

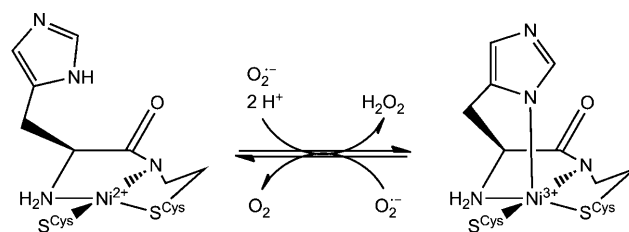
# Bestimmung der Substratposition in der Nickel-Superoxiddismutase: eine Modellstudie\*\*

Daniel Tietze, Stephan Voigt, Doreen Mollenhauer, Marco Tischler, Diana Imhof, Torsten Gutmann, Leticia González, Oliver Ohlenschläger, Hergen Breitzke, Matthias Görlach und Gerd Buntkowsky\*

Eine der Ursachen für manche Krebsarten, Entzündungen und verwandte Krankheiten sind reaktive Sauerstoffspezies. Diese sind nicht nur zytotoxisch, sondern auch an der Signalweiterleitung in Zellen beteiligt.<sup>[1]</sup> Der Schutz vor diesen Sauerstoffspezies, die hauptsächlich bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff durch reaktive Metaboliten der Atmungskette entstehen, ist für Organismen überlebenswichtig. In aeroben Organismen sind dafür Superoxiddismutasen (SODs) zuständig.<sup>[2]</sup> Wegen ihrer biologischen und medizinischen Relevanz werden SODs intensiv erforscht, und allein in den ersten sechs Monaten von 2010 sind bereits mehr als 2000 Publikationen erschienen. Obwohl diese Forschungen schon zu detailliertem Wissen bezüglich der biologischen Funktion und Kinetik von SODs geführt haben, ist der genaue Reaktionsmechanismus bislang unbekannt. Zurzeit werden zwei Mechanismen für den Superoxidabbau diskutiert.<sup>[3]</sup> Einer der Hauptgründe für diese Wissenslücke ist die hohe Geschwindigkeit der Reaktion, die unter diffusionslimitierten Bedingungen Wasserstoffperoxid und Sauerstoff liefert ( $k_{\text{kat}} > 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).<sup>[4]</sup> Daher sind ihre Übergangszustände schlicht zu kurzlebig, um sie spektroskopisch charakterisieren zu können. Aus diesem Grund wurden für die Erforschung der SODs Modellsysteme entwickelt. Unsere Untersuchungen an Modellsystemen der Nickel-Superoxiddismutase (NiSOD) brachten nun Klarheit über den Reaktionsmechanismus und ermöglichten so eine Entschei-

dung zwischen den beiden möglichen Reaktionsmechanismen. Darüber hinaus gelang uns, die Art der Substratbindung zu bestimmen und das Vorhandensein eines funktionellen Wassermoleküls zu belegen.

Derzeit sind drei unabhängige Superoxiddismutase-Klassen bekannt. Sie enthalten entweder einen zwei- (Cu oder Zn) oder einen einkernigen Cofaktor (Fe, Mn oder Ni).<sup>[1b,5]</sup> In der NiSOD, einem einkernigen, nickelhaltigen Metalloenzym, wechselt die Nickeloxidationsstufe während der Katalyse zwischen  $\text{Ni}^{\text{II}}$  und  $\text{Ni}^{\text{III}}$ .<sup>[3a,4b,6]</sup> 1996 fand man die NiSOD erstmals in *Streptomyces*<sup>[5c]</sup> und mehreren marinen Cyanobakterien. Durch kristallographische und spektroskopische Untersuchungen erhielt man ein Bild von der Struktur des gesamten Enzyms und der Geometrie seines aktiven Zentrums. Es zeigte sich, dass das zentrale Nickel-Ion in einem „Nickelhaken“ aus den ersten sechs N-terminalen Aminosäuren der aktiven Form der NiSOD aus *S. coelicolor* ruht (Schema 1).<sup>[3a,4b,6,7]</sup>



**Schema 1.** Koordinationsgeometrie der NiSOD und ihre Rolle beim Superoxidabbau.<sup>[3b]</sup>

Für eine genauere Untersuchung des NiSOD-Katalysemechanismus wurden mehrere katalytisch aktive Metallopeptidmodelle entwickelt, die auf den ersten 12, 9, 7 oder 6 N-terminalen Aminosäuren der NiSOD aus *S. coelicolor* basieren.<sup>[3b,c,8]</sup> Als Mechanismen für die Substratbindung werden ein Inner- und ein Outer-Sphere-Elektronentransfermechanismus diskutiert<sup>[3]</sup> d.h., das Substrat wird in der ersten bzw. in der zweiten Koordinationssphäre des aktiven Zentrums gebunden. Erst kürzlich konnten wir einen Substrat-Metallopeptid-Modellkomplex herstellen und charakterisieren, der Cyanid als Substratanalogon enthält. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stützen die Hypothese eines Inner-Sphere-Elektronentransfers.<sup>[9]</sup> Untersuchungen an CuZnSODs haben gezeigt, dass sich Cyanid als starker Inhibitor der SODs hervorragend eignet, um deren Funktion zu studieren. Cyanid bildet mit der CuZnSOD einen stabilen Komplex, indem es

