonors Na_2EDTA wurde die Hydrierung von Acetylen und Acetylendicarbonsäure katalysiert. **rMb29** war außerdem durch Belichtung bei $\lambda = 495 \text{ nm}$ photoaktivierbar. Auf diese Weise gelang es, in Gegenwart von Lactat-Dehydrogenase und dem Mediator Ferrocen die Oxidation von Milchsäure und die Reduktion von Acetylen zu katalysieren, was das Leistungsvermögen von **rMb29** als Photokatalysator verdeutlicht.^[155]

3.3.2. Elektrochemisch aktive Enzyme

Die Cofaktoren der Redoxenzyme sind in den meisten Fällen so stark durch das Proteingerüst abgeschirmt, dass sie zu weit von der Elektrode entfernt sind und somit kein direkter Elektronentransfer möglich ist. In diesen Fällen werden oft kleine, elektrochemisch aktive Moleküle (Elektronentransfer(ET)-Mediatoren) eingesetzt, die als Elektronenüberträger wirken und somit die ET-Geschwindigkeit verbessern.^[156,157] Ein Versuch zur Herstellung von elektrochemisch aktiven Enzymen wurde von Ryabov et al. beschrieben. Sie synthetisierten das Häm-Ferrocen-Konjugat **30** (Abbildung 11), indem sie aminofunktionalisiertes Ferrocen kovalent an die Propionatreste des Häms kuppelten.^[158] Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass HRP, rekonstituiert mit einem Monomethylester-modifizierten Häm, nur etwa 20 % der nativen HRP-Aktivität aufweist.^[119] Deshalb war es fraglich, ob sterisch anspruchsvolle Substituenten an diesen Po-

sitionen der rekonstituierten Hämenzyme zu funktionellen Enzymen führen würden. Dennoch ergab die Untersuchung von Ferrocen-modifiziertem **rHRP30**, dass ein funktionelles Enzym erhalten werden kann, wenn nur einer der beiden Propionatreste modifiziert wird. So zeigte **rHRP30** zwar eine dreifach verringerte Aktivität beim Umsatz von 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat) (ABTS), allerdings war die Reaktivität gegenüber künstlichen metallorganischen Substraten,^[159] z.B. modifizierten Ferrocenen, höher als die des nativen Enzyms. Dieser Anstieg wurde auf eine geänderte Zugänglichkeit des aktiven Zentrums in **rHRP30** durch die Gegenwart des modifizierten Cofaktors zurückgeführt. Wegen der Änderung des aktiven Zentrums kann **rHRP30** nichtplanare aromatische Substrate wie Ferrocen besser aufnehmen als native HRP. Weitere elektrochemische Untersuchungen dieses Systems legten nahe, dass die an das Häm gebundenen Ferrocengruppen eine direkte elektrische Kommunikation zwischen Elektrode und Hämeisenzentrum ermöglichen.^[158]

Bei einem ähnlichen Ansatz verwendeten Zimmermann et al. selbstorganisierte Monoschichten, die Brückeneinheiten zur Immobilisierung von Häm auf Goldelektroden trugen. Durch eine In-situ-Rekonstitution mit apoHRP sollten so aktive Enzymelektroden generiert werden (Abbildung 14).^[160] Auf diese Art konnten sowohl die Orientierung der Enzyme als auch ihr Abstand zur Goldoberfläche gesteuert werden. Eine detaillierte Studie der auf den Oberflächen rekonstituierten HRP offenbarte, dass die Enzymaktivität gegen Peroxidasubstrate zurückgewonnen werden konnte.

3.3.3. Elektronentransfermodelle

Elektronentransferreaktionen sind für zahlreiche biologische Prozesse, wie die Atmung und Photosynthese, von fundamentaler Bedeutung. Daher sind in natürlichen Systemen die Redoxreaktionen vieler Hämproteine eng mit Reduktasen, z.B. Cytochromen oder Flavoenzymen, verknüpft. So bestehen z.B. die P450-Monooxygenasen aus zwei verschiedenen Domänen: Eine enthält das katalytisch aktive Häm, und die andere Domäne ähnelt einem Flavoprotein.^[161] Durch diese Beispiele aus der Natur inspiriert, produzierten Hamachi et al. durch Rekonstitution von Myoglobin mit dem Riboflavin-modifizierten Häm **31** (Abbildung 11) unabhängige Elektronentransportsysteme.^[162] Unter anaeroben Bedingungen und in Gegenwart des Elektronenakzeptors NADH wurde UV/Vis-spektroskopisch die Reduktion von **rMb31** und die Entstehung von Desoxy-**rMb31** beobachtet. Die Reduktionskonstante war 13-mal höher als die des intermolekularen Systems aus nativem Mb und Flavin. Dieser Befund zeigte, dass die kovalente Anbindung von Flavin die Elektronenaufnahme durch NADH unterstützt.

Elektronentransfers zwischen Proteinen beruhen in natürlichen Systemen oftmals auf spezifischen Wechselwirkungen zwischen den beiden Redoxproteinpartnern, die wie viele Protein-Protein-Wechselwirkungen durch die sterische und elektronische Kompatibilität der Bindungspartner bestimmt werden. Um diese Prozesse nachzuahmen und für künstliche ET-Reaktionen zu nutzen, entwarfen Hitomi et al. unter

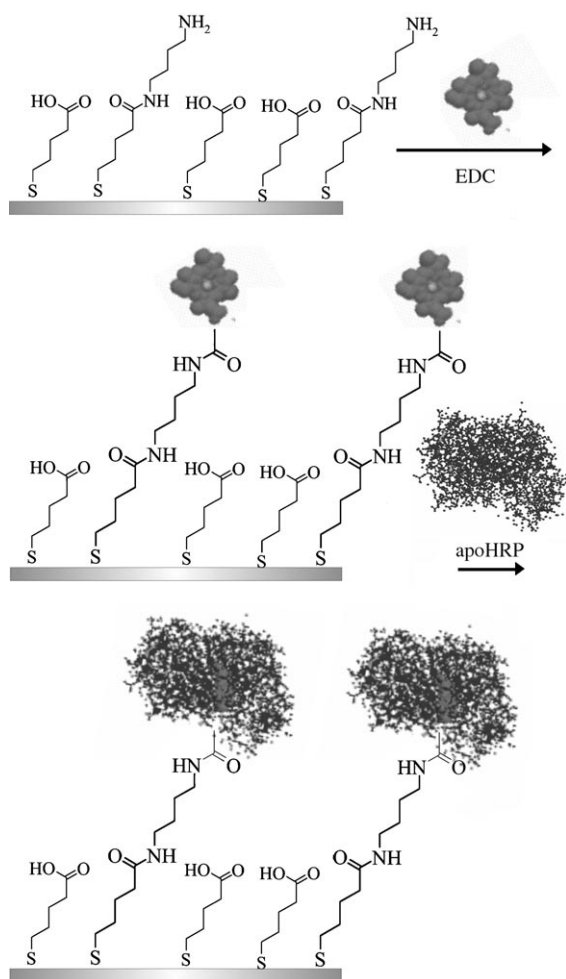


Abbildung 14. In-situ-Rekonstitution von apoHRP auf Goldelektroden, mit denen der Cofaktor Häm unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) unter Bildung einer Amidbindung verknüpft wurde.^[160]

Verwendung von Mb als Modell eine künstliche Proteinschnittstelle. Sie verwendeten Häm **25** (Abbildung 9), um negative Ladungen auf die Oberfläche von Myoglobin zu überführen, und tauschten anschließend das Eisen- gegen ein Zinkion aus. So erhielten sie das Häm **32** (Abbildungen 11 und 15).^[163] Aufgrund der zusätzlich angebrachten Carboxygruppen konnte das erhaltene **rMb32** die natürliche Erkennungsregion von Cytochrom *c* nachahmen. Daher wurden stabile Protein-Protein-Komplexe mit dem Cytochrom gebildet, was durch Bestimmung der ET- und Bindungskonstanten nachgewiesen wurde. Weitere Beispiele zu künstlichen Elektronentransfer-Modellsystemen unter Verwendung von modifizierten Porphyrinderivaten sind in einem exzellenten Übersichtsartikel von Hayashi und Ogoshi zusammengefasst.^[101]

3.3.4. Neuartige Biomaterialien

Das Interesse der Forschung wendet sich immer mehr der Entwicklung von Biomaterialien zu, die für die spezifische Verknüpfung und Wechselwirkung mit komplexen biologi-

