

Eins ist zu wenig, drei sind zuviel: Oxidation von Methan an Dikupferzentren**

Richard A. Himes, Kevin Barnese und Kenneth D. Karlin*

Bioanorganische Chemie · Kupfer · Methan-Monooxygenasen · Oxidationen · Zweikernkomplexe

Die Aktivierung reaktionsträger C-H-Bindungen unter milden Bedingungen ist ein reges Forschungsgebiet, gerade auch im Hinblick auf die globale Rohstoffverknappung. In diesem Zusammenhang werden auch die Vorteile des einfachsten Kohlenwasserstoffs Methan als Ausgangsverbindung für chemische Prozesse verständlich: Die Funktionalisierung dieses C₁-Bausteins würde auch die Erdgasvorkommen als Synthesestufen für wichtige Chemikalien erschließen. Weil aber Methan wegen seiner starken C-H-Bindungen (104 kcal mol⁻¹) schwieriger zu oxidieren ist als alle anderen Kohlenwasserstoffe, sind gängige industrielle Verfahren, die Methan in nutzbare Produkte umwandeln, durch einen übermäßigen Energiebedarf und mangelnde Selektivitäten belastet.^[1]

Es geht aber auch anders, nämlich in den natürlichen Methan-Monooxygenasen: Diese Enzyme sind für die metabolische Umwandlung von CH₄ in bestimmten Bakterien zuständig, die Methan als primäre Energiequelle und als Grundstoff für die Biosynthese nutzen. Zwei Enzymarten, lösliche (soluble methane monooxygenase, sMMO) und membrangebundene Methan-Monooxygenase (particulate methane monooxygenase, pMMO), oxidieren CH₄ bei Umgebungstemperatur und -druck selektiv zu CH₃OH. Im aktiven Zentrum der gut untersuchten sMMO bindet ein Dieisencluster ein Disauerstoffmolekül und aktiviert es für die Zweielektronenoxidation. In ausführlichen bioanorganischen Forschungen über mehrere Jahrzehnte hat sich ein möglicher Mechanismus der sMMO-Katalyse herauskristallisiert.^[2]

Hingegen hat das Transmembranprotein pMMO die Geheimnisse seiner Struktur und Reaktivität bis jetzt nicht preisgegeben. Ein Kupferion wurde als wichtigster Cofaktor dieses Metalloenzymes vermutet, seine Aufgabe in pMMO ließ sich aber nicht ergründen. So führten Messungen zum Kup-

fergehalt von pMMO und zur Oxidationsaktivität „pro Kupferion“ zu unterschiedlichen Ergebnissen.^[3] Zur Zusammensetzung des aktiven Zentrums von pMMO konzentriert man sich auf drei Hypothesen: Der Elektronentransfer und die katalytische Reaktivität beruhen auf 1) wenigstens einem, vielleicht aber auch mehreren Trikupferclustern,^[2b] 2) einem Dieisenzentrum^[4] oder 3) einem Dikupferzentrum.

Nach der Veröffentlichung der ersten Röntgen-Strukturanalyse für das Enzym (Abbildung 1) durch Rosenzweig und Lieberman erhielt die zuletzt genannte Version den Vorzug.^[5] Dieses bahnbrechende Resultat warf aber seinerseits viele neue Fragen auf. Ist das Dikupferzentrum auch wirklich das katalytisch aktive Zentrum? Auf welche Weise kann solch ein Cluster Methan oxidieren? Ein einzelnes Kupferzentrum, das in der ersten Röntgenstrukturanalyse gefunden worden war, fehlte in einer zweiten Strukturbestimmung für pMMO aus einer anderen Spezies.^[6] Erfüllt dieses Kupferzentrum überhaupt eine Funktion? In einer dritten Position war das