[\*] Dr. D. Tietze, Dipl.-Ing. S. Voigt, Dipl.-Chem. M. Tischler, Dr. T. Gutmann, Dr. H. Breitzke, Prof. Dr. G. Buntkowsky Technische Universität Darmstadt  
Eduard-Zintl-Institut für Anorganische und Physikalische Chemie  
Petersenstraße 20, 64287 Darmstadt (Deutschland)  
E-Mail: gerd.buntkowsky@chemie.tu-darmstadt.de

Dr. D. Imhof  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Zentrum für Molekulare Biomedizin (Deutschland)

Dipl.-Chem. D. Mollenhauer  
Freie Universität Berlin (Deutschland)

Prof. Dr. L. González  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Institut für Physikalische Chemie (Deutschland)

Dr. O. Ohlenschläger, Dr. M. Görlach  
Fritz-Lipmann-Institut, Jena (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert. Das Fritz-Lipmann-Institut wird durch den Freistaat Thüringen und die Bundesrepublik Deutschland unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201005027> zu finden.

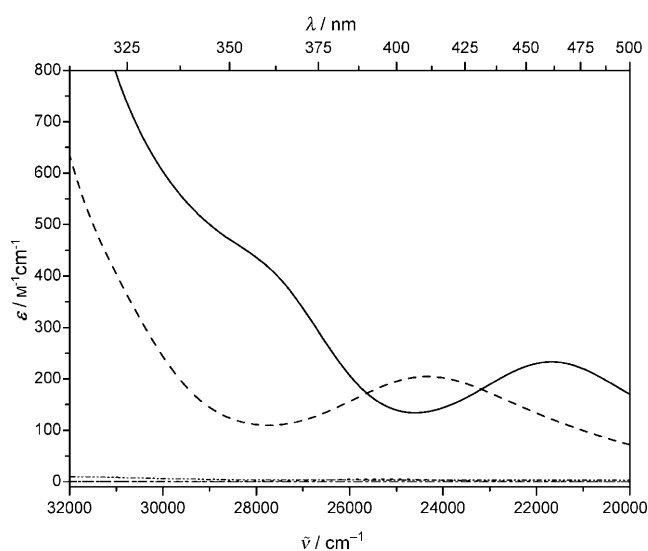
direkt an das  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion im aktiven Zentrum bindet.<sup>[10]</sup> Dieser Komplex wurde unter anderem mit EPR-,<sup>[11]</sup> IR- und Raman-Spektroskopie,<sup>[12]</sup> Kristallographie<sup>[13]</sup> und computergestützter Oberflächenmodellierung<sup>[14]</sup> untersucht. 2009 konnten Shin et al. Kristalle eines  $\text{H}_2\text{O}_2$ -CuZnSOD-Komplexes erhalten.<sup>[15]</sup> In diesem Komplex ist das  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Molekül gleich orientiert wie der Cyanidligand in dem von Carugo et al. untersuchten Cyanid-CuZnSOD-Komplex.<sup>[13]</sup> Weiterhin stimmt das Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen der CuZnSOD<sup>[14,16]</sup> und  $\text{H}_2\text{O}_2$  sehr gut mit dem zwischen der CuZnSOD und Cyanid überein.<sup>[13]</sup>

Eine weitere wichtige Besonderheit der NiSOD-Modellpeptide wurde anhand ihrer NMR-spektroskopisch bestimmten dreidimensionalen Struktur in Lösung deutlich.<sup>[3c]</sup> Während im nativen Enzym die Leu4-Pro5-Peptidbindung *cis*-konfiguriert ist, ist sie in den Modellpeptiden *trans*-konfiguriert.<sup>[3c]</sup> Außerdem konnte mittels DFT-Rechnungen gezeigt werden, dass die Carbonylgruppe der *trans*-konfigurierten Leu4-Pro5-Peptidbindung möglicherweise die Rolle eines fünften Liganden übernimmt und so das Substrat zwingt, das Nickelzentrum von der entgegengesetzten Seite wie im nativen Enzym anzugreifen.<sup>[3c]</sup> Um den Reaktionsmechanismus, den Mechanismus der Inhibierung des Enzyms durch Cyanid-Ionen (diese Inhibierung wurde bereits von Barondeau et al. sowohl für das natürliche Enzym<sup>[3a]</sup> als auch für die Metallopeptide<sup>[3b]</sup> diskutiert) und die Art, wie die Cyanid-Ionen im Enzym gebunden sind, zu untersuchen, wollten wir den Cyanid-Metallopeptid-Komplex strukturell charakterisieren. Da sich dafür weder Röntgenkristallographie noch Lösung-NMR-Spektroskopie eignete, wurden Festkörper-NMR-Experimente und DFT-Rechnungen durchgeführt.

