

# Skriptum zu **AC-9 Bioanorganische Chemie** (Sundermeyer)

## Homogene Katalyse durch Metallkomplexe Teil II: Enzymatische Katalyse (ausgewählte Kapitel, 1 SWS)

### empfohlene Literatur:

S.J. Lippard, J.M. Berg: *Bioanorganische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1995.

W. Kaim, B. Schwerderski, *Bioanorganische Chemie*, Teubner, Stuttgart 1991.

### Gliederung:

#### 1. Einführung in die Bioanorganische Chemie

- 1.1 Die wichtigsten biologischen Funktionen essentieller Metallionen
  - 1.1.1 Sauerstoff-Transport
  - 1.1.2 Elektronenübertragung (anorganische und organische Elektronen-Reservoirs)
  - 1.1.3 Strukturgebung in Proteinen
  - 1.1.4 Hydrolytische Enzyme (Hydrolasen)
  - 1.1.5 Zwei- und Mehr-Elektronen-Redoxenzyme (Oxidasen, Dehydrogenasen)
  - 1.1.6 Umlagerungen (Isomerasen)
- 1.2 Die wichtigsten Liganden / metallbindende Biomoleküle
  - 1.2.1 Proteine als Liganden
  - 1.2.2 Nucleinsäuren als Liganden
  - 1.2.3 Prosthetische Gruppen, Bleomycin und Siderophore

#### 2. Protonentransfer-Reaktionen (Protolysen, Hydrolysen)

- 2.1 Carboxypeptidase (Zn)
- 2.2 Alkalische Phosphatase (Zn)
- 2.3 Carboanhydratase (Zn)

#### 3. Elektronentransfer-Reaktionen (Redoxreaktionen)

- 3.1 Alkohol-Dehydrogenase (Zn)
- 3.2 Hämoglobin Hb und Myoglobin Mb (Fe)
- 3.3 Hämerythrin (Fe)
- 3.4 Hämocyanin Hc und Azurin (Cu)
- 3.5 Tyrosinase (Cu)
- 3.6 Cytochrom P450 (Fe)
- 3.7 Xanthin-Oxidase (Mo)
- 3.8 Sulfit-Oxidase (Mo)
- 3.9 Vitamin B<sub>12</sub> (Co)
- 3.10 Bromperoxidase (V)

# 1. Einführung in die Bioanorganische Chemie

## 1.1 Die wichtigsten biologischen Funktionen essentieller Metallionen

Metalloproteine mit katalytischen Funktionen nennt man Metalloenzyme.

Die folgende Tabelle bietet eine Übersicht über die biologischen Funktionen der wichtigsten essentiellen Metallionen in der belebten Natur: Alkali-, Erdalkali-, 3d-Metalle + Mo,W

**Tabelle 1.1:** Biologische Funktion ausgewählter Metall-Ionen

Metall	Funktion, beteiligte Enzyme
Natrium	Ladungsträger; osmotisches Gleichgewicht
Kalium	Ladungsträger; osmotisches Gleichgewicht
Magnesium	Struktur; Hydrolase; Isomerase
Calcium	Struktur; Signalübertragung; Ladungsträger
Vanadium	Stickstoff-Fixierung; Oxidase
Chrom	unbekannt, mögliche Bedeutung bei der Glucosetoleranz
Molybdän	Stickstoff-Fixierung; Oxidase; Oxo-Transfer
Wolfram	Dehydrogenase
Mangan	Photosynthese; Oxidase; Struktur
Eisen	Oxidase; Sauerstofftransport und -speicherung; Elektronenübertragung; Stickstoff-Fixierung
Cobalt	Oxidase; Alkylgruppenübertragung
Nickel	Hydrogenase; Hydrolase
Kupfer	Oxidase; Sauerstoff-Transport; Elektronenübertragung
Zink	Struktur; Hydrolase

### 1.1.1 Sauerstoff-Transport:

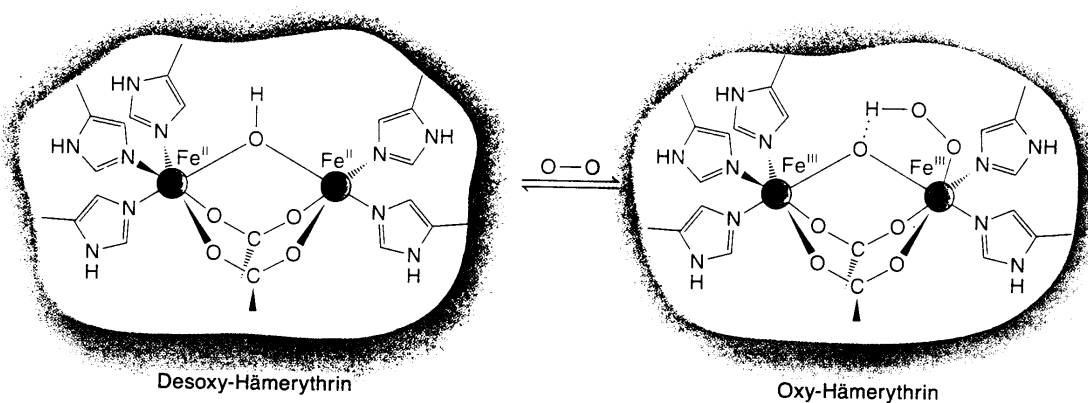
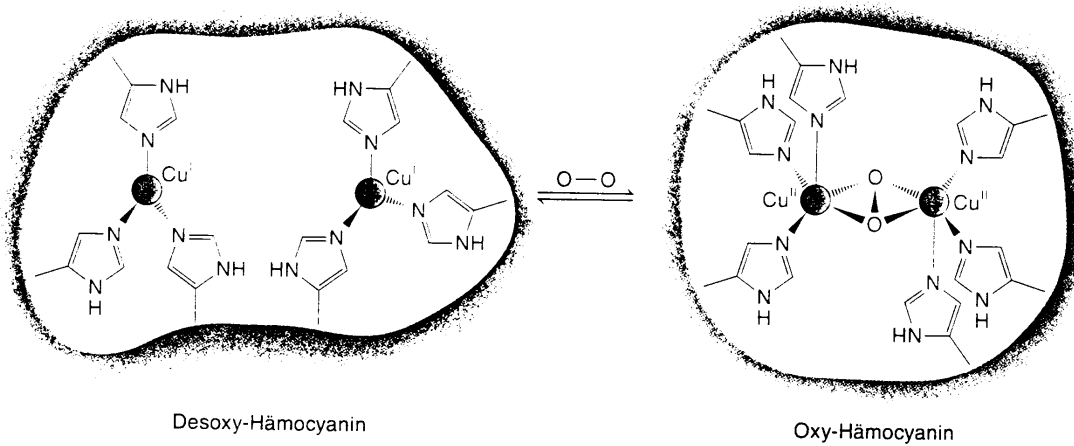
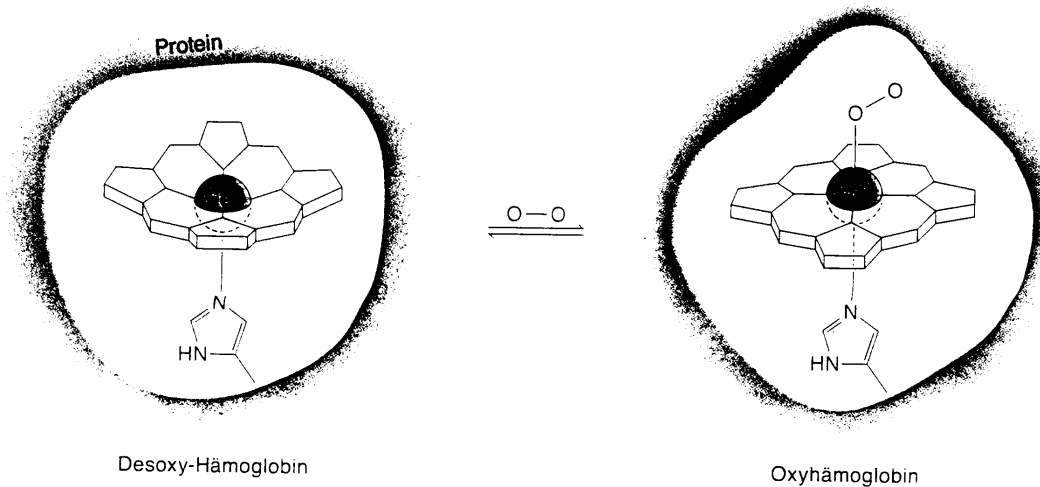
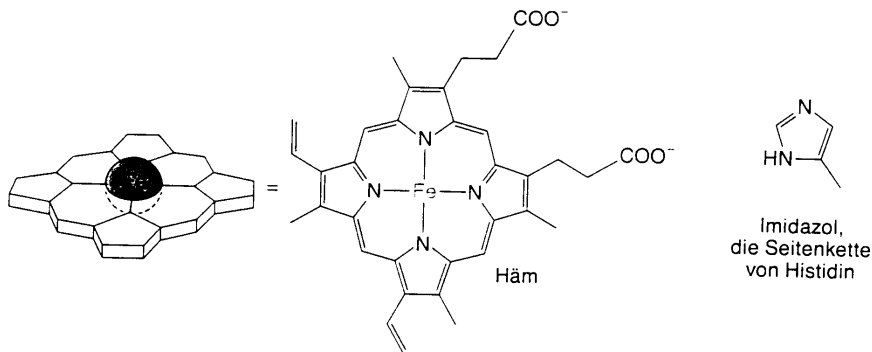
Eine Funktion, an der fast ausschließlich Metalloproteine beteiligt sind, ist die Atmung. Man kennt drei Klassen von Sauerstoff-Transportproteinen:

**A Hämoglobin (Hb) - Myoglobin (Mb)-Familie:** Fe → rote Blutkörperchen

**B Hämocyanine (Hc):** Cu → Mollusken und Anthropoden (z.B. Spinnen, Langusten)

**C Hämerithrine (Hr):** Fe → wirbellose marine Individuen

In A-C empfindliches Gleichgewicht der  $O_2$  Bindung an die reduzierte Desoxy-Form des Enzyms, Elektronentransfer zum Hyperoxid  $O_2^{\bullet-}$  bzw. Peroxid  $O_2^{2-}$  / Hydroperoxid  $HOO^-$ , ohne dass es zu einem irreversiblen Elektronentransfer kommt (Spaltung der O-O-Bindung).