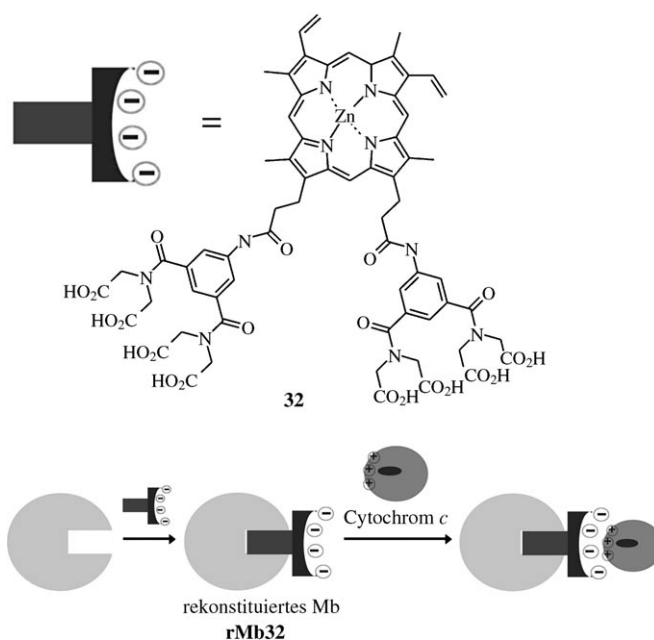


Abbildung 15. Rekonstitution von Mb mit einem Cytochrom-*c*-Rezeptor und Bildung des Protein-Protein-Komplexes mit Cytochrom *c*. Wiedergabe aus Lit. [163].

schen Systemen wie Zellen und Geweben genutzt werden können. Für solche Materialien werden Anwendungsmöglichkeiten als Wirkstoffe, Wirkstoffträger, biologische Modellsysteme oder als Gerüste für Gewebekulturen vorhergesagt.^[164,165] Äußerst vielversprechend, wenngleich anspruchsvoll ist die Verwendung von Proteinen wegen ihrer biologischen Kompatibilität und großen Zahl an spezifischen Funktionen. In den letzten Jahren wurde die Rekonstitution von Hämzymen genutzt, um solche neuartigen Hybridmaterialien herzustellen. Wir wollen hier einige repräsentative Beispiele und Konzepte aus diesem Themengebiet präsentieren.

3.3.4.1. Lipidverankerte Myoglobine

Durch Rekonstitution eines apoMb mit dem langkettigen, monoalkylierten Häm **33** (Abbildung 11) sollte ein synthetisches Enzym erhalten werden, das spezifisch an Phospholipiddoppelschichten gebunden werden kann.^[166] Absorptions-, EPR- und CD-Spektrum dieses modifizierten Mb zeigten, dass der künstliche Cofaktor korrekt im aktiven Zentrum des apoMb lokalisiert war. Nachfolgende Gelfiltrations- und Ultrafiltrationsanalysen bestätigten, dass das rekonstituierte Mb an Lipiddoppelschichten bindet, die in einer wässrigen Dispersion von Dipalmitoylphosphatidylcholin vorliegen, während das native Mb keinerlei Affinität zu diesen Membranen aufweist. Zusammen mit der Beobachtung, dass das lipidverankerte Mb in einer festgelegten Orientierung an die Lipiddoppelschicht gebunden ist, sind diese Befunde ein gutes Beispiel dafür, dass die Einführung eines langkettigen Anker-moleküls an der Hämgruppe von Mb die Bildung komplexer Überstrukturen ermöglicht. Damit rückt die Herstel-

lung von wohldefinierten Bionanomaterialien in greifbare Nähe.^[166]

3.3.4.2. Biohybride Tenside

Die zuvor beschriebene Strategie wurde kürzlich durch Boerakker et al. übernommen, um große enzymfunktionalisierte Riesenamphiphile zu konstruieren.^[167,168] Hierzu verwendeten sie Polystyrol(PS)-modifiziertes Häm, das in apoHRP und apoMb eingesetzt wurde. So wurden halbsynthetische Enzyme mit einer langen hydrophoben Kette und definierter Orientierung der Einzelkomponenten erhalten. In wässrigen Lösungen ordnen sich diese PS-Enzym-Konjugate zu biohybriden Überstrukturen an, die als Riesenamphiphile bezeichnet werden. In diesen Riesenamphiphilen nehmen HRP oder Mb die Stellung der polaren Kopfgruppe und das synthetische Polymer jene des unpolaren Restes ein, sodass in wässrigen Lösungen sphärische Aggregate gebildet werden (Abbildung 16a). Für die Synthese der amphiphilen Mono-

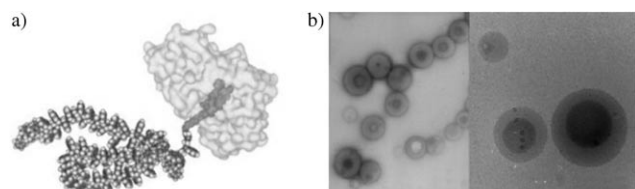


Abbildung 16. a) Durch Rekonstitution von apoHRP hergestellte Riesenamphiphile (HRP ist in Grau dargestellt); b) die entstehenden vesikulären Aggregate. Wiedergabe aus Lit. [168].

mere wurden mit endständigen Carboxygruppen modifizierte Polystyrolketten an einen der beiden Propionatreste gekuppelt. Der Abstand zwischen der Carboxygruppe des Cofaktors im aktiven Zentrum und der Oberfläche des Enzyms wurde mit einem Brückenmolekül überwunden. Elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Riesenamphiphile zufolge wurden hohle, vesikuläre Aggregate mit einem Durchmesser von 80 bis 400 nm gebildet (Abbildung 16b). Außerdem konnten für die erhaltenen HRP- und Mb-Enzyme Aktivitäten nachgewiesen werden, die nur leicht unterhalb jener der nativen Enzyme lagen. Diese Arbeit lässt darauf schließen, dass der Einbau von verschiedenen Enzymen und organischen Katalysatoren in katalytisch aktive supramolekulare Strukturen dazu genutzt werden kann, neuartige biomimetische Ansätze für die Entwicklung von „künstlichen Zellen“ und anderen funktionellen Bausteinen zu erproben.

3.3.4.3. Supramolekulare Polymere

Supramolekulare Polymere sind Materialien, die durch nichtkovalente Wechselwirkungen monomerer Bausteine im thermodynamischen Gleichgewicht entstehen. Sie haben das Interesse vieler Forschungsgruppen geweckt, da sie zu einer neuen Klasse von funktionellen und responsiven Materialien gehören.^[169–173] Eine Arbeit von Kitagishi et al.^[174] beschreibt submikrometergroße Überstrukturen aus Hämprotein-basierten supramolekularen Polymeren (Abbildung 17). Hierfür

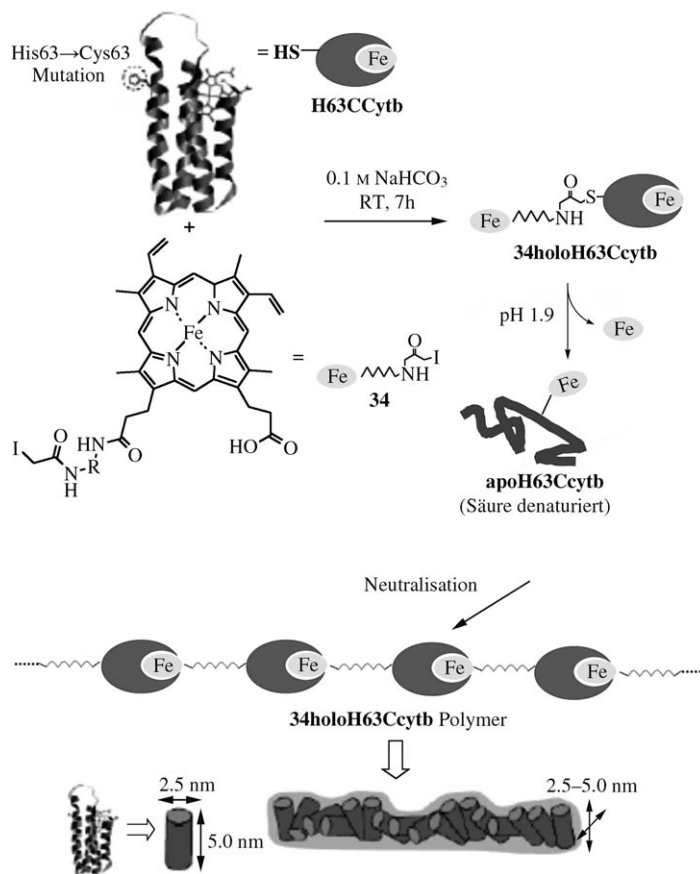


Abbildung 17. Supramolekulare Polymere durch Häm-Rekonstitution der Mutante Cytochrom b_{562} . Wiedergabe aus Lit. [174] mit Genehmigung. Copyright 2007 American Chemical Society.

wurde durch Mutation des Cytochrom b_{562} auf der Oberfläche ein Cystein eingeführt (**H63CCytb**). Dieses wurde anschließend mit dem chemisch aktivierten Häm **34** zu einem Protein mit einem an der Oberfläche gebundenem Häm (**34holoH63CCytb**) gekuppelt. In einer nachfolgenden Reaktion wurde der native Hämcofaktor nach der Methode von Teale entfernt. In einer Lösung des resultierenden **34apoH63CCytb** ließ man die Apocytochrome untereinander mit den Hämgruppen auf den Oberflächen rekonstituieren. Eine rasterkraftmikroskopische (AFM-)Aufnahme der erhaltenen Aggregate zeigte, dass sich große, lineare Strukturen aus mehr als 100 Proteinmonomeren gebildet hatten. Ein solcher Ansatz könnte daher genutzt werden, um wohlgeordnete Hämproteinketten mit vielfältigen biologischen Funktionen zu erzeugen.