Dazu mussten zunächst mehrere  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierte Substratmodelle ausgehend von den Metallopeptiden von Shearer und Weston entwickelt und analysiert werden. Diese bestehen im Wesentlichen aus den ersten sieben N-terminalen Aminosäuren der aktiven Form der NiSOD aus *S. coelicolor*. Diese Metallopeptide wurden in einer Stelle im Peptidrückgrat  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{15}\text{N}$ -markiert (Standard-Festphasenpeptidsynthese der Peptidisotopomere unter Anwendung der Fmoc-Strategie (Fmoc: 9-Fluorenylmethoxycarbonyl) und Reinigung durch semipräparative HPLC, Umsetzung zu den Metallopeptiden durch Zugabe von  $\text{NiCl}_2$ <sup>[3b,9]</sup>) und anschließend mit  $^{15}\text{N}$ - bzw.  $^{13}\text{C}$ -angereichertem Cyanid analog zur Synthese des Cyanid-Nonametallopeptid-Addukts<sup>[9]</sup> komplexiert (die Formeln der so erhaltenen Komplexe sind in Tabelle 1 zu finden).

Die elektronenspektroskopischen Eigenschaften der Heptametallopeptide und ihrer Cyanidaddukte sind, wie weiter unten gezeigt, denen des Nonametallopeptids und seines Cyanidaddukts sehr ähnlich. Darüber hinaus wird die SOD-Aktivität durch eine Verkürzung des Peptids auf sein mutmaßliches Minimalmotiv von sechs Resten nicht beeinflusst.<sup>[3c]</sup> Die charakteristischen Absorptionsmaxima von  $[\text{Ni}(\text{mSOD})]$  und  $[\text{Ni}(\text{CN})(\text{mSOD})]$  bei  $\lambda = 458$  bzw.  $410$  nm sind auch bei  $[\text{Ni}(\text{m}^7\text{SOD})]$  bzw.  $[\text{Ni}(\text{CN})(\text{m}^7\text{SOD})]$  vorhanden (Abbildung 1).

Wie bereits aus früheren Untersuchungen gefolgert, ist die Bindung des Cyanid-Ions an die Metallopeptide vermut-



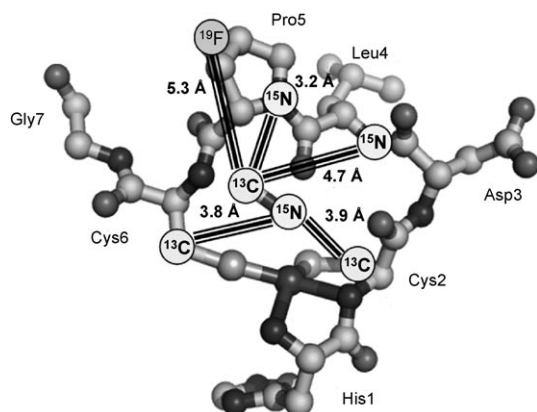
**Abbildung 1.** UV/Vis-Spektren von  $[\text{Ni}(\text{m}^7\text{SOD})]$  (—),  $[\text{Ni}(\text{m}^7\text{SOD})] + 2 \text{ KCN}$  (----),  $\text{NiCl}_2$  (.....), KCN (-.-.-) und  $(\text{m}^7\text{SOD})$  (—>).

lich ein Gleichgewicht zwischen der Bildung des Addukts und der Bildung von  $[\text{Ni}(\text{CN})_4]^{2-}$ . Für eine optimierte Festkörper-NMR-Probenpräparation ist eine möglichst hohe Konzentration an nickelgebundenem Cyanid erforderlich. Wann das der Fall ist, wurde UV/Vis-spektroskopisch ermittelt. Die maximale Konzentration an Cyanid-Metallopeptid-Addukt wurde nach der Zugabe von 1.6 Äquiv. KCN zu einer Lösung von  $[\text{Ni}(\text{m}^7\text{SOD})]$  erhalten. Wurden mehr als 2 Äquiv. KCN zugegeben, fiel der Extinktionskoeffizient bei  $\lambda = 410$  nm bis zu einer Zugabe von 50 Äquiv. KCN exponentiell ab, und es kam zur Bildung von  $[\text{Ni}(\text{CN})_4]^{2-}$  (weitere UV/Vis-Spektren sind in den Hintergrundinformationen zu finden).