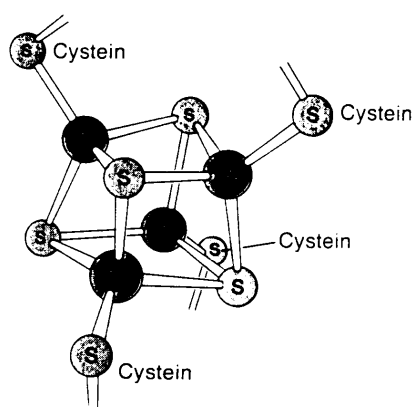
## 1.1.2 Elektronenübertragung:

Für die Katalyse der wichtigsten biologischen Redoxreaktionen tauschen anorganische und organische Elektronen-Reservoirs in den Enzymen ihre Ladungen (Elektronen, Protonen, Hydroxidionen) aus.

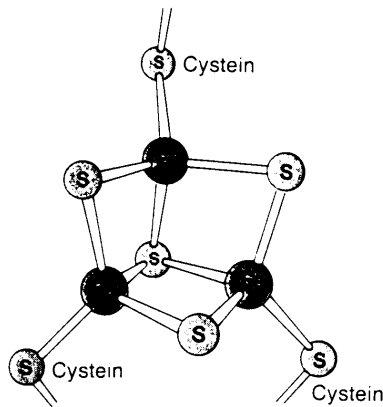
### Die zwei wichtigsten anorganischen Elektronen-Reservoirs:

#### A Eisen-Schwefel-Cluster aus Sulfidionen $S^{2-}$ und Cysteinat $RS^-$

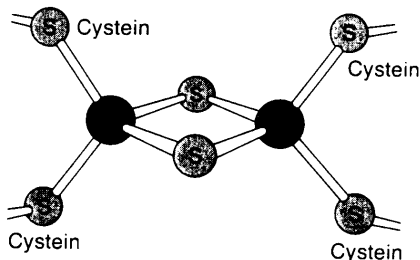
Typische Proteine und mögliche Cluster-Gesamtladung ( $Fe^{2+}/3+$ ):



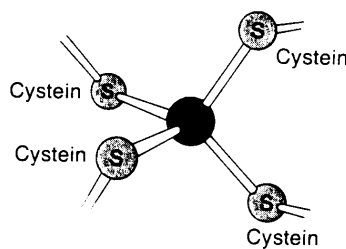
4Fe-Cluster  
Ferredoxin  
3-, 2-, 1-



3Fe-Cluster  
Aconitase  
3-, 2-



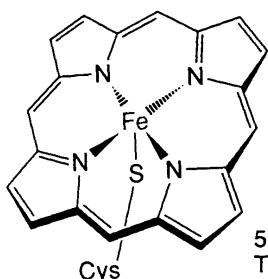
2Fe-Cluster  
Ferredoxin  
4-, 3-, 2-



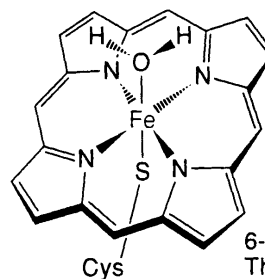
1Fe  
Rubredoxin  
2-, 1-

#### B Cytochrome

Die Hämgruppe im wichtigsten Vertreter, Cytochrom P450, kann in vier verschiedenen Zuständen vorliegen: Jeweils high-spin- und low-spin-Formen von  $Fe(II)$  und  $Fe(III)$ . Weiterhin ist der vierzählige Porphyrinligand  $Por^{2-}$  redoxaktiv; in der Koordinationssphäre des höhervalenten Eisens wird er leicht zum Radiakalanion  $Por^{\bullet-}$  oxidiert (L→M-Charge-Transfer)



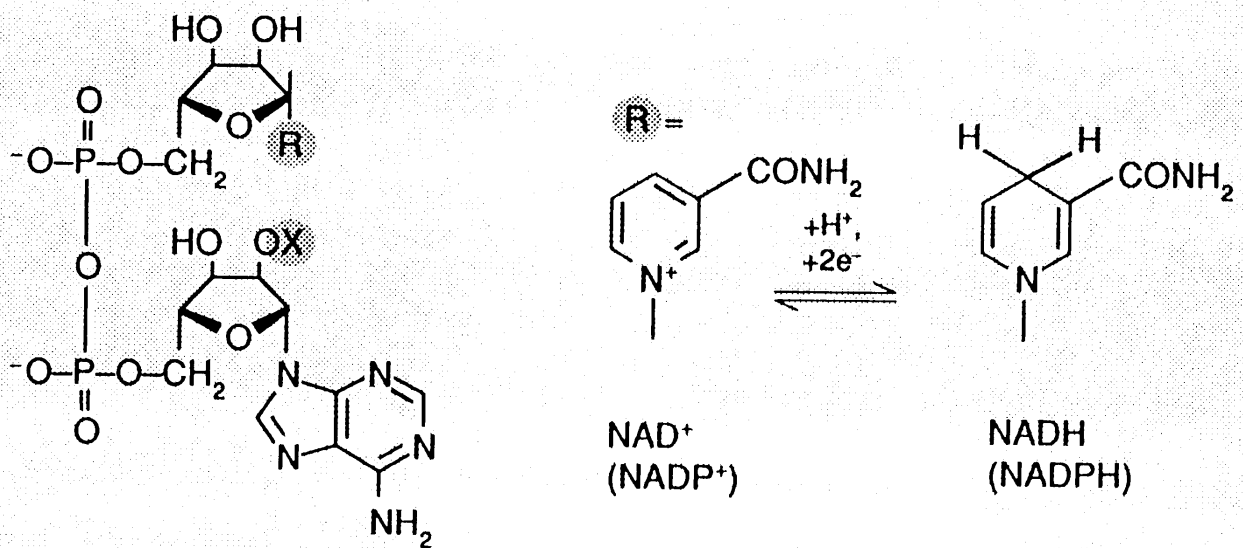
5-fach koordiniertes  $Fe(III)$ -Porphyrin-Thiolat, High-Spin-Eisen(III)



6-fach koordiniertes  $Fe(III)$ -Porphyrin-Thiolat, Low-Spin-Eisen(III)

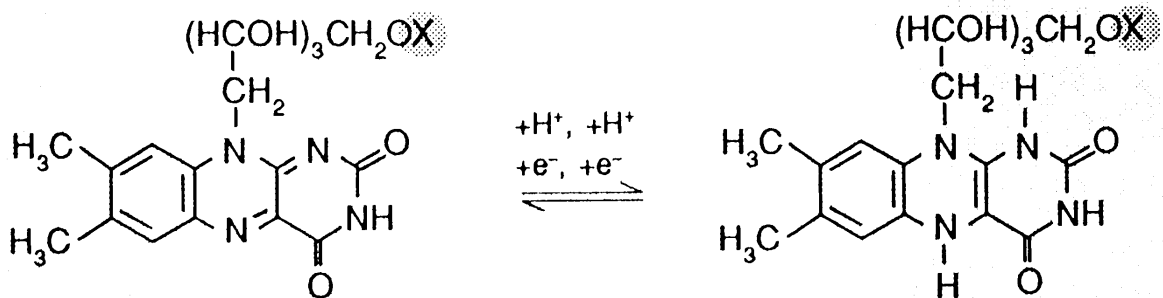
## Wichtige organischen Redox-Coenzyme: (Cofaktoren)

### A N-Heterocyclen (Nicotinsäureamid-Derivate und Flavine)



X = H: Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid (NAD<sup>+</sup>)

X = PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>: Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid-phosphat (NADP<sup>+</sup>)



X = H: Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>, vgl. 2.2)

X = PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>: FMN (Flavinmononukleotid)