3.3.5. DNA-modifizierte Enzyme

Wegen ihrer ausgeprägten Fähigkeit zur molekularen Erkennung werden DNA-Oligonucleotide heutzutage als leistungsfähiges Werkzeug für die Strukturlenkung beim Bottom-up-Aufbau von nanostrukturierten, funktionellen Einheiten aus Proteinbausteinen eingesetzt.^[175,176] Eine Kombination der einzigartigen Eigenschaften der DNA mit der nahezu unerschöpflichen Vielfalt der Proteinfunktionen

wird durch die Herstellung von halbsynthetischen DNA-Proteinkonjugaten möglich. Allerdings ist die Kontrolle der Stöchiometrie und Regioselektivität bei DNA-Proteinkupplungen anspruchsvoll und erfordert die Entwicklung geeigneter Synthesestrategien. Eine solche Kontrolle der Kupplungsbedingungen konnte bei verschiedenen Ansätzen verwirklicht werden.^[177–184]

Eine vielseitige Methode zur Herstellung von stöchiometrisch und konstitutionell wohldefinierten Protein-DNA-Konjugaten, die für den Aufbau von Proteinnanostrukturen eingesetzt werden können, beruht auf der Cofaktor-Rekonstitution. Zur Demonstration dieses Konzepts synthetisierten Fruk et al. Häm-DNA-Konjugate (**35a,b**; Abbildung 18a) und nutzten diese anschließend für die Rekonstitution von apoMb.^[185] Die hierdurch entstandenen halbsynthetischen DNA-Enzym-Konjugate hatten noch die volle Funktion und konnten wegen der angehängten DNA-Oligomere spezifische Hybridisierungen mit komplementären Nucleinsäuren eingehen, die auf verschiedenen Oberflächen immobilisiert waren (Abbildung 18b).^[186,187] Die DNA-Mb-Konjugate **rMb35a** und **rMb35b** mit Hämgruppen, die ein bzw. zwei einzelsträngige Oligonucleotide trugen, zeigten übera-

schenderweise eine wesentlich höhere Peroxidaseaktivität als das native Enzym.^[185] Dieses Phänomen wurde den elektrostatischen und sterischen Effekten der voluminösen und geladenen DNA-Gruppen zugeschrieben, die eine Öffnung des aktiven Zentrums des Proteins induzieren sollten.^[186] Dasselbe Prinzip wurde später von Sakamoto und Kudo genutzt, um 24-mere Peptide an Häm zu koppeln und das erhaltene Konjugat für die Rekonstitution mit apoMb zu verwenden.^[188] Sie beobachteten keinerlei Änderung der Hämumgebung, und die dreidimensionale Struktur der resultierenden rMb-Konjugate war identisch mit jener des nativen Enzyms. Allerdings wurde auch hier eine Erhöhung der Peroxidaseaktivität beobachtet, ähnlich wie bei den DNA-modifizierten Proteinen **rMb35**.^[186]

Weiterhin wurde die Rekonstitution von Apoenzymen mit Häm-DNA-Konjugaten für die Produktion von Arrays aus DNA-HRP-Konjugaten auf Mikroelektrodenoberflächen verwendet. Hierzu wurde die Methode der DNA-vermittelten Immobilisierung (DDI; siehe Abbildung 18b) genutzt.^[187] Die Verwendung von Wasserstoffperoxid und dem Redoxmediator *ortho*-Phenylendiamin ermöglichte die Messung einer amperometrischen Antwort der über die DNA immobilisierten HRP. Solche Anordnungen von Redoxenzymen könnten für die Analyse von Wirkstoffen oder für die Detektion von Umweltschad- und Kampfstoffen nützlich sein. Die DNA-vermittelte Immobilisierung von **35a** wurde kürzlich genutzt, um mithilfe eines Oberflächenplasmonenresonanz-Biosensors quantitative kinetische Untersuchungen der Hämaufnahme und Dissoziation von Apoenzymen vorzunehmen.^[189]

3.3.6. Insertion neuartiger Cofaktoren

Die Beispiele in den Abschnitten 3.3.1–3.3.5 behandelten den Austausch von natürlichem Häm gegen eine Reihe von modifizierten Porphyrinderivaten, die Enzyme mit neuen Funktionen ergeben. Darüber hinaus kann der Hämcofaktor aber auch gegen künstliche, heterocyclische Verbindungen ähnlicher Größe ausgetauscht werden. Ein beeindruckendes Beispiel hierfür ist das Eisenporphycen **36** (Abbildung 19) als künstliche prosthetische Gruppe, die das rekonstituierte Mb-Derivat **rMb36** ergibt.^[190] Der Austausch des Häms gegen die Porphycengruppe führt zu einer Farbänderung: **rMb36** ist blau, während das native Mb von braunrötlicher Farbe ist. Darüber hinaus ändern sich die Sauerstoffbindungseigenschaften von **rMb36**: Seine O₂-Assoziationsgeschwindigkeit ist 5-mal höher und seine Dissoziationsgeschwindigkeit 250-mal niedriger als die von nativem Mb. **rMb36** hat damit eine 1400-mal größere O₂-Affinität, vergleichbar mit jener des nativen O₂-Speicherproteins Hämoglobin.

Ohashi et al. entwarfen neuartige Metalloenzyme, indem sie das Häm gegen einen Cofaktor mit gänzlich unterschiedlicher Struktur austauschten.^[191] Bekanntlich katalysieren chromhaltige Schiff-Basenkomplexe verschiedene Oxidationen in organischen Lösungsmitteln. Für die Entwicklung neuartiger Katalysatoren wurde untersucht, ob solche chromhaltigen Salophenliganden für den Austausch gegen den nativen Cofaktor geeignet sind. Unter Berücksichtigung einiger konformativer Aspekte, wie potenziellen Kontakt-

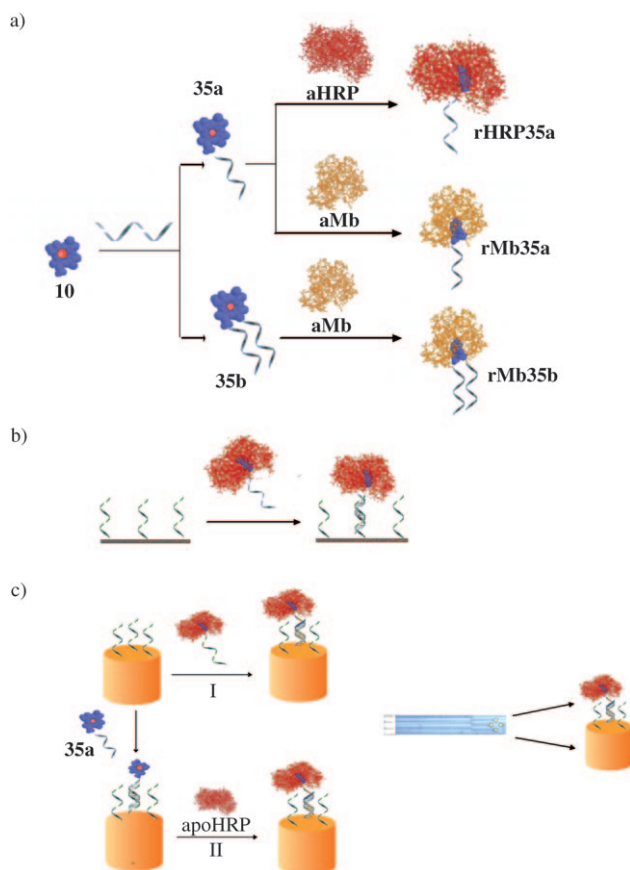


Abbildung 18. a) Rekonstitution von apoMb und apoHRP mit DNA-modifiziertem Häm und b) anschließende Verwendung der DNA zur Oberflächenimmobilisierung der Enzyme. Wiedergabe aus Lit. [186]. c) Herstellung eines Arrays von DNA-HRP-Konjugaten auf Mikroelektroden unter Verwendung von **rHRP35a** (I) oder In-situ-Rekonstitution von apoHRP (II). Der Mikroelektrodenchip, der vier Goldelektroden enthält, ist ebenfalls abgebildet. Wiedergabe aus Lit. [187].