Die Abstände zwischen den isotonenmarkierten Positionen im Cyanid und im Peptidrückgrat wurden REDOR-NMR-spektroskopisch bestimmt.<sup>[17]</sup> Mit dieser Methode kann die Stärke der zu  $r^{-3}$  proportionalen magnetischen heteronuclearen dipolaren Kopplung zwischen zwei Kernen bestimmt werden. Auf diese Art konnte bereits erfolgreich die Bindung von Azid an die humane MnSOD untersucht werden.<sup>[18]</sup> Um diese Methode anwenden zu können, ist eine geeignete Struktur notwendig, weshalb wir die dreidimensionale Struktur unseres Substrat-NiSOD-Modells mittels NMR-Spektroskopie in Lösung ermittelten. Da wir die Zuordnung der Protonensignale mithilfe zweidimensionaler protonenkorrelierter Standard-NMR-Experimente an unmarkiertem  $[\text{Ni}(\text{CN})(\text{m}^7\text{SOD})]$  vornahmen, erhielten wir keine Informationen über das nickelgebundene Cyanid-Ion.<sup>[3c,19]</sup> Die für  $[\text{Ni}(\text{CN})(\text{m}^7\text{SOD})]$  erhaltene Struktur stimmt gut mit der eines bereits früher untersuchten NiSOD-Biomimetikums ohne gebundenes Substratanalogon überein (Standardabweichung für die Reste His1–Cys6:  $0.57 \text{ \AA}$ ).<sup>[3c]</sup> Ein ähnliches Ergebnis wurde für das Cyanid-CuZnSOD-Addukt gefunden. In diesem System hatte das kupfergebundene Cyanid-Ion nur einen geringen Einfluss auf die lokale Struktur des aktiven Zentrums und veränderte vor allem die Zahl der an das Kupfer-Ion koordinierten Aminosäureliganden nicht.<sup>[10,11,14,15]</sup> Der Pro5-Rest weist wieder eine *trans*-

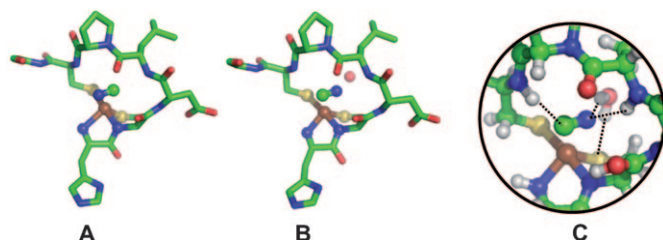
Peptidbindung auf. Hinweise auf einen Beitrag des aromatischen Rings des N-terminalen His1-Rests zur gut definierten Nickelbindungsregion wurden nicht gefunden (für Details siehe die Hintergrundinformationen).

Die bei der REDOR-NMR-spektroskopischen Untersuchung der fünf unterschiedlich spinmarkierten Cyanid-NiSOD-Komplexe (siehe Tabelle 1) ermittelten Wechselwirkungen zwischen den Spinlabels wurden genutzt, um das Cyanid-Ion manuell in die Lösungs-NMR-Struktur zu modellieren, was die in Abbildung 2 gezeigte Struktur lieferte, bei der das Cyanid-Ion genau so an das Nickel-Ion gebunden ist, wie Barondeau et al.<sup>[3a]</sup> und Herbst et al.<sup>[20]</sup> postuliert hatten.



**Abbildung 2.** Lösungs-NMR-spektroskopisch ermittelte Struktur des Peptidrückgrats des Cyanidaddukts mit allen in einem der verwendeten Isotopomere markierten Positionen und den aus den REDOR-NMR-spektroskopischen Daten abgeleiteten Abständen zwischen den Spinlabels des Peptidrückgrats und denen des Cyanid-Ions.

Zur Absicherung unserer Experimente führten wir eine quantenchemische Optimierung des Cyanidkomplexes durch. Dafür wurde in einem ersten Schritt das Cyanid-Ion manuell in das Peptid integriert. Die so erhaltenen Strukturen wurden anschließend mit den experimentellen Daten der Lösungs- und der REDOR-NMR-Messungen verglichen. Die am besten mit den experimentellen Daten übereinstimmende Struktur **A** ist in Abbildung 3 gezeigt. Die berechneten und



**Abbildung 3.** Kugel-Stab-Darstellung der quantenchemisch optimierten Strukturen (Theorieniveau BP86(MAR-J); COSMO)/TZVP für **A** und **B**; Wasserstoffatome sind nicht gezeigt. **A**: optimierte Struktur ohne Wasser; **B**: optimierte Struktur mit einem Wassermolekül; **C**: vergrößerter Ausschnitt aus Struktur **B** inklusive der Wasserstoffatome; Wasserstoffbrückenbindungen zum Cyanid-Ion sind als gepunktete Linien gezeichnet.

**Tabelle 1:** Vergleich der für die spinmarkierten Komplexe **a–e** ermittelten REDOR-Abstände mit den für die Strukturen **A** und **B** in Abbildung 3 berechneten Abständen in Å und die jeweilige mittlere Standardabweichung zu den experimentellen Werten.