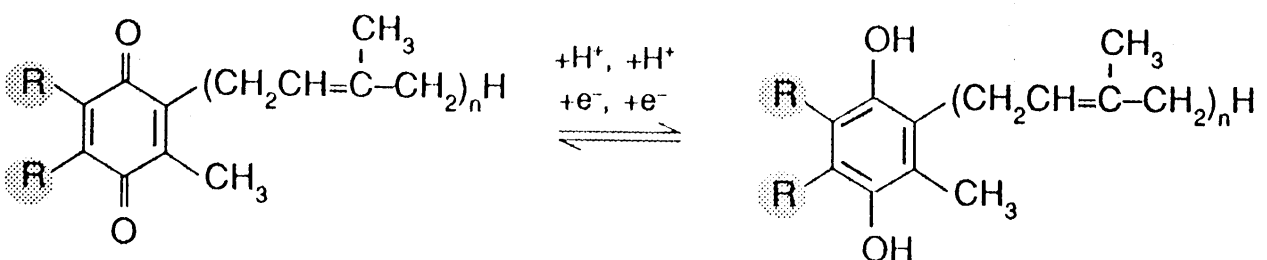
X = Adenosindiphosphat: FAD (Flavinadenindinukleotid)

5,10-Dihydroriboflavin

(FMNH<sub>2</sub>)

(FADH<sub>2</sub>)

### B Chinoide Systeme (Vitamin C, Vitamin K-Gruppe)



2 R = (CH)<sub>2</sub>, n = 9:

R = OCH<sub>3</sub>, n = 2-10:

R = CH<sub>3</sub>, n = 6-10:

R = H, n = 4-7:

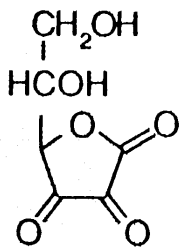
Menachinon (Q<sub>a</sub>)

Ubichinone (Q<sub>b</sub>)

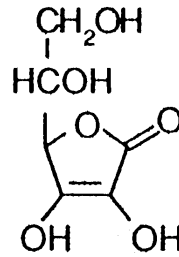
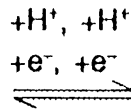
Plastochinone (PQ)

Vitamin K-Gruppe

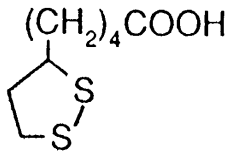
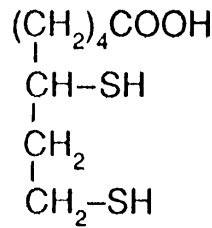
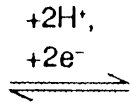
Hydrochinon-Form



Dehydroascorbinsäure



Ascorbinsäure (Vitamin C)

C Disulfide (Liponsäure)Liponsäure  
(zyklisches Disulfid)

(Dithiol-Form)

**1.1.3 Strukturgebung in Proteinen**

Insbesondere die Metallionen  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  sind für die Faltung und Querverknüpfung vieler Biopolymere (Proteine und Nucleinsäuren) verantwortlich, somit für deren Tertiärstruktur und Funktion.

Beispiel: Zwei Thiolatgruppen des Cysteins und zwei Imidazolreste des Histidins in der sogenannten Zinkfinger-Domäne nucleinsäurebindender und genregulierender Proteine binden Zink (z.B. im Transkriptionsfaktor TFIIIA). Dieses zinkhaltige Protein bindet an eine Sequenz von ca. 45 Nucleinbasenpaaren und schützt diese vor dem Abbau durch die Nuclease. Die Entfernung von Zink durch EDTA führt zum Verlust dieser spezifischen Bindungswirkung.

Basen der Biomoleküle (Phosphat, Carboxylat, Nucleobasen) können entweder Aqualiganden an o.g. Metallionen verdrängen oder aber über Wasserstoffbrücken mit Aqualiganden fixiert werden.  $\text{Ca-OH}_2 \dots \text{N}(\text{Base})$

**1.1.4 Hydrolytische Enzyme (Hydrolasen)**

Insbesondere die Metallionen  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  sind in der Lage, die  $\text{pK}_a$  Werte koordinierter OH- bzw. NH-acider Liganden drastisch abzusenken, z.B. von Wasser  $\text{pK}_a$  14 (frei) auf  $\text{pK}_a$  7 (mittelstarke Säure in  $\text{His}_3\text{Zn}^{2+}\text{-OH}_2$ ). → Anwendungen in der Biologie:

**Carboanhydratase** (Hydratisierung von  $\text{CO}_2$ )

**Peptidasen / Esterasen** (Hydrolyse von Carbonsäurederivaten)

**Phosphatasen** (Hydrolyse von Phosphorsäureestern)

### 1.1.5 Zwei- und Mehr-Elektronen-Redoxenzyme (Oxidasen, Dehydrogenasen)

#### Zwei-Elektronen-Oxidationen:

**Cytochrom P450** (Häm-Fe, Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffen zu Alkoholen)

**Tyrosinase** (2 Cu, ortho-Hydroxylierung phenolischer Substrate)

**Sulfit-Oxidase** (Mo, Sulfit zu Sulfat)

**Alkohol-Dehydrogenase** (Zn + Cofaktor NAD<sup>+</sup>, Acetaldehyd aus Ethanol)

#### Zwei-Elektronen-Reduktionen:

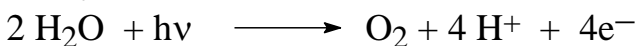
**Ribonucleotid-Reduktase "RR"** (2 Fe, Tyrosylradikal, Ribonucleotide werden durch RR zu Desoxyribonucleotiden, den Bausteinen der DNA reduziert, s.u. 1.2.2)

**Nitrat-Reduktase** (Mo, Nitrat zu Nitrit)

**Hydrogenasen** (Ni + Fe-S-Cluster, Hydrierungen in der Biologie)

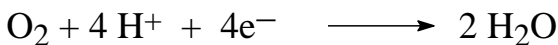
#### Vier-Elektronen-Oxidation:

**Oxygen-evolving complex "OEC" des Photosystems II** der Photosynthese (4 Mn Zentren katalysieren die Oxidation von H<sub>2</sub>O zu O<sub>2</sub>, wobei Lichtabsorption die Energie liefert).



#### Vier-Elektronen-Reduktion:

**Cytochrom-c-Oxidase** (2 Cu + 2 Häm-Fe Zentren katalysieren die Reduktion von O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O)



Elektrochemische Energie (Protonengradient über die Zellmembran) wird in chemische Energie umgewandelt, indem der Protonengradient die Phosphorylierung von ADP zu ATP antreibt).

#### Sechs-Elektronen-Reduktionen:

**Nitrogenase** (Mo-Fe-S Cluster + Fe-S-Cluster, N<sub>2</sub> zu 2 NH<sub>3</sub>)

**Nitrit-Reduktase** (Häm-Fe + Fe-S-Cluster, Nitrit zu NH<sub>3</sub>)

**Sulfit-Reduktase** (Häm-Fe + Fe-S-Cluster, Sulfit zu H<sub>2</sub>S)

### 1.1.6 Umlagerungen (Isomerasen)

Bei vielen biologischen Umsetzungen ändert sich der Oxidationszustand des Substrates insgesamt nicht, so etwa bei 1,2-Kohlenstoffumlagerungen.

**Vitamin B<sub>12</sub>**, ein Alkylcobalt(III)-Corrin-Komplex ist der am besten untersuchte metallorganische Katalysator in der Biologie. Durch Homolyse der Co-C-Bindung entstehen organische Radikale, die Radikalumlagerungen an Substraten einleiten.