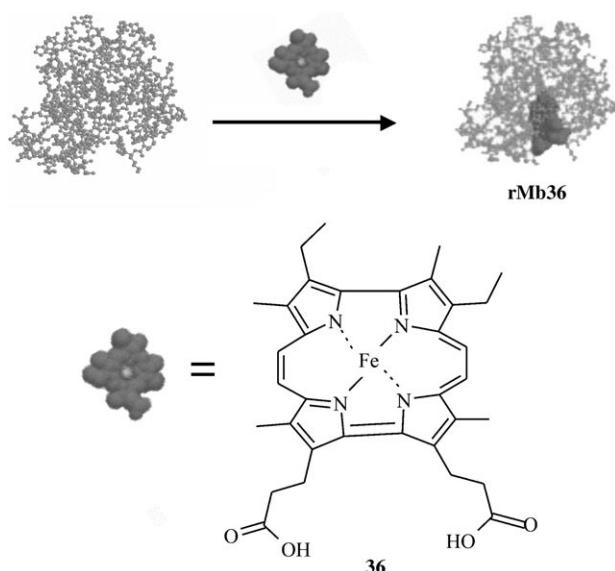


Abbildung 19. Herstellung von **rMb36** durch Rekonstitution von apoMb mit dem Eisenporphyrin **36** als abiotischem Cofaktor. **rMb36** ist von blauer Farbe und hat eine stark erhöhte Sauerstoffaffinität.^[190]

punkten zwischen Schiff-Base und Protein, wurde eine Myoglobinmutante erzeugt und durch Rekonstitution mit Chrom(III)-Salophen **37** funktionalisiert (Abbildung 20).

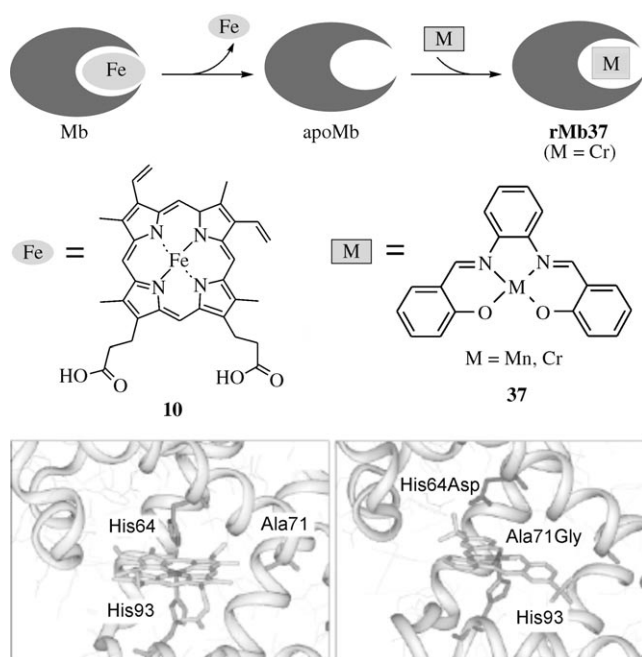


Abbildung 20. Oben: Herstellung künstlicher Metalloenzyme durch Rekonstitution von apoMb mit Mn- oder Cr-haltigen Salophenen. Unten: aktive Zentren von nativem (links) und künstlichem Mb (rechts) in molekularen Modellen. Wiedergabe aus Lit. [191].

Tatsächlich war das resultierende, halbsynthetische Enzym **rMb37** in der Lage, die H_2O_2 -abhängige Sulfoxidation von Thioanisol zu katalysieren.^[191] Zwar wies dieses Enzym nur

geringe Reaktivität und Enantioselektivität auf, diese Arbeit ist jedoch ein klarer Beleg, dass künstliche Metalloenzyme durch die Kombination von Protein-Engineering und Koordinationschemie erhalten werden können. Auf diesen Arbeiten aufbauend konnten durch Röntgenstrukturanalysen der mit Chrom- und Mangan-Schiff-Basen modifizierten Mb-Proteine detaillierte Einblicke in die Wechselwirkungen zwischen künstlichem Cofaktor und Proteingerüst erhalten werden.^[192] Außerdem gelang es, die Enantioselektivität der Sulfoxidation von Thioanisol durch Änderung der Substituentengröße an den Positionen 3 und 3' des Salophens zu steigern (**37** in Abbildung 20).

In analoger Weise wurden nichtnatürliche prosthetische Gruppen, z. B. Mn^{III} -, Fe^{III} - und Cr^{III} -Schiff-Basenkomplexe, in sorgfältig entworfene apoMb-Mutanten eingebaut, in denen Aminosäuren ausgetauscht worden waren (z. B. Ala71 in Gly). Hierdurch wurde eine festere Bindung im aktiven Zentrum erreicht.^[193] So funktionalisierten Lu et al. eine apoMb-Mutante (Leu72Cys-Tyr103Cys) mit Mangan-Salen-Komplexen (Salen: *N,N'*-Bis(salicyliden)ethyldiamin), indem sie dafür vorgesehene Cysteinreste mit der Methanthiosulfonatgruppe des Mangankomplexes kuppelten.^[194] Diese Vorgehensweise ermöglichte es, den künstlichen Cofaktor mit präziser Orientierung im Proteingerüst kovalent im aktiven Zentrum zu verankern. Die erhaltenen halbsynthetischen Enzyme zeigten erhöhte Geschwindigkeitskonstanten für die enantioselektive Sulfoxidation (von 0.078 zu 390 min^{-1}) und eine bessere Enantioselektivität (Anstieg von 13 auf 51 % ee) im Vergleich zu den Metalloenzymen von Ohashi et al., die nach einer nichtkovalenten Strategie hergestellt wurden.^[191] Die Arbeiten von Lu sind ein weiterer Beleg dafür, dass sich durch die rationale Einführung synthetischer Metallkomplexe in speziell entworfene aktive Taschen ausgewählter Enzyme neuartige Biokatalysatoren maschinieren lassen.^[195]

4. Andere Cofaktoren – Rekonstitution mit Pyrrolochinolinchinon

Pyrrolochinolinchinon (PQQ, **38**; Abbildung 21) wurde erstmals 1979 als Cofaktor der bakteriellen Alkohol-Dehydrogenasen beschrieben.^[196] Erst kürzlich wurde dieser Cofaktor, zusammen mit Riboflavin, als ein Mitglied der Familie der B-Vitamine erkannt. Er spielt eine wichtige Rolle bei metabolischen Umsetzungen, insbesondere als Cofaktor verschiedener Enzyme. So ist er in der 2-Aminoadipin-6-semialdehyd-Dehydrogenase (AASDH) in den Abbau von Lysin eingebunden.^[197] In der Zwischenzeit wurde eine Vielzahl an anderen Chinoncofaktoren beschrieben.^[198] PQQ-haltige Enzyme, Chinoproteine, Kupferchinoproteine oder Chinohämproteine sind häufig an der direkten Oxidation von Alkoholen, Zuckern und Aminen beteiligt.^[199]

PQQ fungiert als Cofaktor und als Redoxshuttle. Daher wurden PQQ-Enzyme für die Entwicklung von elektrischen Biosensoren verwendet. Mehrfach konnte ein direkter Elektronentransfer zwischen Elektrode und Enzym beobachtet werden.^[200] Zu diesem Zweck wurden PQQ-Enzyme direkt auf Kohlenstoffelektroden^[201] oder leitenden Polymeren^[202]

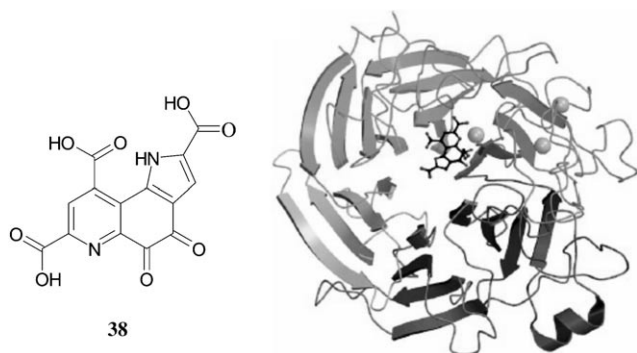


Abbildung 21. Struktur des Cofaktors PQQ (links) und des PQQ-Enzyms Glucose-Dehydrogenase (rechts). PQQ ist in der Enzymstruktur durch eine schwarze Grundstruktur dargestellt, während die Ca^{2+} -Ionen, die für die PQQ-Koordination notwendig sind, als graue Kugeln wiedergegeben sind.

immobilisiert und für die Entwicklung von Glucose-^[203] und Ethanolensoren^[204] eingesetzt. Der natürliche Elektronenakzeptor für PQQ-Dehydrogenasen ist dabei üblicherweise nicht molekularer Sauerstoff, sondern in der Zelle vorhandenes Ubichinon und Cytochrom.^[205] An der Bindung von PQQ in Apoenzymen sind keinerlei kovalente Bindungen beteiligt, allerdings ist der Cofaktor über Ca^{2+} -^[206] oder Mg^{2+} -Ionen^[207] koordiniert. Dadurch ist es sehr einfach möglich, PQQ aus den Enzymen zu entfernen. Die resultierenden Apoenzyme können anschließend mit künstlichen Cofaktoren rekonstituiert werden, um die Struktur- und Katalyseigenschaften der PQQ-Proteine zu untersuchen.