Peptid <sup>[a]</sup>	CN <sup>−</sup> zu	REDOR	<b>A</b>	<b>B</b>
[Ni(C <sup>15</sup> N)(m <sup>7</sup> SOD- <sup>13</sup> C <sub>β</sub> -Cys2)] <b>a</b>	C <sup>β</sup> (Cys2)	3.9 ± 0.3	4.3	3.3
[Ni(C <sup>15</sup> N)(m <sup>7</sup> SOD- <sup>13</sup> C <sub>β</sub> -Cys6)] <b>b</b>	C <sup>β</sup> (Cys6)	3.8 ± 0.1	3.4	4.0
[Ni( <sup>13</sup> CN)(m <sup>7</sup> SOD- <sup>15</sup> N-Leu)] <b>c</b>	N <sup>α</sup> (Leu)	4.7 ± 0.4	3.1	3.9
[Ni( <sup>13</sup> CN)(m <sup>7</sup> SOD-ProF)] <b>d</b>	H(F) <sup>γ</sup> (Pro)	5.3 ± 0.2	6.7	6.7
[Ni( <sup>13</sup> CN)(mSOD- <sup>15</sup> N-Pro)] <b>e</b>	N <sup>α</sup> (Pro)	3.2 ± 0.2	3.7	3.8
Standardabweichung			1.02	0.67

[a] mSOD: H-HCDLPCGVY-NH<sub>2</sub>, m<sup>7</sup>SOD: H-HCDLPCG-NH<sub>2</sub>.

die aus den experimentellen Daten abgeleiteten Bindungslängen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Das Cyanid-Ion koordiniert über die Dreifachbindung an das Nickel(II)-Zentrum, das insgesamt trigonal-bipyramidal umgeben ist. In einem zweiten Schritt wurde ein Wassermolekül an das aktive Zentrum koordiniert. In der daraufhin beim Optimieren erhaltenen Struktur **B** (Abbildung 3) ist das Cyanid-Ion invertiert angeordnet; diese Struktur stimmt deutlich besser mit den gemessenen REDOR-Abständen überein als die wasserlose Struktur **A** (Tabelle 1; mittlere Standardabweichung 0.67).

Weiterhin sind die Positionen des Wassermoleküls und des Cyanid-Ions in Struktur **B** ähnlich der des Chlorid-Ions in der kürzlich veröffentlichten<sup>[20]</sup> kristallographisch ermittelten Struktur einer Y9F-NiSOD-Mutante (PDB-Eintrag 1T6U). In dieser Mutante war Tyr9 gegen Phe austauscht worden, wodurch sich eine Anionenbindungsstelle öffnete, in der sich ein Halogenid-Ion (Cl<sup>−</sup> oder Br<sup>−</sup>) von oben an das Nickel(II)-Zentrum anlagern konnte, was eine ähnliche Bindungssituation wie in Struktur **B** zur Folge hat.<sup>[20]</sup>

Darüber hinaus bildet das Wassermolekül in **B** zwei Wasserstoffbrücken – eine zum Stickstoffatom des Cyanid-Ions und eine zum Cys2-Schwefelatom (siehe **C** in Abbildung 3). Weiterhin wird das Cyanid-Ion durch Wasserstoffbrücken zu den Amidprotonen von Leu5 und Cys6 stabilisiert. Daraus schließen wir auf eine das Cyanid-Ion stabilisierende Rolle des Wassermoleküls. Berücksichtigt man alle Wasserstoffbrücken, scheint das Cyanid-Ion in der Peptidumgebung fixiert zu sein. Das Wasserstoffbrückennetzwerk – vor allem mit dem Wassermolekül – würde auch das breite <sup>15</sup>N-NMR-Signal des Cyanids erklären, das wir bereits während früherer Arbeiten und nun erneut bei den Festkörper-NMR-Untersuchungen (hauptsächlich REDOR-Messungen) beobachtet haben.

Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für das Cyanid-Cu-ZnSOD-Addukt gefunden. Hier ist das Cyanid-Ion ebenfalls in ein Wasserstoffbrückennetzwerk eingebettet und direkt an das Kupfer-Ion gebunden.<sup>[13]</sup> Darüber hinaus stimmt die Position dieses Cyanid-Ions sehr präzise mit der von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im aktiven Zentrum der CuZnSOD überein, wie anhand der Kristallstruktur eines H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-CuZnSOD-Komplexes erkennbar ist.<sup>[13,15]</sup>