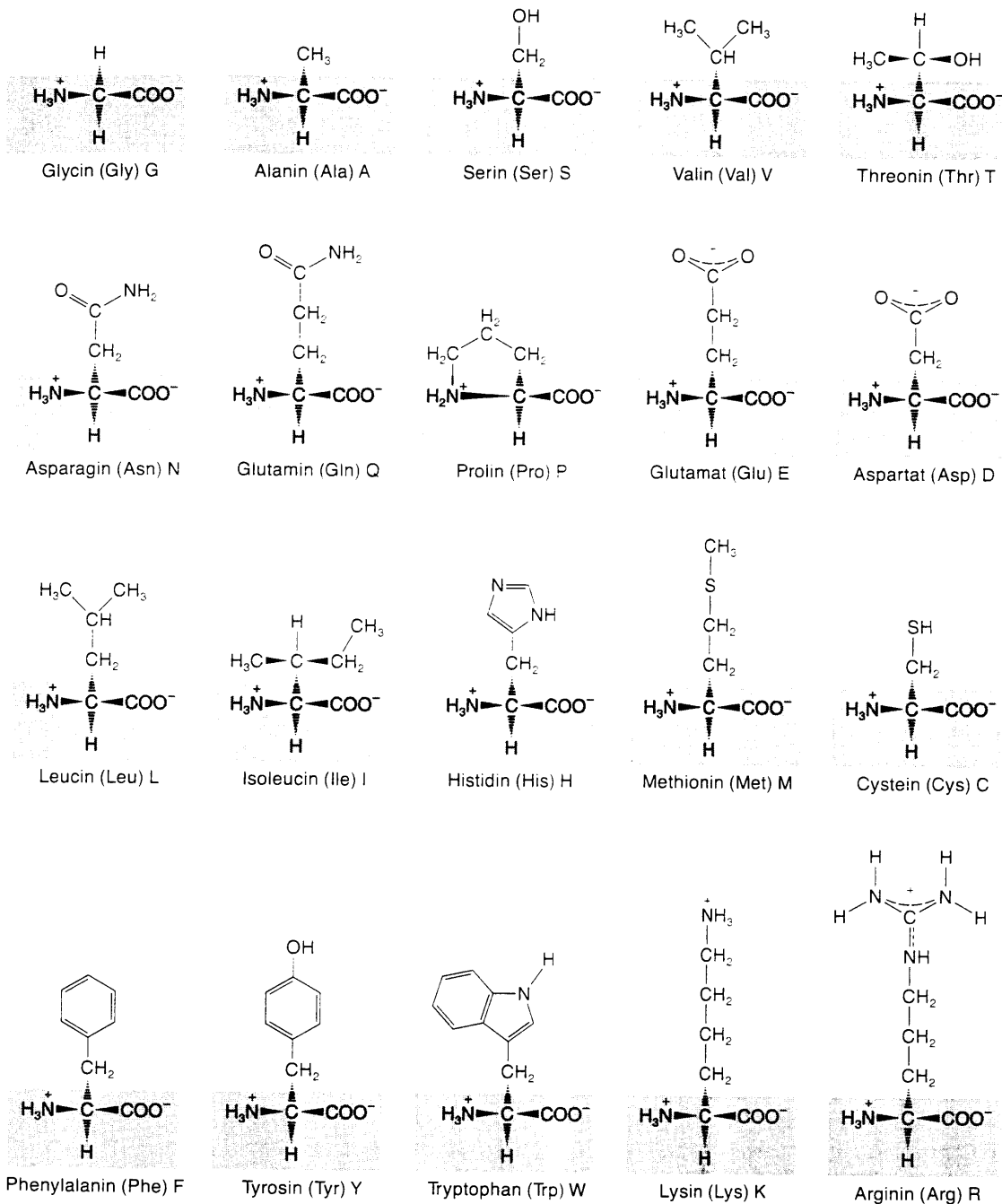
## 1.2 Die wichtigsten Liganden / metallbindende Biomoleküle

### 1.2.1 Proteine als Liganden

**Primärstruktur:**  $\alpha$ -Aminosäuren werden über Peptidbindungen in trans-Konfiguration zur Sequenz (gezählt vom N-Terminus zum C-Terminus im Drei- oder Einbuchstabencode, s.u.) verknüpft. Die Seitenketten der 20 natürlichen, S-konfigurierten L-Aminosäuren enthalten Ligandfunktionen, an denen Metalle koordinieren (M ersetzt Proton oder koord. an El.paar).

**Sekundärstruktur:** Intramolekulare H-Brücken innerhalb eines Stranges des Polypeptids führen zur rechtsgängigen  $\alpha$ -Helix, H-Brücken zwischen zwei Strängen führen zum antiparallelen oder parallelen  $\beta$ -Faltblatt.

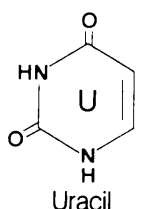
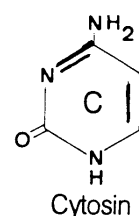
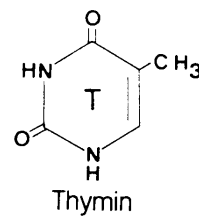
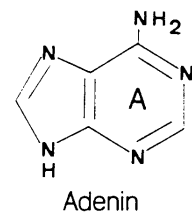
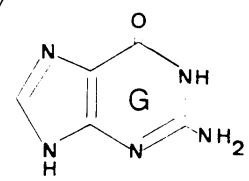
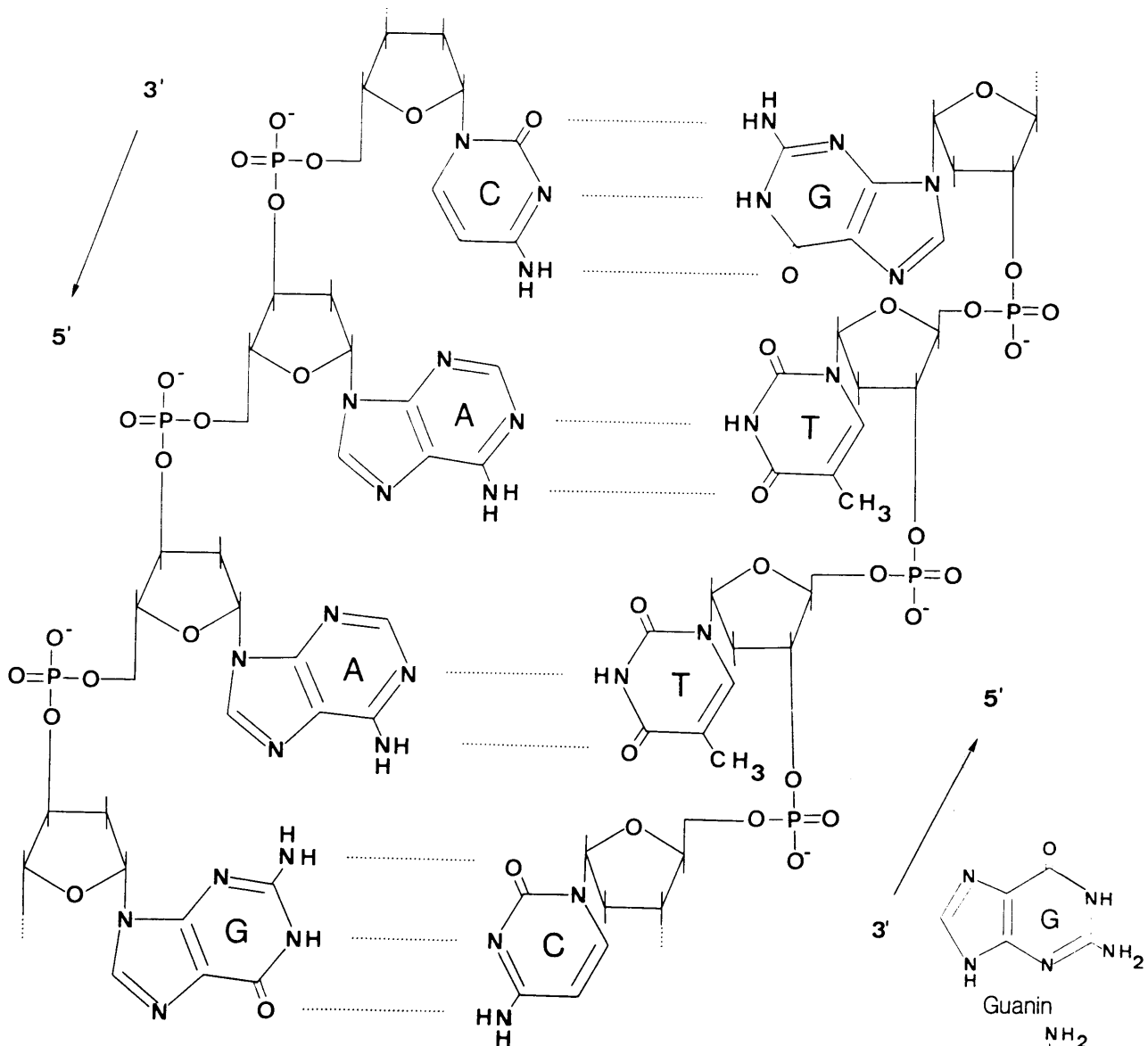
**Tertiärstruktur:** Bestimmt durch kovalente WW (Disulfidbrücken), koordinative WW (Metallionen) und hydrophobe WW (Aneinanderlagerung hydrophober Oberflächen im Inneren des Proteins um WW mit polarem Lösungsmittel Wasser zu vermeiden) und ionische WW (Anionrezeptor Guanidin des Arginins bindet Carboxylat der Asparaginsäure).





## 1.2.2 Nucleinsäuren als Liganden

Nucleinsäuren sind Biopolymere aus Ribonucleotiden (RNA) bzw. Desoxyribonucleotiden (DNA). Das polymere Rückgrat bildet sich durch 3',5'-Verknüpfung zweier Zucker (Ribose) über eine Phosphat-, genauer gesagt eine Phosphorsäurediester-Brücke. An jedem Zucker ist über glycosidische Bindungen eine der fünf N-gebundenen Nucleotidbasen (2 Purine, 3 Pyrimidine) befestigt, die wiederum mit einem antiparallelen Strang über spezifische H-Brücken zur Doppelhelix verknüpft sind (Basensequenz und -paarung nach Watson-Crick, AT, GC).



Basen der DNA

Basen der RNA

Def. Nucleosid: Einheit aus Zucker + Base

Def. Nucleotid: Einheit aus Nucleosid + zusätzlich Phosphatgruppen am 3' oder 5' Ende; z.B. ATP

Unterschied DNA (abgebildet) und RNA:

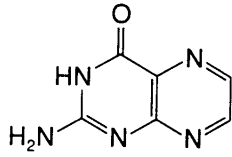
Methylgruppe im Thymin fehlt im Uracil (RNA)

C<sub>2</sub>'-H Funktion in DNA ist durch C<sub>2</sub>'-OH Funktion in RNA ersetzt.