Aufgrund seiner Fähigkeit zum Elektronentransport wurde PQQ für die Herstellung von Enzymelektroden verwendet, ähnlich wie dies in Abschnitt 2.3 für FAD beschrieben wurde. In einem der ersten Beispiele für die Verwendung von PQQ zur Herstellung elektrochemischer Sensoren immobilisierten Katz et al. PQQ durch Amidkupplung an adäquaten Brückenmolekülen auf einer Goldelektrode.^[208] Die so hergestellten Elektrodenoberflächen wurden anschließend für die In-situ-Rekonstitutionen von Apo-Glucose-Dehydrogenase (apoGDH) eingesetzt, die durch Denaturierung des nativen Enzyms und Entfernen des Cofaktors durch Gelfiltration erhalten worden war. In ersten Messungen der elektrochemischen Signale in Gegenwart des Substrates Glucose konnte keine direkte Kommunikation zwischen dem rekonstituierten GDH und den Goldelektroden nachgewiesen werden, allerdings wurde nach Zugabe von 2,4-Dichlorphenolindophenol (DCPIP) als elektrochemischem Mediator ein elektrochemisches Signal gemessen. Diese Befunde deuteten an, dass das Enzym zwar aktiv war, aber wegen der isolierenden Proteinhülle keine direkte Kommunikation zustande kam. Um dieses Problem zu umgehen, wurden später effizientere Brückensysteme verwendet. So wurden beispielsweise elektronisch kontaktierte GDH-Enzymelektroden hergestellt, indem apoGDH mit auf Polyanilinschichten immobilisiertem PQQ rekonstituiert wurde.^[209] Dabei wurde PQQ über eine Amidbindung an Polyanilin/Polyacrylsäureschichten gebunden, die auf Goldelektroden abgeschieden worden waren. Solche Elektrodenoberflächen wurden nachfolgend für die In-situ-Rekonstitution von apoGDH einge-

setzt. Mit den resultierenden Sensoren war es möglich, die bioelektrokatalysierte Oxidation von Glucose zu messen. Zusätzliche Verbesserungen dieses Systems wurden durch den Einsatz von Goldnanopartikelrelais erzielt (Abbildung 22), die bereits zur elektrischen Kontaktierung von

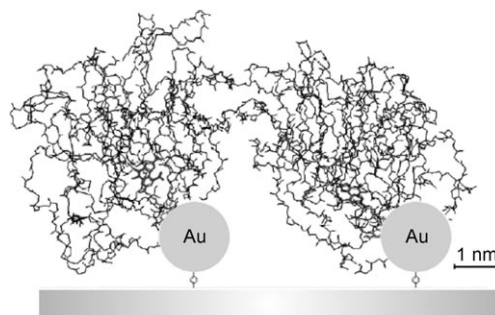


Abbildung 22. Immobilisierung von apoGDH an PQQ-modifizierten Goldnanopartikeln, die auf einer Goldelektrode gebunden sind. Wiedergabe aus Lit. [206] mit Genehmigung. Copyright 2005 American Chemical Society.

FAD-Enzymen genutzt worden waren (siehe Abbildung 7). Die Verwendung von PQQ-modifizierten Goldnanopartikeln zur Funktionalisierung von Goldelektroden anstelle der analogen Elektroden mit Polyanilinschichten verbesserte die elektrische Kontaktierung zwischen Elektrode und GDH um den Faktor 25.^[206]

Die Rekonstitution von PQQ-Enzymen wurde auch zur Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen und der molekularen Mechanismen der katalytischen Aktivität genutzt. Dabei wurde aus der PQQ-Familie das lösliche GDH aus *Acinetobacter calcoaceticus*^[210] am intensivsten untersucht. Ein zweites Enzym aus der GDH-Gruppe, das membrangebundene GDH (mGDH),^[211] wurde ebenfalls studiert. Lange Zeit wurde angenommen, dass mGDH denselben Wirkmechanismus wie die lösliche Form aufweist. Interessanterweise zeigten dann aber rekonstitutionsbasierte Aktivitätsstudien des in *E. coli* exprimierten apomGDH, dass es signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Enzymen gibt.^[212] So wurde herausgefunden, dass mGDH den Cofaktor PQQ weniger stark als das lösliche GDH bindet und dass es Mg^{2+} -Ionen für eine komplette Rekonstitution benötigt, während das lösliche GDH Ca^{2+} -Ionen braucht. Darüber hinaus reagiert das reduzierte mGDH, im Unterschied zu löslichem GDH, mit O_2 . Dieses unerwartete Phänomen ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten.

Iswantini et al. berichteten über die In-vivo-Bildung von holomGDH bei Zugabe von PQQ und Glucose zu *E. coli*-Zellen, die auf der Oberfläche einer Kohlenstoffpastenelektrode immobilisiert sind.^[213] Elektrochemische Messungen ermöglichten die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante der PQQ-Rekonstitution in den Zellen sowie die Untersuchung der Aktivität der rekonstituierten Enzyme.

Ungeachtet dieser Fortschritte befinden sich die Untersuchungen zur PQQ-Rekonstitution noch immer im Anfangsstadium, besonders im Vergleich zu den Arbeiten über

die FAD- und Häm-Rekonstitution. Bisher wurde die PQQ-Rekonstitution fast ausschließlich zur Entwicklung elektrochemischer Biosensoren eingesetzt; es ist jedoch vorhersehbar, dass zukünftige Arbeiten auch auf die Verwendung von modifiziertem PQQ eingehen werden, um neuartige Proteinfunktionen für andere Anwendungen, beispielsweise im Bereich der Biomaterialien, zu verwirklichen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Rekonstitution von Flavo-, Häm- und PQQ-Enzymen mit nativen und künstlichen Cofaktoren hat sich als effiziente Methode zur Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen der Enzyme erwiesen. Zudem wurde die Rekonstitution von Apoenzymen verwendet, um neue Funktionen von bekannten Proteinen zu erzielen. Hierdurch wurden bereits neue hybride Funktionseinheiten und Materialien zugänglich. Ein besonderer Vorteil dieser Methode liegt in der nahezu unerschöpflichen Variationsbreite für die Einführung maßgeschneiderter funktioneller Gruppen in natürliche Cofaktoren mithilfe moderner Synthesemethoden. Die Bandbreite dieser Methode wird zudem durch Weiterentwicklungen im Bereich der Proteinmodifikation stetig vergrößert; hierzu zählen beispielsweise Fortschritte bei der ortsgerichteten Mutagenese oder der In-vitro-Evolution. Bedenkt man, dass auch die Techniken zur Hochdurchsatzanalyse immer weiter verbessert werden, kann man davon ausgehen, dass die Cofaktor-Rekonstitution neue Wege für die Entwicklung effizienter Biokatalysatoren bahnen wird. Dass sich derartige Ziele tatsächlich verwirklichen lassen, konnte bereits demonstriert werden.^[190,191] Darüber hinaus lässt sich vermuten, dass die Bandbreite möglicher Anwendungen der Cofaktor-Rekonstitution weit über die Biosensorik hinausgehen wird, besonders angesichts der aktuellen Fortschritte in der Nanobiotechnologie und der damit verbundenen Arbeiten zur Herstellung von maßgeschneiderten Nanopartikeln als transduzierenden^[57] oder cokatalytischen^[214–216] Elementen in Nanopartikel-Biomolekül-Hybriden. Man kann spekulieren, ob durch diesen Ansatz biokompatible, auf Umwelteinflüsse reagierende oder andere funktionelle Materialien zugänglich werden. Wir können sicher sein, dass diese Forschung an der Schnittstelle von chemischer Biologie und Nanowissenschaften auch in den kommenden Jahren spannende und herausfordernde Themen für kreative Chemiker bereithalten wird.

Unsere Arbeiten wurden finanziell unterstützt vom Zentrum für Angewandte Chemische Genomik (ZACG), einer gemeinschaftlichen Forschungsinitiative der Europäischen Union und des Ministeriums für Innovation und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen. C.M.N. dankt der Max-Planck-Gesellschaft für finanzielle Unterstützung einer Max Planck Fellow Forschungsgruppe am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie (Dortmund). Die Arbeit von L.F. wurde durch ein Marie Curie International Incoming Fellowship unterstützt (Projekt 514582). C.-H.K. dankt der International Max-Planck Research School in Chemical Biology (Dortmund) und dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für ein Stipendium. Wir danken Kersten Rabe für seine Hilfe

bei Grafiken und die vielen anregenden Diskussionen sowie Maximilian Glettenberg für die deutsche Übersetzung.