Bei der CuZnSOD stabilisiert das Wasserstoffbrückennetzwerk das Substrat in der Umgebung des aktiven Zentrums und unterstützt darüber hinaus den Elektronentransfer

zwischen Substrat und Metallzentrum.<sup>[14–16]</sup> Aus ihren DFT-Rechnungen schlossen Carloni et al., dass ein funktionelles Wassermolekül in der CuZnSOD als Protonenquelle für den Superoxidabbau dient.<sup>[16a]</sup> Weiterhin konnten sie zeigen, dass Superoxid in der Lage sein sollte, ein kupfergebundenes Wassermolekül aus dem aktiven Zentrum zu verdrängen. Anschließend sollte das Superoxid zu molekularem Sauerstoff oxidiert und durch ein Wassermolekül ersetzt werden.<sup>[15,16a]</sup>

Daher vermuten wir, dass das Wassermolekül, das sowohl im Wildtyp-NiSOD-Enzym als auch in der Y9F-NiSOD-Mutante nachgewiesen wurde, beim katalytischen Abbau von Superoxid durch die NiSOD und die NiSOD-aktiven Metallopeptide eine ähnlich wichtige Rolle wie bei dem durch die CuZnSOD spielt. Vermutlich liefert es, wie bereits bei der CuZnSOD gezeigt, die Protonen, die für den  $O_2^{\cdot-}$ -Abbau benötigt werden. Unsere Untersuchung hat somit deutliche Ähnlichkeiten der Katalysemechanismen der Enzyme NiSOD und CuZnSOD offenbart. Zudem ist das trotz der Unterschiede in Struktur und Cofaktoren ähnliche Verhalten der beiden Isoenzyme ein deutlicher Hinweis auf die Bedeutung des koordinierten Wassermoleküls für die biologische Funktion der Enzyme. Daher könnten unsere Befunde auch bei der Entschlüsselung der Funktionsweise anderer Superoxiddismutasen helfen.

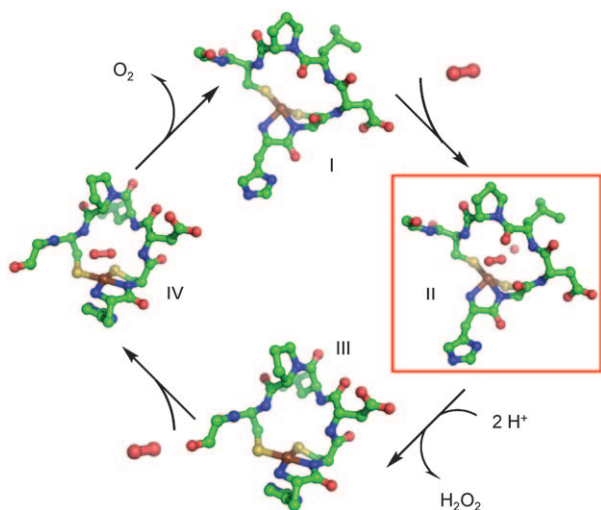
2004 postulierten Barondeau et al. einen ersten Katalysezyklus für den Superoxidabbau durch die NiSOD.<sup>[3a]</sup> In ihm koordiniert das Superoxid über der Fläche der quadratisch-planaren Koordinationssphäre im aktiven NiSOD-Zentrum, während die Imidazoleinheit der Seitenkette von His1 an der gegenüberliegenden Seite des Nickel-Ions bindet, wodurch sich ein trigonal-bipyramidal (Struktur II in Schema 2) oder ein oktaedrischer Übergangszustand (Struktur IV in

Schema 2) ergibt. Unsere experimentellen Daten bestätigen dieses Modell. Sie zeigen, dass sich das Cyanid-Ion im Cyanid-Metallopeptid-Addukt an der Stelle befindet, die von Barondeau et al. als Position für das Substrat vorgeschlagen wurde.<sup>[3a]</sup> Weiterhin bindet das Cyanid-Ion direkt an das  $Ni^{II}$ -Zentrum. Aus der Kombination unserer DFT-Berechnungen und NMR-Messungen wird deutlich, dass zumindest eines der Protonen, die zur Bildung von  $H_2O_2$  benötigt werden (II–IV, Schema 2), durch ein Wassermolekül, das sich im aktiven Zentrum befindet, zur Verfügung gestellt wird, wie der in Schema 2 formulierte Katalysezyklus illustriert.

Wir haben hier ein peptidbasiertes Modellsystem des Substrat-NiSOD-Komplexes vorgestellt, das im Wesentlichen dem relevanten Teil des natürlichen Enzyms entspricht. Die Kombination von NMR-Spektroskopie und quantenchemischen Berechnungen enthüllte erstmals die Position des Substrats in der NiSOD. Das Ergebnis stützt den von Barondeau et al.<sup>[3a]</sup> formulierten Reaktionsmechanismus mit einem direkt an das Nickel-Ion gebundenen Substrat. Darüber hinaus wurde die Rolle von Wassermolekülen in der Struktur für die Funktion des Enzyms aufgezeigt, woraus ein verbesserter Katalysezyklus für den Superoxidabbau abgeleitet wurde. Schließlich konnte auch die Art der NiSOD-Inhibierung durch Cyanid-Ionen erklärt werden: Das Cyanid-Ion koordiniert an das Nickelzentrum und blockiert so die Koordinationsstelle für das natürliche Substrat.