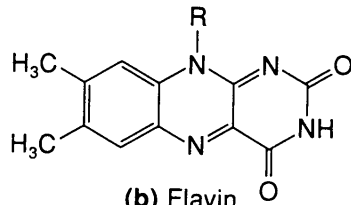
### 1.2.3 Prosthetische Gruppen, Bleomycin und Siderophore

Viele Metalloproteine enthalten neben dem Polypeptid selbst weitere metallbindende Ligandfunktionen, die man **prosthetische Gruppen** nennt. Beispiele sind der

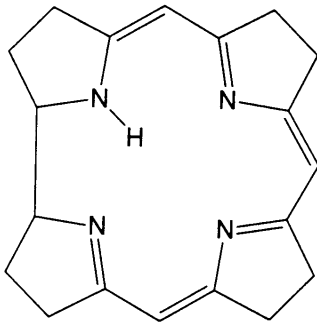
- Corrin-Ligand Cor(1-) im Cobalamin, der
- Porphyrin-Ligand Por(2-) der Häm-Gruppe und als Dihydroform im Chlorophyll, der
- Pterin-Ligand in den meisten Molybdoenzymen und der
- Flavin-Ligand, z.B. als Flavosemichinon an Zink gebunden.



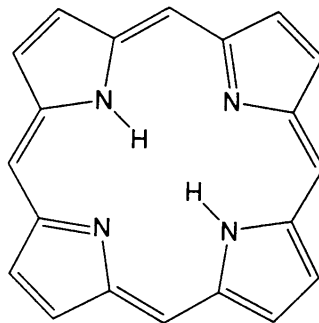
(a) Pterin



(b) Flavin



(c) Corrin

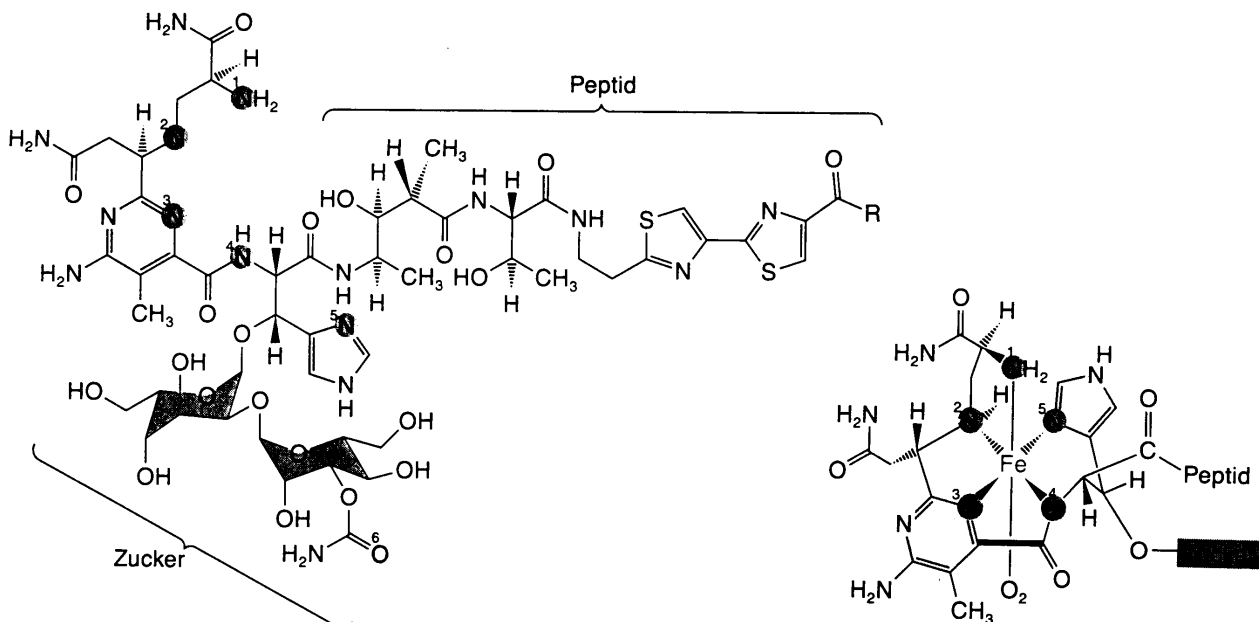


(d) Porphyrin

**Bleomycin** ist ein gegen Tumore wirksames Antibiotikum, d.h. ein von Pilzen synthetisiertes Glycoprotein. Es besitzt

- eine Metall-bindende Polypeptid-Einheit (N<sub>5</sub>)
- eine DNA-bindende und DNA-spaltende Wirkung, die im Zusammenhang mit der Sauerstoff-Redoxchemie des Eisens steht (Bildung reaktiver Radikale).

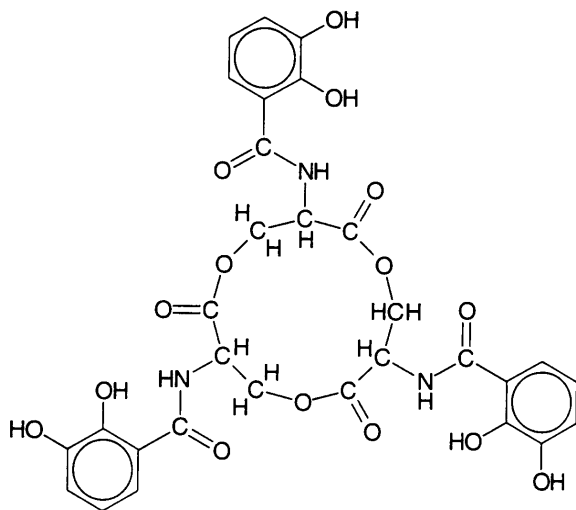
Der Ligand und ein postulierter Komplex mit Eisen / O<sub>2</sub>:



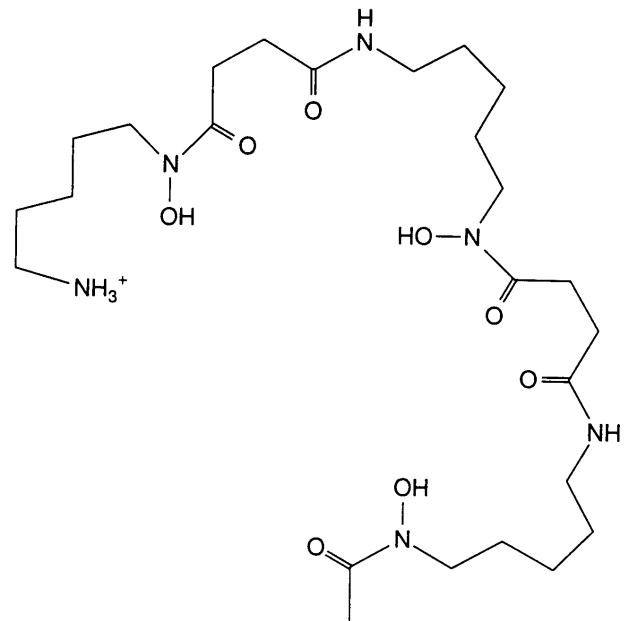
**Siderophore** sind kleine, von Mikroorganismen synthetisierte Chelatliganden, die spezifisch und mit sehr hoher Komplexbildungskonstanten  $K_f$  Eisen(III) binden, die Eisen(III) in eine lösliche Transportform überführen und im Inneren der Zelle das Eisen wieder freisetzen. Gespeichert wird das Eisen im **Ferritin**, ein Protein, das in seinem hohlen Gerüst bis zu 4500 Fe(III)-Ionen als  $\mu$ -Oxo(hydroxo)-Cluster binden kann.

Die zwei wichtigsten Siderophore sind das

- **Enterobactin "ent" (6-)**, ein cyclisches Trilacton mit drei chelatisierenden Catecholat-Funktionen:  $K_f = [\text{Fe}(\text{ent})^{3-}] / [\text{Fe}^{3+}][\text{ent}^{6-}] = 10^{49}$ ,  $K_{\text{dis}} = 10^{-25}$  bei pH 7.
- **Desferri oxamin (3-)**, ein Podant mit drei chelatisierenden Hydroxamsäure-Funktionen



(a) Enterobactin



(b) Desferrioxamin

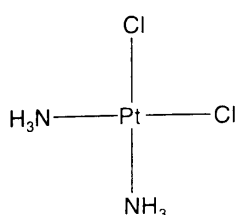
In der Biologie werden Metallionen weiterhin an

- Fette und Kohlenhydrate gebunden sowie an
- rein anorganische Anionen: Oxid, Hydroxid, Sulfid, Hydrogensulfid, Disulfid, Phosphat, Diphosphat, Sulfat, Chlorid.

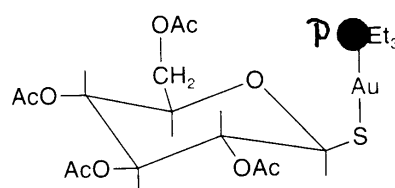
**Metalle in der Medizin** werden auch über nicht-natürliche Liganden gebunden.