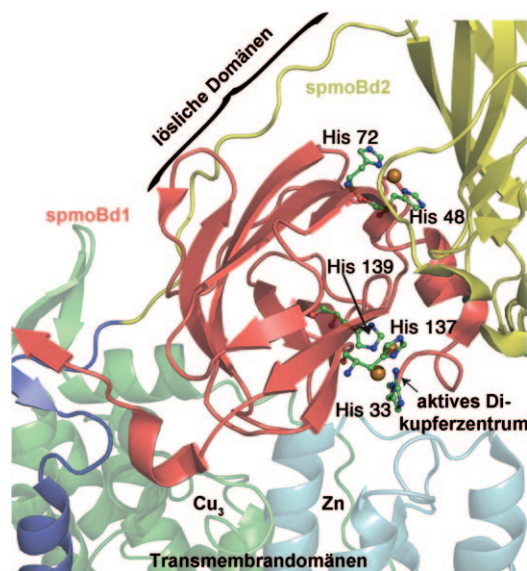


Abbildung 1. Die Struktur von pMMO aus *M. capsulatus* (Bath). Lösliche Domänen der Untereinheit B sowie Teile von Transmembranregionen der Untereinheiten B (blau), A (blassgrün) und C (blassblau) sind gezeigt. Studien an rekombinanten Proteinen, die nur aus den löslichen Domänen spmoBd1 (rot) und/oder spmoBd2 (gelb) bestehen, weisen das Dikupferzentrum als das aktive Zentrum von pMMO aus. PDB-Nummer: 1YEW.

[*] Dr. R. A. Himes, Prof. Dr. K. D. Karlin
Department of Chemistry, Johns Hopkins University
Baltimore, MD 21218 (USA)
E-Mail: karlin@jhu.edu

Dr. K. Barnese, Prof. Dr. K. D. Karlin
Department of Bioinspired Science, Ewha Womans University
Seoul 120-750 (Korea)

[**] Wir danken den US-amerikanischen NIH (GM28962) und dem koreanischen WCU project (R31-2008-000-10010-0) für finanzielle Unterstützung sowie Prof. K. Yoshizawa (Universität Kyushu, Japan) für eine Rohversion des rechten Teils von Abbildung 2.

Zinkion aus der ersten Strukturbestimmung in der zweiten durch ein Kupferion ersetzt: Ist dies das aktive Zentrum?

Bei genauerer Betrachtung spiegeln die Reste an der „Zink“-Position das Bindungsmotiv für Dieisenzentren in Eisen-Monooxygenasen wider (einschließlich sMMO). Einige Forscher schlossen daher, dass im Zuge von Reinigung oder Kristallisation ein aktives Dieisenzentrum aus dieser Stelle entfernt worden war. Weiterhin entsprach eine Ansammlung hydrophiler Reste in einer Transmembrandomäne recht gut einer Trikupfercluster bindenden Stelle (Abbildung 1).^[3b,7] Die fehlende Aktivität der kristallisierten Proteine gab weiteren Anlass, daran zu zweifeln, dass die Röntgenstrukturanalysen die Cofaktoren von pMMO getreu wiedergeben.

All diese Probleme verlangten nach einem neuen Lösungsansatz, wie ihn aktuelle Resultate aus Amy Rosenzweigs Gruppe liefern.^[8] Sie nutzten rekombinante DNA, um in *E. coli* modifiziertes pmoB-Protein aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) zu exprimieren; in dieser lösungsmittel-exponierten Untereinheit des Enzyms befinden sich die ein- und zweikernigen Kupferzentren. Der Austausch der beiden membrandurchdringenden Helices in der vollständigen Untereinheit gegen eine kurze Aminosäuresequenz macht die rekombinanten Proteine ohne Detergenszusatz löslich (spmoB). Durch diesen Ansatz gelang es, einen Aspekt des Rätsels um pMMO herauszustellen und getrennt zu betrachten.