Eingegangen am 27. Juni 2008

Online veröffentlicht am 22. Januar 2009

- [1] Im Unterschied zu den hier diskutierten Cofaktoren und prosthetischen Gruppen ist NAD(P) wegen der niedrigen Affinität und transienten Natur der Wechselwirkung nur lose an Enzyme gebunden (D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, Wiley, Somerset, **1995**). Daher wirkt es als diffusionsfähiger Cofaktor. Zwar wurden bereits chemische Modifikationen von NAD, beispielsweise mit Ferrocen (T. Kijima, T. Suzuki, T. Izumi, *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, 96, 585) oder Polyethylenglycol (T. Okuda, I. Urabe, H. Okada, *Eur. J. Biochem.* **1985**, 151, 33) beschrieben, solche Cosubstrate werden jedoch lediglich der Reaktionslösung zugemischt, die bereits funktionelles Enzym und nicht Apoenzym enthält. Wegen der Diffusionsfähigkeit solcher Cosubstrate unterscheidet sich dieses Vorgehen daher deutlich von der Situation, in der fest gebundene prosthetische Gruppen, wie Häm, FAD oder PQQ, dauerhaft mit dem Enzym assoziiert sind.
- [2] L. Curatti, J. A. Hernandez, R. Y. Igarashi, B. Soboh, D. Zhao, L. M. Rubio, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 17626.
- [3] V. K. Shah, J. R. Allen, N. J. Spangler, P. W. Ludden, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 1154.
- [4] Y. Hu, A. W. Fay, M. W. Ribbe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 3236.
- [5] C. Fu, R. J. Maier, *Arch. Microbiol.* **1992**, 157, 493.
- [6] F. S. Mathews, Z. W. Chen, H. D. Bellamy, W. S. McIntire, *Biochemistry* **1991**, 30, 238.
- [7] O. Dym, D. Eisenberg, *Protein Sci.* **2001**, 10, 1712.
- [8] M. Mewies, W. S. McIntire, N. S. Scrutton, *Protein Sci.* **1998**, 7, 7.
- [9] J. Kim, J. H. Fuller, V. Kuusk, L. Cunane, Z. W. Chen, F. S. Mathews, W. S. McIntire, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 31202.
- [10] H. Theorell, *Biochem. Z.* **1935**, 278, 263.
- [11] B. E. Swoboda, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct.* **1969**, 175, 365.
- [12] M. Husain, V. Massey, *Methods Enzymol.* **1978**, 53, 429.
- [13] M. J. Gorbunoff, S. N. Timasheff, *Anal. Biochem.* **1984**, 136, 440.
- [14] M. H. Hefti, F. J. Milder, S. Boeren, J. Vervoort, W. J. van Berkel, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2003**, 1619, 139.
- [15] D. Pompon, F. Lederer, *Eur. J. Biochem.* **1978**, 90, 563.
- [16] S. T. Thompson, E. Stellwagen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, 73, 361.
- [17] M. H. Hefti, J. Vervoort, W. J. van Berkel, *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270, 4227.
- [18] S. Ghisla, V. Massey, *Biochem. J.* **1986**, 239, 1.
- [19] D. E. Edmondson, P. Newton-Vinson, *Antioxid. Redox Signaling* **2001**, 3, 789.
- [20] N. Tahallah, R. H. Van Den Heuvel, W. A. Van Den Berg, C. S. Maier, W. J. Van Berkel, A. J. Heck, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 36425.
- [21] M. Vyazmensky, C. Sella, Z. Barak, D. M. Chipman, *Biochemistry* **1996**, 35, 10339.
- [22] B. Sherry, R. H. Abeles, *Biochemistry* **1985**, 24, 2594.
- [23] K. Yorita, T. Matsuoka, H. Misaki, V. Massey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 13039.
- [24] W. J. van Berkel, M. H. Eppink, H. A. Schreuder, *Protein Sci.* **1994**, 3, 2245.
- [25] M. Salomon, W. Eisenreich, H. Durr, E. Schleicher, E. Knieb, V. Massey, W. Rudiger, F. Muller, A. Bacher, G. Richter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 12357.
- [26] Z. Huang, Q. Zhang, H. W. Liu, *Bioorg. Chem.* **2003**, 31, 494.

- [27] J. Wu, A. F. Bell, L. Luo, A. W. Stephens, M. T. Stankovich, P. J. Tonge, *Biochemistry* **2003**, *42*, 11846.
- [28] A. M. Grundén, F. E. Jenney, Jr., K. Ma, M. Ji, M. V. Weinberg, M. W. Adams, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 1522.
- [29] W. McIntire, D. E. Edmondson, D. J. Hopper, T. P. Singer, *Biochemistry* **1981**, *20*, 3068.
- [30] M. Stoltz, J. Rassow, A. F. Buckmann, R. Brandsch, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 25208.
- [31] M. Stoltz, H. P. Henninger, R. Brandsch, *FEBS Lett.* **1996**, *386*, 194.
- [32] A. Otto, M. Stoltz, H. P. Sailer, R. Brandsch, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9823.
- [33] D. L. Gatti, B. A. Palfey, M. S. Lah, B. Entsch, V. Massey, D. P. Ballou, M. L. Ludwig, *Science* **1994**, *266*, 110.
- [34] A. Hassan-Abdallah, R. C. Bruckner, G. Zhao, M. S. Jorns, *Biochemistry* **2005**, *44*, 6452.
- [35] M. W. Fraaije, R. H. van Den Heuvel, W. J. van Berkel, A. Mattevi, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 38654.
- [36] I. Efimov, C. N. Cronin, W. S. McIntire, *Biochemistry* **2001**, *40*, 2155.
- [37] I. Efimov, C. N. Cronin, D. J. Bergmann, V. Kuusk, W. S. McIntire, *Biochemistry* **2004**, *43*, 6138.
- [38] I. Willner, *Science* **2002**, *298*, 2407.
- [39] I. Willner, E. Katz, *Bioelectronics*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [40] I. Willner, B. Willner, *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, 222.
- [41] E. Adachi, K. Nagayama, *Adv. Biophys.* **1997**, *34*, 81.
- [42] A. Konash, E. Magner, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1647.
- [43] A. Riklin, E. Katz, I. Willner, A. Stocker, A. F. Buckmann, *Nature* **1995**, *376*, 672.
- [44] I. Willner, B. Willner, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *245*, 139.
- [45] E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6166; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042.
- [46] I. Willner, B. Willner, E. Katz, *Bioelectrochemistry* **2007**, *70*, 2.
- [47] B. Willner, E. Katz, I. Willner, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *17*, 589.
- [48] E. Katz, A. Riklin, V. Heleg-Shabtai, I. Willner, A. Büchmann, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *385*, 45.
- [49] M. Zayats, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14724.
- [50] E. Katz, L. Sheeney-Haj-Idia, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3354; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3292.
- [51] O. A. Raitman, E. Katz, A. F. Buckmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6487.
- [52] R. Blonder, I. Willner, A. F. Buckmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9335.
- [53] I. Willner, B. Willner, *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 535.
- [54] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128.
- [55] C. M. Niemeyer, C. A. Mirkin, *Nanobiotechnology: Concepts, Methods and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [56] C. A. Mirkin, C. M. Niemeyer, *Nanobiotechnology II: More Concepts and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [57] Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J. F. Hainfeld, I. Willner, *Science* **2003**, *299*, 1877.
- [58] O. Lioubashevski, V. I. Chegel, F. Patolsky, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7133.
- [59] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2165; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2113.
- [60] E. Katz, I. Willner, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 1184.
- [61] J. C. Vidal, J. Espuelas, J. R. Castillo, *Anal. Biochem.* **2004**, *333*, 88.
- [62] B. W. Maya Zayats, I. Willner, *Electroanalysis* **2008**, *20*, 583.
- [63] B. Meunier, S. P. de Visser, S. Shaik, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947.
- [64] H. B. Dunford, *Heme Peroxidases*, Wiley, New York, **1999**.
- [65] E. Breslow, *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 486.
- [66] R. Bonnicksen, G. Hevesy, A. Akeson, *Nature* **1955**, *175*, 723.
- [67] S. C. Harrison, E. R. Blout, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 299.
- [68] H. Theorell, A. Akeson, *Ann. Acad. Sci. Fenn. Ser. A* **1955**, *11*, 303.
- [69] C. D. Moore, J. T. Lecomte, *Biochemistry* **1990**, *29*, 1984.
- [70] F. W. Teale, *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, *35*, 543.
- [71] O. L. Guryev, A. A. Gilep, S. A. Usanov, R. W. Estabrook, *Biochemistry* **2001**, *40*, 5018.
- [72] Y. Q. Feng, S. G. Sligar, *Biochemistry* **1991**, *30*, 10150.
- [73] T. Yonetani, *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 5008.
- [74] S. Modi, W. U. Primrose, L. Y. Lian, G. C. Roberts, *Biochem. J.* **1995**, *310(Pt3)*, 939.
- [75] G. C. Wagner, I. C. Gunsalus, M. Y. Wang, B. M. Hoffman, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 6266.
- [76] V. Uvarov, V. E. Tretiakov, A. I. Archakov, *FEBS Lett.* **1990**, *260*, 309.
- [77] U. Muller-Eberhard, H. H. Liem, C. A. Yu, I. C. Gunsalus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1969**, *35*, 229.
- [78] M. Ingelman-Sundberg, K. G. Paul, *Acta. Chem. Scand. B* **1986**, *40*, 233.
- [79] T. E. Carver, J. S. Olson, S. J. Smerdon, S. Krzywda, A. J. Wilkinson, Q. H. Gibson, R. S. Blackmore, J. D. Ropp, S. G. Sligar, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4697.
- [80] M. S. Hargrove, E. W. Singleton, M. L. Quillin, L. A. Ortiz, G. N. Phillips, Jr., J. S. Olson, A. J. Mathews, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 4207.
- [81] M. Y. Rose, J. S. Olson, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 4298.
- [82] M. S. Hargrove, A. J. Wilkinson, J. S. Olson, *Biochemistry* **1996**, *35*, 11300.
- [83] M. A. Correia, U. A. Meyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 400.
- [84] C. Yu, I. C. Gunsalus, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 107.
- [85] H. Sadano, T. Omura, *J. Biochem.* **1985**, *98*, 1321.
- [86] I. A. Pikuleva, A. G. Lapko, V. L. Chashchin, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1438.
- [87] G. Vasudevan, M. J. McDonald, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 517.
- [88] Y. Leutzinger, S. Beychok, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 780.
- [89] G. N. La Mar, T. Jue, B. M. Hoffman, K. Nagai, *J. Mol. Biol.* **1984**, *178*, 929.
- [90] Y. Kawamura-Konishi, H. Suzuki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *156*, 348.
- [91] S. Yee, D. H. Peyton, *FEBS Lett.* **1991**, *290*, 119.
- [92] Y. Kawamura-Konishi, H. Kihara, H. Suzuki, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *170*, 589.
- [93] G. Tsaprailis, D. W. Chan, A. M. English, *Biochemistry* **1998**, *37*, 2004.
- [94] H. S. Pappa, A. E. Cass, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 227.
- [95] J. A. Thomas, D. R. Morris, L. P. Hager, *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 3135.
- [96] G. L. Kedderis, P. F. Hollenberg, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3663.
- [97] E. J. Allain, L. P. Hager, L. Deng, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4415.
- [98] X. Yi, M. Mroczko, K. M. Manoj, X. Wang, L. P. Hager, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12412.
- [99] Q. Zong, P. A. Osmulski, L. P. Hager, *Biochemistry* **1995**, *34*, 12420.
- [100] R. Roncone, E. Monzani, M. Murtas, G. Battaini, A. Pennati, A. M. Sanangelantoni, S. Zuccotti, M. Bolognesi, L. Casella, *Biochem. J.* **2004**, *377*, 717.
- [101] T. Hayashi, H. Ogoshi, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 355.
- [102] K. E. Hill, D. C. Wharton, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 489.
- [103] D. W. Seybert, K. Moffat, Q. H. Gibson, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 45.
- [104] S. Neya, M. Nakamura, K. Imai, H. Hori, N. Funasaki, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1996**, *1296*, 245.
- [105] S. Neya, N. Funasaki, Y. Shiro, T. Iizuka, K. Imai, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1994**, *1208*, 31.