Die wichtigsten **Metallopharmaka** sind

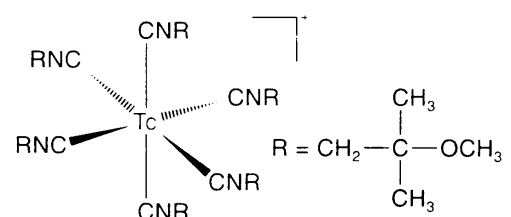
- **Cis-Platin**: Löslich + membrangängig in der hydrolysierten Form  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ , Koordination an Nucleinbasen der DNA setzt Replikation aus.
- **Auranofin**: Tetra-O-acetylthioglucose-Ligand vermittelt Löslichkeit bei oraler Anwendung.
- **wasserlöslicher Isonitrilkomplex des Radioisotops  $^{99\text{m}}\text{Tc}$** , der selektiv vom Herzmuskelgewebe aufgenommen wird (Radiochemisches Imaging).



Cisplatin, ein Krebsmedikament



Auranofin, ein oral verabreichtes Mittel gegen rheumatoide Arthritis

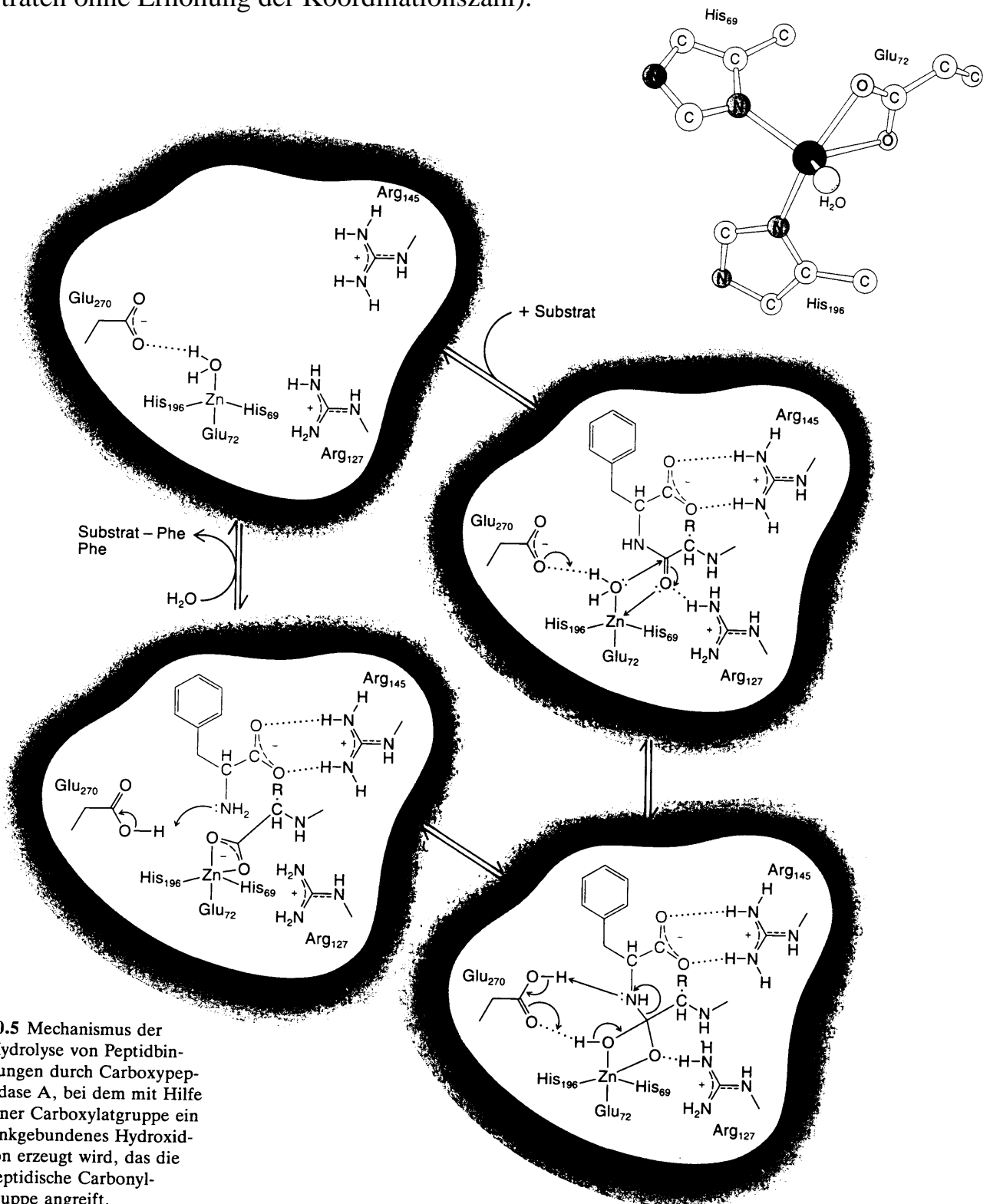


Cardiolyt, ein Mittel für bildgebende Untersuchungen am Herzen

## 2. Protonentransfer-Reaktionen (Protolysen, Hydrolysen)

### 2.1 Carboxypeptidase (Zn)

- **Vorkommen:** Carboxypeptidase A<sub>α</sub> mit 307 Aminosäureresten aus Rinderpankreas.
- **Aufgabe:** Gezielte Hydrolyse der C-terminalen Peptidbindung: Die Hydrolyse von Peptiden in Wasser ist thermodynamisch begünstigt, jedoch kinetisch stark inhibiert.
- **Aktives Zentrum:** Zn<sup>2+</sup> 5-fach koordiniert durch 2 Imidazolreste von His-69 und His-196, einen Aqualiganden (Nucleophil) sowie durch eine zweizählige hemilabile Carboxylatgruppe von Glu-72 ("Carboxylat-Shift"  $\eta^2 \rightarrow \eta^1$  ermöglicht die Koordination von Substraten ohne Erhöhung der Koordinationszahl).



10.5 Mechanismus der Hydrolyse von Peptidbindungen durch Carboxypeptidase A, bei dem mit Hilfe einer Carboxylatgruppe ein zinkgebundenes Hydroxid-Ion erzeugt wird, das die peptidische Carbonylgruppe angreift.

**Mechanistisch-katalytisches Prinzip:** Die C-terminale Peptidbindung einer Polypeptidkette bindet über das Peptid-O-Atom an das aktive Zentrum, wobei sich die Aminosäure durch WW der terminalen Carboxylatgruppe mit dem Anion-Rezeptor Arg-145 (Guanidiniumkation) ausrichtet.

Erhöhung der Elektrophilie des Peptid-C-Atoms durch O-Koordination an  $Zn^{2+}$  und durch zusätzliche Quasi-Protonierung durch Arg-127 (H-Brücke).

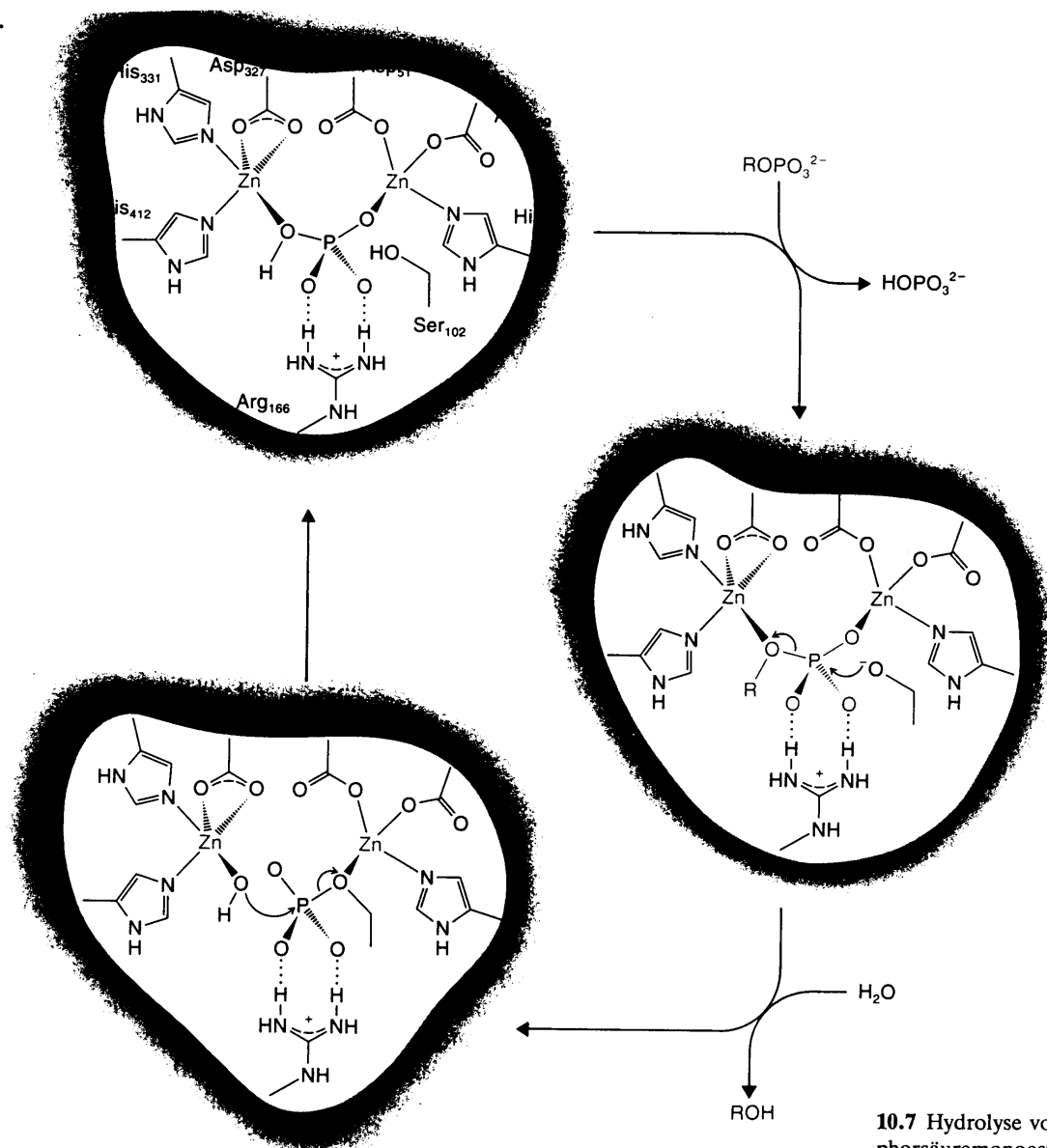
Erhöhung der Nucleophilie des Aqualiganden durch Quasi-Deprotonierung durch Carboxylatgruppe des Glu-270.