Struktur und Reaktivität der mit Kupfer beladenen rekombinanten Proteine wurden untersucht. Rekombinantes spmoB bindet durchschnittlich drei Kupferionen, wie aufgrund der Kristallstruktur des vollständigen Enzyms zu vermuten war. Wie für das vollständige Enzym^[5,9] ergaben Röntgenabsorptionsspektroskopie- und EXAFS-Analysen (extended X-ray absorption fine structure) einen kleinen Cu-Cu-Abstand – und somit einen sicheren Hinweis auf ein Dikupferzentrum. Mithilfe der rekombinanten DNA für die Untereinheit konnten auch Mutagenesestudien ausgeführt werden, die mit dem vollständigen Enzym gescheitert waren. Nach Mutationen an einer der drei bindenden Histidinpositionen am Dikupferzentrum (Abbildung 2) war die Kupferionenaufnahme durch das Protein verringert, und die zugehörigen EXAFS-Daten lieferten keinerlei Hinweise mehr auf eine Kupfer-Kupfer-Wechselwirkung.^[5]

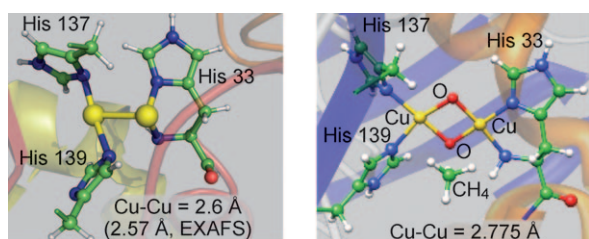


Abbildung 2. Links: das aktive Dikupferzentrum von pMMO in einer Röntgenstrukturanalyse mit niedriger Auflösung (PDB-Nummer: 1YEW). Rechts: ein gemischtvalenter Cu^{II}-Cu^{III}-bis(μ-oxo)-Komplex, der in der Hydroxylierung von Methan aktiv ist (aus Rechnungen von Yoshizawa und Mitarbeitern^[10]).

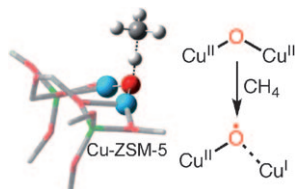
Was aber am wichtigsten ist: spmoB mit drei Kupferionen oxidiert Methan – anders als die spmoBd2-Domäne, die keine Metallbindestellen enthält, oder spmoB, in dem zwei Reste am Dikupferzentrum durch Alanin ersetzt waren. Eine Mutation der Aminosäureliganden des einkernigen Kupferzentrums senkt die Reaktivität, ohne sie aber ganz zum Erliegen zu bringen. Diese Ergebnisse führen unweigerlich zu zwei Schlüssen: 1) Die Aktivität von pMMO wird durch die pmoB-Untereinheit getragen und ist folglich nicht mit den vorgeschlagenen Bindestellen für Dieisen- oder Trikupfercluster in Verbindung zu bringen, und 2) ein Dikupferzentrum bewirkt die katalytische Oxidation von Methan.

Die Gültigkeit dieser Experimente mit der rekombinanten Untereinheit für das Verhalten des gesamten Enzyms wurde durch elegante Studien mit unbehandeltem isoliertem pMMO bestätigt. Wurden alle Metallionen durch Zusatz von Cyanid aus dem Membranenzym entfernt, so war keinerlei Aktivität zu verzeichnen. Die anschließende Titration solcher Apo-pMMO-Proben mit einer Kupferlösung stellte 90 % der Aktivität in der Methanoxidation nach Zugabe von 3 Äquivalenten Kupfer (pro pMMO-Promotor) wieder her. Weiterer Kupferzusatz führt zur Inhibierung von pMMO; folglich sind keine zusätzlichen Kupferzentren (wie etwa Trikupfercluster) für die Aktivität erforderlich. Auch die Zugabe von Eisen – alleine oder in Kombination mit Kupfer – verlieh dem Protein keine Oxidationswirkung.