## Experimentelles

Die Festkörper-MAS-NMR-Messungen wurden an einem Bruker-Avance-II<sup>+</sup>-Spektrometer bei einer Protonenfrequenz von 400 MHz unter Verwendung eines 3.2-mm-HFXY-Probenkopfes und bei unterschiedlichen Rotorfrequenzen durchgeführt. Dabei wurden sowohl CP-MAS-Sequenzen als auch einzelne  $90^\circ$ -Pulse verwendet. Die  $^{13}C$ -NMR-Spektren wurden mit  $Me_4Si$  als Referenz und die  $^{15}N$ -NMR-Spektren mit  $CH_3^{15}NO_2$  als Referenz aufgenommen. Das  $^{19}F$ -NMR-Spektrum wurde mit Fluorapatit als Referenz gemessen. Für die REDOR-NMR-Messungen wurden  $^{13}C$ -,  $^{15}N$ - (98 % Anreicherung) oder  $^{19}F$ -markierte Hepta- und Nonapeptide sowie  $^{13}C$ - oder  $^{15}N$ -markiertes Cyanid (98 % Anreicherung) verwendet. Die gemessenen dipolaren Kopplungskonstanten wurden mittels eines selbstentwickelten MATLAB-Skripts in Abstände umgerechnet. Probenvorbereitung und Messungen: Alle Proben wurden aus gefriergetrocknetem Pulver hergestellt (Komplex e wurde 1:4 mit unmarkiertem Material verdünnt). Die Datenpunkte der REDOR-NMR-Messungen wurden geglättet (Komplexe a–d: Zweipunkt-FFT, Komplex e: Sechspunkt-Glättung nach dem Adjacent-Averaging-Verfahren) und mit einer der Literatur entnommenen Methode<sup>[21]</sup> modelliert. Die Lösungs-NMR-Experimente zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Peptidrückgrats wurden an einem Bruker-Avance-III-Spektrometer mit Protonenfrequenzen von 600 oder 750 MHz durchgeführt. Dazu wurde gefriergetrocknetes Cyanid-Metallopeptid-Addukt-Pulver in einem Gemisch von 10 %  $D_2O$  in  $H_2O$  (der pH-Wert wurde mit 0.1 M Natronlauge auf 7.8 eingestellt) gelöst. Die Daten wurden mit TopSpin (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen und mit XEASY<sup>[22]</sup> analysiert. Die Zuordnung der Protonensignale erfolgte mit einer Kombination von  $[^1H, ^1H]$ -DQF-COSY-,  $[^1H, ^1H]$ -TOCSY- (60 ms Spinlock-Zeit) und  $[^1H, ^1H]$ -ROESY-Experimenten. ROESY-Spektren wurden mit Mischzeiten von 100 und 120 ms aufgenommen. Zusätzlich wurde ein  $[^1H, ^{13}C]$ -HSQC-Spektrum mit natürlicher Häufigkeit der Isotope aufgenommen. Die Abstandseinschränkungen wurden einem 2D- $[^1H, ^1H]$ -ROESY-Spektrum entnommen. Obergrenzen der Ab-



**Schema 2.** Vermuteter Katalysezyklus des Superoxidabbaus in der NiSOD. Die Oxidationsstufe  $Ni^{III}$  ist am gebundenen, die Oxidationsstufe  $Ni^{II}$  am ungebundenen Histidin-Imidazolring zu erkennen. Struktur II ist die DFT-optimierte Struktur unseres Cyanid-Metallopeptid-Addukts. In ihr liegt ein funktionelles Wassermolekül im aktiven Zentrum vor (rosa Kugel), das wahrscheinlich die Protonenquelle der Reaktion ist. Die anderen Strukturen dienen nur der Verdeutlichung des Katalysezyklus.



standseinschränkungen wurden anhand ihrer Intensitäten im ROESY-Spektrum kalibriert.

Die UV/Vis-Messungen wurden auf einem Varian-Cary-5000-UV-VIS-NIR-Spektrophotometer unter Verwendung von Quarzküvetten mit einer Küvettenstärke von 1 cm durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt (der pH-Wert wurde mit 0.1M Natronlauge auf 7.8 eingestellt).