Stabilisierung der tetraedrigen Zwischenstufe nach Angriff des äußerst nucleophilen Zn-Hydroxidliganden auf die Peptidbindung durch Wasserstoffbrücken zu Glu-270.

Protonierung / Deprotonierung über Glu-270 begünstigt den Zerfall des tetraedr. ZP zur Aminosäure und zum Carboxylat-Komplex, der anschließend zum Aquakomplex hydrolysiert.

## 2.2 Alkalische Phosphatase (Zn)

- **Aufgabe:** Gezielte Hydrolyse der terminalen Phosphatgruppe von Phosphorsäure-Monoestern.



10.7 Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern durch Alkalische Phosphatase.

- **Aktives Zentrum:** Zwei Lewis-acide  $Zn^{2+}$  in kooperativer Nachbarschaft, asymmetrisch koordiniert durch 3 Imidazolreste von His und drei Carboxylatgruppen von Asp und Aqualiganden (Nucleophil).
- **Mechanistisch-katalytisches Prinzip:** Das Monophosphat wird als Brückenligand zwischen zwei  $Zn^{2+}$  Zentren für den nucleophilen Angriff aktiviert. Wie bei der Carboxypeptidase dient auch hier die Guanidinium-Funktion eines Arginins zur Positionierung der Phosphatgruppe (Anionenrezeptor) und zur Steigerung der P-Elektrophilie.

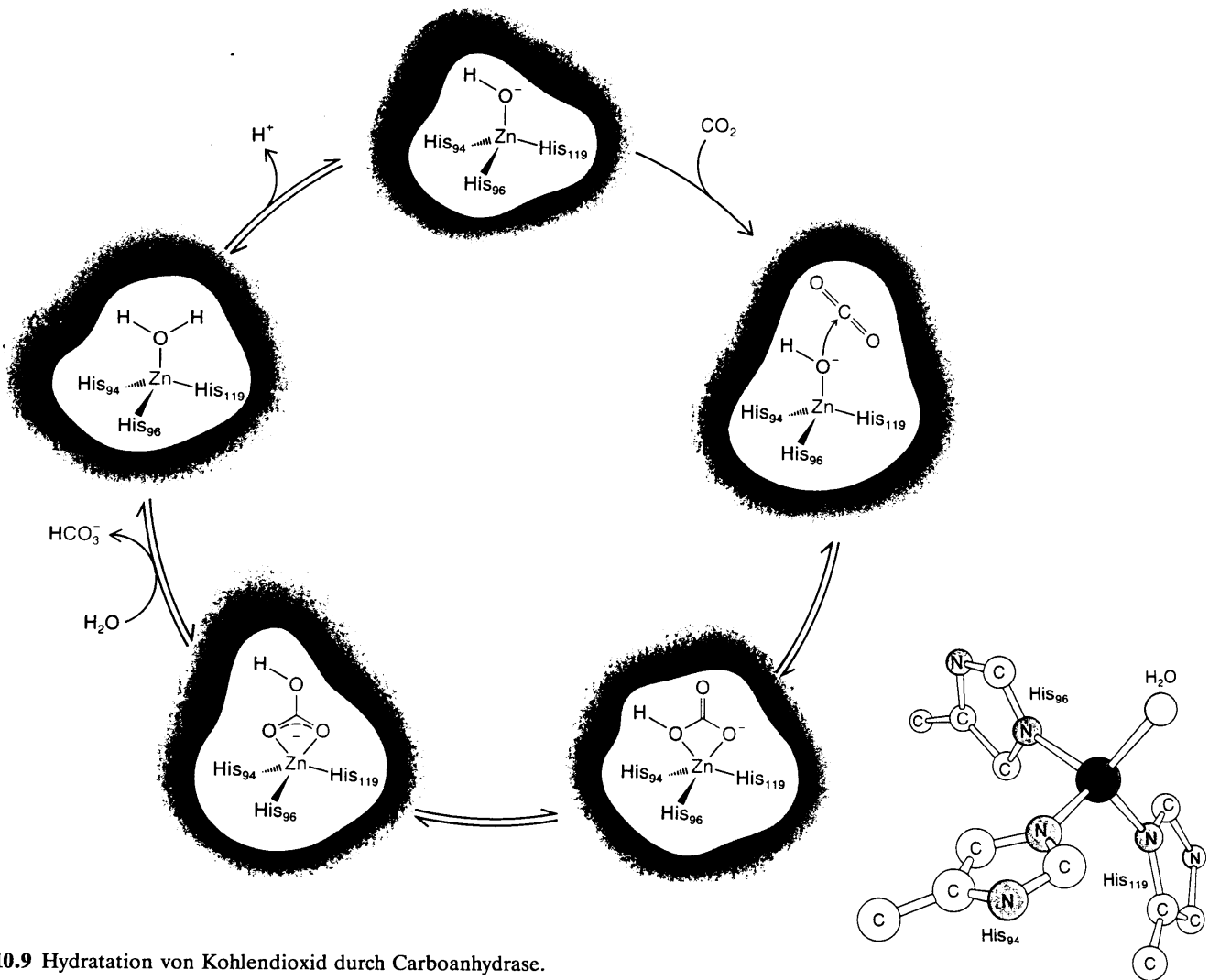
Im ersten Schritt wird  $O_3P-OR$  zunächst durch die Alkoholfunktion des günstig positionierten Ser-102 umgeestert, der gebildete Zn-Alkoxid-Komplex  $Zn-OR$  hydrolysiert zum nucleophilen Hydroxid-Komplex, der dann im zweiten Schritt das enzymgebundene Phosphorylserinat zum Hydrogenphosphat und Serin hydrolytisch spaltet.

### 2.3 Carboanhydratase (Zn)

- **Vorkommen:** Carboanhydratase mit 259 Aminosäureresten (ca. 30 kDa) sind in verschiedenen Varianten bei Prozessen der Photosynthese (pflanzliche  $CO_2$ -Aufnahme aus Luft), bei der Atmung (rasche  $CO_2$ -Entsorgung in der Lunge, zweiter wichtiger Bestandteil menschlicher Erythrozyten neben Hämoglobin), bei der (De)-Calzifizierung (Knochenaufbau / -abbau) und bei der Regulierung des Hydrogencarbonatpuffers im Blut essentiell beteiligt.
- **Aufgabe:** Beschleunigung des Hydrolysegleichgewichtes  $H_2O + CO_2 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$  um den Faktor  $10^7$ .
- **Aktives Zentrum:**  $Zn^{2+}$  4-fach koordiniert durch 3 neutrale Imidazolliganden (unterschiedlich gebunden!) von His-94, His-96 und His-119 und einem Aqualiganden (Nucleophil).
- **Mechanistisch-katalytisches Prinzip:** Im dikationischen Zn-Komplex ist der  $pK_a$  des koordinierten Wassers auf  $pK_a$  7 herabgesetzt (von  $pK_a$  14 für reines Wasser). Das bedeutet, die Gleichgewichtskonstante für das Glgew.  $[PZn(OH_2)]^{2+} \rightleftharpoons [PZn(OH)]^+ + H^+$  beträgt ca.  $10^{-7}$  mol/l.