Diese Experimente scheinen alle alternativen Hypothesen über das aktive Zentrum von pMMO zu widerlegen. Die minimale Eisenaufnahme und das Fehlen jeglicher Aktivität in isoliertem pMMO oder rekombinanten Proteinen nach dem Rekonstituieren mit Eisen schließen einen Dieisencluster als aktives Zentrum aus. Und die Tatsache, dass die maximale Aktivität für pMMO mit drei Kupferionen erreicht ist (die sich gemäß EXAFS-Studien auf ein einkerniges und ein zweikerniges Kupferzentrum verteilen), spricht gegen das Vorliegen eines oder mehrerer Trikupfercluster im Enzym. Das rekombinante Protein gibt die pMMO-Aktivität nicht exakt wieder – die Methanoxidation ist deutlich langsamer als im vollständigen Enzym –, aber eine signifikante Beteiligung weiterer Metallzentren an den Vorgängen in pMMO (Katalyse oder Elektronentransfer) erscheint mit den Ergebnissen der Metalltitrationen unvereinbar.

Zusammenfassend ist das aktive Zentrum von pMMO also ein Dikupferzentrum (Abbildung 2). Nach dieser Erkenntnis steht man aber vor der nächsten kniffligen Frage: Wie kann ein Dikupferzentrum Methan zu Methanol oxidieren? Studien mit dem pMMO-Enzym lieferten nur wenige Einblicke in den Mechanismus dieses Prozesses. Nachdem pMMO aber in experimenteller und vor allem in theoretischer Hinsicht stärker untersucht worden ist, liegen bereits mögliche Erklärungsvorschläge vor. Rechnungen von Yoshizawa und Mitarbeitern ergaben, dass die um ein Elektron reduzierte Cu^{II}Cu^{III}(μ-(O)₂)-Gruppe stärker oxidierend wirkt als eine entsprechende symmetrische Cu^{III}₂(μ-(O)₂)- oder eine Peroxo-Gruppe Cu^{II}₂(O₂²⁻) – und hinreichend stark, um die C-H-Bindung von Methan zu spalten (Figure 2).^[10] Auch Chan und Mitarbeiter ziehen ein solches gemischtvalentes Dikupfermotiv für die Methanoxidation in Betracht, allerdings als Teil einer Trikupfereinheit.^[3b,11] In einer spektro-

skopischen und theoretischen Studie zu dem kupferhaltigen Zeolith CuZSM-5, der Methan oxidiert, identifizierten Solomon, Schoonheydt und Mitarbeiter eine einfache Cu^{II} -O- Cu^{II} -Einheit als aktives Oxygenierungsmittel.^[12] Ähnlich wie es Rechnungen zu pMMO andeuten, soll das Oxodikupfer(II)-Zentrum im Zeolith über Sauerstoffradikal-Charakter verfügen und dadurch zur Abspaltung eines Wasserstoffatoms von Methan befähigt sein (Schema 1).



Schema 1. Berechneter Übergangszustand für die Methanoxidation an Oxodikupfer(II)-Zentren im CuZSM-5-Zeolith.^[12] Kommen entsprechende Intermediate auch für das katalytische Dikupferzentrum von pMMO infrage? Und wenn ja, wie entstehen sie im enzymatischen Kupfer(I)-Disauerstoff-System?

Gemischtsvalente Oxodikupfer(II,III)- sollten ebenso wie einfache Oxodikupfer(II)-Zentren als mögliche aktive Zentren in Methan oxidierenden Enzymen in Erwägung gezogen werden. Die ersten wurden unter den synthetischen Cu_2O_2 -Modellverbindungen identifiziert oder isoliert,^[1c,13,14] während für die zweiten zwar Vorbilder existieren,^[15] aber noch keine gründlichen Untersuchungen. In einigen Berichten über kupfervermittelte Oxidationen an starken Kohlenwasserstoffbindungen wird vermutet, dass die Reaktivität erst durch die Reduktion einer Cu_2O_2 -Einheit zu einem gemischtsvalenten $\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{III}}$ -System erzeugt wird.^[13] Dies wirft wiederum weitere Fragen auf: Wie kann sich ein Dikupferzentrum durch Reaktion mit Disauerstoff und Reduktion in eine Methan oxidierende Einheit umwandeln? Und woher stammen die benötigten Elektronenäquivalente: von anderen Kupferzentren oder vielleicht von benachbarten Aminosäuren?^[10]

Die Ergebnisse von Rosenzweigs Arbeitsgruppe scheinen die Suche nach dem aktiven Zentrum in pMMO zu beenden. Bis zu einem umfassenden Verständnis der kupfervermittel-

ten Methanoxidation sind aber noch viele Fragen zu beantworten.