- [106] S. Neya, N. Funasaki, M. Nakamura, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1992**, 1117, 243.
- [107] T. Sato, N. Tanaka, S. Neya, N. Funasaki, T. Iizuka, Y. Shiro, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1992**, 1121, 1.
- [108] J. K. Moffat, *J. Mol. Biol.* **1971**, 58, 79.
- [109] C. K. Chang, B. Ward, S. Ebina, *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, 231, 366.
- [110] D. W. Seybert, K. Moffat, Q. H. Gibson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, 63, 43.
- [111] S. Neya, M. Nakamura, K. Imai, H. Hori, N. Funasaki, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1996**, 1296, 245.
- [112] Y. Mie, K. Sonoda, S. Neya, N. Funasaki, I. Taniguchi, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, 46, 175.
- [113] Y. Yamamoto, E. Kawano, *J. Inorg. Biochem.* **1997**, 67, 119.
- [114] Y. Yamamoto, T. Nakashima, E. Kawano, R. Chujo, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1998**, 1388, 349.
- [115] S. Nagao, Y. Hirai, S. Kawano, K. Imai, A. Suzuki, Y. Yamamoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 354, 681.
- [116] E. J. Tomlinson, S. J. Ferguson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 5156.
- [117] M. O. Crespín, B. L. Boys, L. Konermann, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 271.
- [118] R. Z. Harris, S. L. Newmyer, P. R. Ortiz de Montellano, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 1637.
- [119] M. Tamura, T. Asakura, T. Yonetani, *Biochim. Biophys. Acta Enzymol.* **1972**, 268, 292.
- [120] Y. Sugita, M. Nagai, Y. Yoneyama, *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 383.
- [121] J. E. O'Hagan, P. George, *Biochem. J.* **1960**, 74, 424.
- [122] R. K. DiNello, D. H. Dolphin, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 6903.
- [123] M. S. Hargrove, D. Barrick, J. S. Olson, *Biochemistry* **1996**, 35, 11293.
- [124] C. L. Hunter, E. Lloyd, L. D. Eltis, S. P. Rafferty, H. Lee, M. Smith, A. G. Mauk, *Biochemistry* **1997**, 36, 1010.
- [125] T. Hayashi, Y. Hitomi, T. Ando, T. Mizutani, Y. Hisaeda, S. Kitagawa, H. Ogoshi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7747.
- [126] H. Sato, T. Hayashi, T. Ando, Y. Hisaeda, T. Ueno, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 436.
- [127] H. Sato, M. Watanabe, Y. Hisaeda, T. Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 56.
- [128] E. Monzani, G. Alzuet, L. Casella, C. Redaelli, C. Bassani, A. M. Sanangelantoni, M. Gullotti, L. de Gioia, L. Santagostini, F. Chillemi, *Biochemistry* **2000**, 39, 9571.
- [129] E. Torres, A. Baeza, R. Vazquez-Duhalt, *J. Mol. Catal. B* **2002**, 19–20, 437.
- [130] I. Hamachi, Y. Tajiri, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7437.
- [131] I. Hamachi, T. Nagase, Y. Tajiri, S. Shinkai, *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8, 862.
- [132] T. Hayashi, T. Matsuo, Y. Hitomi, K. Okawa, A. Suzuki, Y. Shiro, T. Iizuka, Y. Hisaeda, H. Ogoshi, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 91, 94.
- [133] T. Hayashi, Y. Hisaeda, *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 35.
- [134] D. W. Seybert, K. Moffat, *J. Mol. Biol.* **1977**, 113, 419.
- [135] D. W. Seybert, K. Moffat, *J. Mol. Biol.* **1976**, 106, 895.
- [136] K. Ishimori, I. Morishima, *Biochemistry* **1986**, 25, 4892.
- [137] K. Ishimori, I. Morishima, *Biochemistry* **1988**, 27, 4747.
- [138] G. N. La Mar, W. S. Smith, N. L. Davis, D. L. Budd, M. J. Levy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 158, 462.
- [139] M. M. Striborova, V. Martinek, E. Frei, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2000**, 65, 297.
- [140] R. Z. Harris, P. A. Liddell, K. M. Smith, P. R. Ortiz de Montellano, *Biochemistry* **1993**, 32, 3658.
- [141] B. M. Hoffman, D. H. Petering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, 67, 637.
- [142] G. C. Hsu, C. A. Spilburg, C. Bull, B. M. Hoffman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1972**, 69, 2122.
- [143] B. M. Hoffman, C. A. Spilburg, D. H. Petering, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1972**, 36, 343.
- [144] T. Yonetani, H. Yamamoto, T. Iizuka, *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 2168.
- [145] M. Y. Wang, B. M. Hoffman, P. F. Hollenberg, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 6268.
- [146] C.-Z. Li, K. Nishiyama, I. Taniguchi, *Electrochim. Acta* **2000**, 45, 2883.
- [147] I. Taniguchi, C.-Z. Li, M. Ishida, Q. Yao, *J. Electroanal. Chem.* **1999**, 460, 245.
- [148] I. Hamachi, S. Tanaka, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 10458.
- [149] I. Hamachi, S. Tanaka, S. Tsukiji, S. Shinkai, S. Oishi, *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 4380.
- [150] I. Hamachi, S. Tsukiji, S. Shinkai, S. Oishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5500.
- [151] D. W. Low, J. R. Winkler, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 117.
- [152] Y. Z. Hu, S. Tsukiji, S. Shinkai, S. Oishi, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 241.
- [153] Y. Z. Hu, S. Tsukiji, S. Shinkai, I. Hamachi, *Chem. Lett.* **1999**, 517.
- [154] I. Willner, E. Zahavy, V. Heleg-Shabtai, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 542.
- [155] E. Zahavy, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 10581.
- [156] T. Ruzgas, E. Csöregi, J. Emnéus, L. Gorton, G. Marko-Varga, *Anal. Chim. Acta* **1996**, 330, 123.
- [157] M. Mehrvar, M. Abdi, *Anal. Sci.* **2004**, 20, 1113.
- [158] A. D. Ryabov, V. N. Goral, L. Gorton, E. Csöregi, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 961.
- [159] V. N. Goral, A. D. Ryabov, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1998**, 45, 61.
- [160] H. Zimmermann, A. Lindgren, W. Schuhmann, L. Gorton, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 592.
- [161] L. O. Narhi, A. J. Fulco, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 7160.
- [162] I. Hamachi, K. Nomoto, S. Tanaka, Y. Tajiri, S. Shinkai, *Chem. Lett.* **1994**, 1139.
- [163] Y. Hitomi, T. Hayashi, K. Wada, T. Mizutani, Y. Hisaeda, H. Ogoshi, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 1132; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 1098.
- [164] J. Y. Wong, J. D. Bronzcion, *Biomaterials*, CRC, Boca Raton, **2007**.
- [165] S. Sakiyama-Elbert, J. Hubbell, *Annu. Rev. Mater. Res.* **2001**, 31, 183.
- [166] I. Hamachi, K. Nakamura, A. Fujita, T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4966.
- [167] M. J. Boerakker, J. M. Hannink, P. H. Bomans, P. M. Frederik, R. J. Nolte, E. M. Meijer, N. A. Sommerdijk, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 4413; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4239.
- [168] M. J. Boerakker, N. E. Botterhuis, P. H. Bomans, P. M. Frederik, E. M. Meijer, R. J. Nolte, N. A. Sommerdijk, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 6071.
- [169] A. Ciferri, *Supramolecular Polymers*, Marcel Dekker, New York, **2000**.
- [170] N. Adams, U. S. Schubert, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, 59, 1504 (2007 Editors' Collection).
- [171] A. P. Schenning, E. W. Meijer, *Chem. Commun.* **2005**, 3245.
- [172] F. J. Hoebe, P. Jonkhøj, E. W. Meijer, A. P. Schenning, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1491.
- [173] S. Schmatloch, H. Hofmeier, U. S. Schubert in *Macromolecules Containing Metal and Metal-Like Elements* (Hrsg.: A. S. Abdel-Aziz, C. E. Carraher, Jr., C. U. Pittman, Jr., M. Zeldin), **2005**, S. 69.
- [174] H. Kitagishi, K. Oohora, H. Yamaguchi, H. Sato, T. Matsuo, A. Harada, T. Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10326.