Weitere Einzelheiten zu den REDOR-Messungen, zur Aufklärung der Struktur des Cyanid-Metallopeptid-Addukts in Lösung, zu den Strukturoptimierungen und zur Peptidsynthese sowie die UV/Vis-Daten sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

Eingegangen am 11. August 2010,

veränderte Fassung am 16. November 2010

Online veröffentlicht am 25. Februar 2011

**Stichwörter:** Dichtefunktionalrechnungen · Enzymkatalyse · Festkörper-NMR-Spektroskopie · Substratbindung · Superoxiddismutasen

- [1] a) J. J. Haddad, *Cell. Signalling* **2002**, *14*, 879; b) J. M. Mates, J. M. Segura, C. Perez-Gomez, R. Rosado, L. Olalla, M. Blanca, F. M. Sanchez-Jimenez, *Blood Cells Mol. Dis.* **1999**, *25*, 103.
- [2] J. S. Valentine, D. L. Wertz, T. J. Lyons, L.-L. Liou, J. J. Goto, E. B. Gralla, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 253.
- [3] a) D. P. Barondeau, C. J. Kassmann, C. K. Bruns, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, *Biochemistry* **2004**, *43*, 8038; b) K. P. Neupane, K. Gearty, A. Francis, J. Shearer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14605; c) M. Schmidt, S. Zahn, M. Carella, O. Ohlenschläger, M. Görlach, E. Kothe, J. Weston, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2135.
- [4] a) P. A. Bryngelson, S. E. Arobo, J. L. Pinkham, D. E. Cabelli, M. J. Maroney, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 460; b) S. B. Choudhury, J. W. Lee, G. Davidson, Y. I. Yim, K. Bose, M. L. Sharma, S. O. Kang, D. E. Cabelli, M. J. Maroney, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3744; c) M. Cox, D. Nelson, A. Lehninger, *Lehninger Biochemie*, Vol. 3., Springer, Heidelberg, **2001**.
- [5] a) T. Eitinger, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 7821; b) A. Schmidt, G. Haferburg, E. Kothe, *J. Basic Microbiol.* **2007**, *47*, 56; c) H. D. Youn, E. J. Kim, J. H. Roe, Y. C. Hah, S. O. Kang, *Biochem. J.* **1996**, *318*, 889.
- [6] J. Wuerges, J. W. Lee, Y. I. Yim, H. S. Yim, S. O. Kang, K. D. Carugo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8569.
- [7] a) A. T. Fiedler, P. A. Bryngelson, M. J. Maroney, T. C. Brunold, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5449; b) T. A. Jackson, T. C. Brunold, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 461; c) J. Wuerges, J. W. Lee, S. O. Kang, K. D. Carugo, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2002**, *58*, 1220.
- [8] a) K. P. Neupane, J. Shearer, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 10552; b) M. Schmidt, Friedrich-Schiller-Universität Jena, **2007**; c) J. Shearer, A. Dehestani, F. Abanda, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 2649; d) J. Shearer, L. M. Long, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 2358; e) J. Shearer, N. F. Zhao, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 9637.
- [9] D. Tietze, H. Breitzke, D. Imhof, E. Kothe, J. Weston, G. Buntkowsky, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 517.
- [10] G. Rotilio, A. Finazzia, L. Calabres, F. Bossa, P. Guerrier, B. Mondovi, *Biochemistry* **1971**, *10*, 616.
- [11] a) J. A. Fee, J. Peisach, W. B. Mims, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 1910; b) G. Rotilio, B. Mondovi, L. Morpurgo, L. Calabres, C. Giovagno, *Biochemistry* **1972**, *11*, 2187; c) H. L. Van Camp, R. H. Sands, J. A. Fee, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1982**, *704*, 75.
- [12] J. Han, N. J. Blackburn, T. M. Loehr, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 3223.
- [13] K. D. Carugo, A. Battistoni, M. T. Carri, F. Polticelli, A. Desideri, G. Rotilio, A. Coda, M. Bolognesi, *FEBS Lett.* **1994**, *349*, 93.
- [14] J. A. Tainer, E. D. Getzoff, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Nature* **1983**, *306*, 284.
- [15] D. S. Shin, M. DiDonato, D. P. Barondeau, G. L. Hura, C. Hitomi, J. A. Berglund, E. D. Getzoff, S. C. Cary, J. A. Tainer, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 1534.
- [16] a) P. Carloni, P. E. Bloechl, M. Parrinello, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 1338; b) M. Rosi, A. Sgamellotti, F. Tarantelli, I. Bertini, C. Luchinat, *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 1005.
- [17] a) T. Gullion, *Concepts Magn. Reson.* **1998**, *10*, 277; b) T. Gullion, J. Schaefer, *J. Magn. Reson.* **1989**, *81*, 196; c) D. D. Laws, H. M. L. Bitter, A. Jerschow, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3224; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3096.
- [18] T. Emmler, I. Ayala, D. Silverman, S. Hafner, A. S. Galstyan, E. W. Knapp, G. Buntkowsky, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2008**, *34*, 6.
- [19] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [20] R. W. Herbst, A. Guce, P. A. Bryngelson, K. A. Higgins, K. C. Ryan, D. E. Cabelli, S. C. Garman, M. J. Maroney, *Biochemistry* **2009**, *48*, 3354.
- [21] K. T. Mueller, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1995**, *113*, 81.
- [22] C. Bartels, T. H. Xia, M. Billeter, P. Guntert, K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 1.