Eingegangen am 4. Juni 2010

Online veröffentlicht am 29. Juli 2010

- [1] a) H. Arakawa et al., *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 953; b) B. L. Conley, W. J. Tenn III, K. J. H. Young, S. K. Ganesh, S. K. Meier, V. R. Ziatdinov, O. Mironov, J. Oxgaard, J. Gonzales, W. A. Goddard III, R. A. Periana, *J. Mol. Catal. A* **2006**, *251*, 8; c) R. A. Himes, K. D. Karlin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18877.
- [2] a) B. J. Wallar, J. D. Lipscomb, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2625; b) M. Merckx, D. A. Kopp, M. H. Sazinsky, J. L. Blazyk, J. Müller, S. J. Lippard, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2860; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2782; c) M.-H. Baik, M. Newcomb, R. A. Friesner, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2385; d) I. Siewert, C. Limberg, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10316.
- [3] a) A. S. Hakemian, A. C. Rosenzweig, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 223; b) S. I. Chan, S. S.-F. Yu, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 969.
- [4] M. Martinho, D. W. Choi, A. A. DiSpirito, W. E. Antholine, J. D. Semrau, E. Munck, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15783.
- [5] R. L. Lieberman, A. C. Rosenzweig, *Nature* **2005**, *434*, 177.
- [6] A. S. Hakemian, K. C. Kondapalli, J. Telser, B. M. Hoffman, T. L. Stemmler, A. C. Rosenzweig, *Biochemistry* **2008**, *47*, 6793.
- [7] S. I. Chan, V. C.-C. Wang, J. C.-H. Lai, S. S.-F. Yu, P. P.-Y. Chen, K. H.-C. Chen, C.-L. Chen, M. K. Chan, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2038; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1992.
- [8] R. Balasubramanian, S. M. Smith, S. Rawat, L. A. Yatsunyk, T. L. Stemmler, A. C. Rosenzweig, *Nature* **2010**, *465*, 115.
- [9] R. L. Lieberman, K. C. Kondapalli, D. B. Shrestha, A. S. Hakemian, S. M. Smith, J. Telser, J. Kuzelka, R. Gupta, A. S. Borovik, S. J. Lippard, B. M. Hoffman, A. C. Rosenzweig, T. L. Stemmler, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 8372.
- [10] a) Y. Shiota, K. Yoshizawa, *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 838; b) K. Hori, Y. Shiota, K. Yoshizawa in *Wiley Serie on Reactive Intermediates in Chemistry and Biology*, Vol. 5 (Hrsg.: S. E. Rokita), *Copper-Oxygen Chemistry* (Hrsg.: S. Itoh, K. D. Karlin), Wiley-VCH, Weinheim, **2010**, im Druck.
- [11] P. P. Y. Chen, S. I. Chan, *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 801.
- [12] J. S. Woertink, P. J. Smeets, M. H. Groothaert, M. A. Vance, B. F. Sels, R. A. Schoonheydt, E. I. Solomon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18908.
- [13] R. A. Himes, K. D. Karlin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 119.
- [14] E. A. Lewis, W. B. Tolman, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1047.
- [15] I. Sanyal, M. Mahroof-Tahir, S. Nasir, P. Ghosh, B. I. Cohen, Y. Gultneh, R. Cruse, A. Farooq, K. D. Karlin, S. Liu, J. Zubietta, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 4322.