- [175] C. M. Niemeyer, *Nano Today* **2007**, 2, 42.
- [176] C. M. Niemeyer, *Trends Biotechnol.* **2002**, 20, 395.
- [177] M. Lovrinovic, R. Seidel, R. Wacker, H. Schroeder, O. Seitz, M. Engelhard, R. S. Goody, C. M. Niemeyer, *Chem. Commun.* **2003**, 822.
- [178] M. Lovrinovic, M. Spengler, C. Deutsch, C. M. Niemeyer, *Mol. Biosyst.* **2005**, 1, 64.
- [179] M. Lovrinovic, C. M. Niemeyer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 335, 943.
- [180] M. Lovrinovic, L. Fruk, H. Schröder, C. M. Niemeyer, *Chem. Commun.* **2007**, 353.
- [181] M. Humenik, Y. Huang, Y. Wang, M. Sprinzl, *ChemBioChem* **2007**, 8, 1103.
- [182] F. Kukolka, M. Lovrinovic, R. Wacker, C. M. Niemeyer, *Methods Mol. Biol.* **2004**, 283, 181.
- [183] F. Kukolka, C. M. Niemeyer, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 2203.
- [184] B. P. Duckworth, Y. Chen, J. W. Wollack, Y. Sham, J. D. Mueller, T. A. Taton, M. D. Distefano, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 8975; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 8819.
- [185] L. Fruk, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2659; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2603.
- [186] L. Fruk, J. Müller, C. M. Niemeyer, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 7448.
- [187] L. Fruk, J. Müller, G. Weber, A. Narvaez, E. Dominguez, C. M. Niemeyer, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 5223.
- [188] S. Sakamoto, K. Kudo, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2005**, 78, 1749.
- [189] L. Fruk, J. Kuhlmann, C. M. Niemeyer, *Chem. Commun.* **2009**, 230.
- [190] T. Hayashi, H. Dejima, T. Matsuo, H. Sato, D. Murata, Y. Hisaeda, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11226.
- [191] M. Ohashi, T. Koshiyama, T. Ueno, M. Yanase, H. Fujii, Y. Watanabe, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 1035; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1005.
- [192] T. Ueno, T. Koshiyama, M. Ohashi, K. Kondo, M. Kono, A. Suzuki, T. Yamane, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6556.
- [193] T. Ueno, M. Ohashi, M. Kono, K. Kondo, A. Suzuki, T. Yamane, Y. Watanabe, *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 2852.
- [194] J. R. Carey, S. K. Ma, T. D. Pfister, D. K. Garner, H. K. Kim, J. A. Abramite, Z. Wang, Z. Guo, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10812.
- [195] Y. Lu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 118.
- [196] S. A. Salisbury, H. S. Forrest, W. B. Cruse, O. Kennard, *Nature* **1979**, 280, 843.
- [197] T. Kasahara, T. Kato, *Nature* **2003**, 422, 832.
- [198] J. A. Duine, *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, 88, 231.
- [199] J. A. Duine, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 74.
- [200] V. Laurinavicius, J. Razumiene, B. Kurtinaitiene, I. Lapenaite, I. Bachmatova, L. Marcinkeviciene, R. Meskys, A. Ramanavicius, *Bioelectrochemistry* **2002**, 55, 29.
- [201] V. Laurinavicius, J. Razumiene, A. Ramanavicius, A. D. Ryabov, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 20, 1217.
- [202] A. Ramanavicius, K. Habermüller, E. Csöregi, V. Laurinavicius, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3581.
- [203] V. Laurinavicius, B. Kurtinaitiene, V. Liauksminas, A. Ramanavicius, R. Meskys, R. Rudomanskis, T. Skotheim, L. Boguslavsky, *Anal. Lett.* **1999**, 32, 299.
- [204] A. Ramanavicius, K. Habermüller, J. Razumiene, R. Meskys, L. Marcinkeviciene, I. Bachmatova, E. Csöregi, V. Laurinavicius, W. Schuhmann, *Prog. Colloid Polym. Sci.* **2001**, 116, 143.
- [205] M. Elias, M. Tanaka, M. Sakai, H. Toyama, K. Matsushita, O. Adachi, M. Yamada, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 48356.
- [206] M. Zayats, E. Katz, R. Baron, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12400.
- [207] K. Matsushita, H. Toyama, M. Yamada, O. Adachi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 58, 13.
- [208] E. Katz, D. D. Schlereth, H.-L. Schmidt, A. J. J. Olsthoorn, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, 368, 165.
- [209] O. A. Raitman, F. Patolsky, E. Katz, I. Willner, *Chem. Commun.* **2002**, 1936.
- [210] P. Dokter, J. Frank, J. A. Duine, *Biochem. J.* **1986**, 239, 163.
- [211] B. J. Schie, J. P. Dijken, J. G. Kuenen, *FEMS Microbiol. Lett.* **1984**, 24, 133.
- [212] A. R. Dewanti, J. A. Duine, *Biochemistry* **1998**, 37, 6810.
- [213] D. Iswantini, K. Kano, T. Ikeda, *Biochem. J.* **2000**, 350 (3), 917.
- [214] B. I. Ipe, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 519; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 504.
- [215] L. Fruk, V. Rajendran, M. Spengler, C. M. Niemeyer, *ChemBioChem* **2007**, 8, 2195.
- [216] V. J. Gandubert, E. Torres, C. M. Niemeyer, *J. Mater. Chem.* **2008**, 18, 3824.
- [217] I. Hamachi, S. Tsukiji, S. Tanaka, S. Shinkai, *Chem. Lett.* **1996**, 751.