Dies allein erklärt nicht die extrem hohe TOF des Enzyms von  $10^6$ / sec. Deshalb ist wahrscheinlich, dass ein "Protonen-Shuttle" zu einem weiter entfernten Histidin-Imidazol (realisiert über H-Brücken eines Wassernetzwerkes als Vermittler,  $\rightarrow$ Protomerie) die Konzentration von  $H^+$  Ionen am Hydroxidliganden herabsetzt und damit die Deprotonierung bis zum Grenzwert der Diffusionskontrolle extrem beschleunigt.

Der Angriff des nucleophilen  $Zn-OH$  auf  $CO_2$  erfolgt wahrscheinlich ohne Präkoordination des Säureanhydrids. Es bildet sich ein  $\eta^2$ - "Prä-Hydrogencarbonat", das zum  $\eta^2$ -Hydrogencarbonat isomerisiert. Der Zyklus schließt sich durch Verdrängung von  $HCO_3^-$  durch einen Aqualiganden.



10.9 Hydratation von Kohlendioxid durch Carboanhydrase.

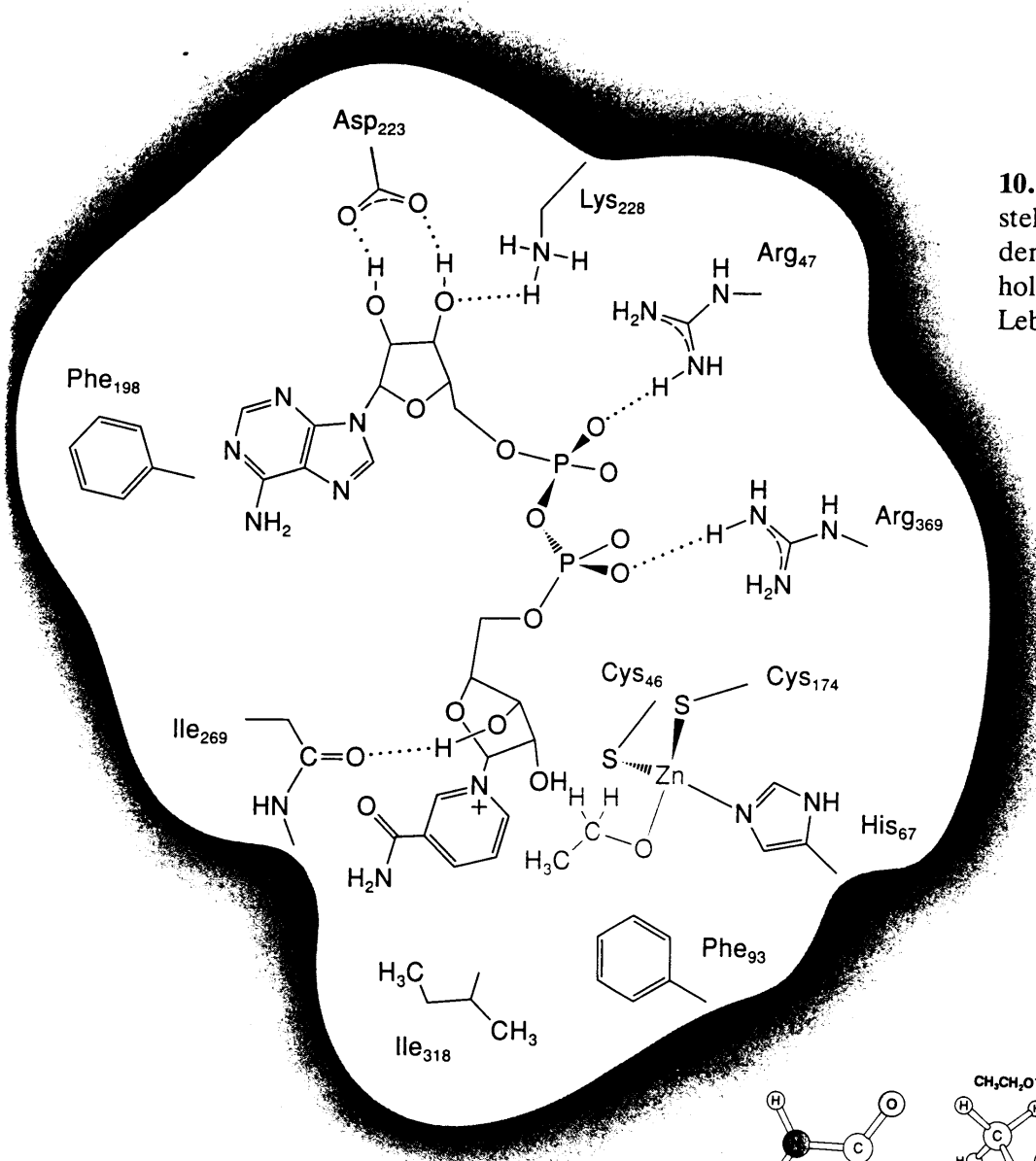
### 3. Elektronentransfer-Reaktionen (Redoxreaktionen)

#### 3.1 Alkohol-Dehydrogenase "ADH" (Zn)

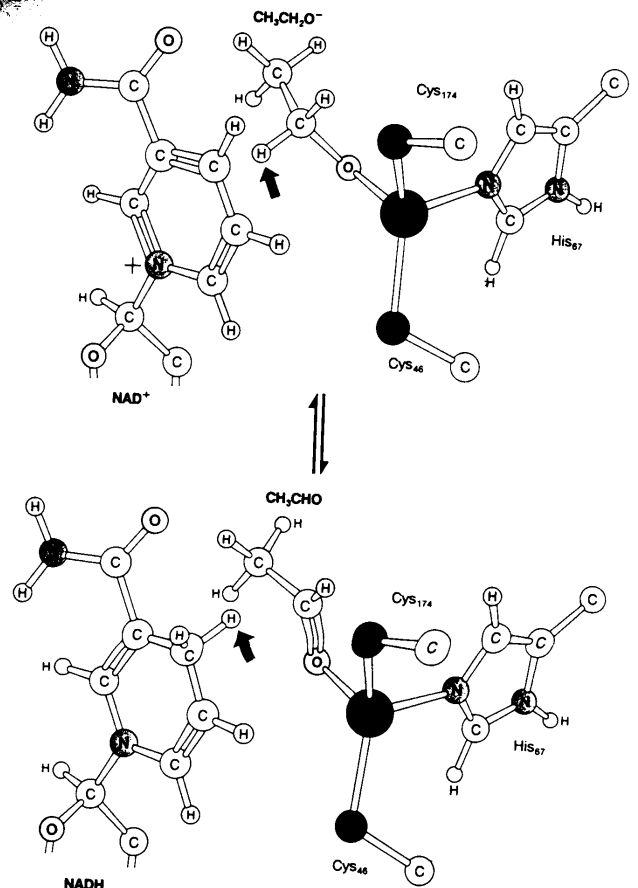
- **Vorkommen:** Ein Leberenzym, das für den Metabolismus primärer Alkohole, insbesondere Ethanol, verantwortlich ist.
- **Aufgabe:** ADH katalysiert die  $\text{NAD}^+$ -abhängige Oxidation primärer Alkohole zu Aldehyden. Da Zn selbst kein redoxaktives Metallzentrum darstellt, wird das Coenzym  $\text{NAD}^+$  in der katalytischen Domäne als Hydrid-Acceptor benötigt. Umgekehrt lässt sich die Reduktion von Aldehyden durch  $\text{NADH}$  enantioselektiv durch dieses Enzym katalysieren.  

$$\text{RCH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{RCHO} + \text{NADH} + \text{H}^+$$
- **Aktives Zentrum:** Zwei 4-fach koordinierte  $\text{Zn}^{2+}$ : Das eine  $\text{Zn}^{2+}$  ist von vier Cysteinat-Schwefelliganden gebunden (strukturelle Funktion), das katalytisch aktive  $\text{Zn}^{2+}$  ist durch einen Imidazoliganden von His-67, einen Aqualiganden und zwei Thiolatliganden von Cys-46 und Cys-174 gebunden.
- **Mechanistisch-katalytisches Prinzip:** Gekoppelter Protonen- und Hydrid-Transfer. Der Aqualigand wird durch das Substrat (prim. Alkohol) substituiert. Zink erleichtert die Deprotonierung zum Alkoholat, beispielsweise Ethanolat. Das eigentliche Reduktans  $\text{NAD}^+$  wird über Wasserstoffbrücken (Asp, Arg) in eine Position der Enzymtasche dirigiert, aus der ein direkter Hydrid-Transfer vom  $\alpha$ -C-Atom des elektronenreichen Zinkats auf den

**10.11** Schematische Darstellung des NAD<sup>+</sup>-bindenden Bereichs in der Alkohol-Dehydrogenase aus der Leber.



**10.12** Hydridübertragung vom zinkgebundenen Ethanolat-Ion auf NAD<sup>+</sup> unter Bildung von Acetaldehyd und NADH. Das übertragene Hydrid-Ion ist durch einen Pfeil markiert.





Nicotinamidring erfolgen kann. Aus dem Ethanolat entsteht nach Hydrid-Transfer Acetaldehyd. Methanol wird langsamer zum toxischen Formaldehyd metabolisiert (kein guter Hydrid-Donor). Neurotoxische Wirkung von  $\text{H}_2\text{CO}$  (Gegenmaßnahme EtOH Gabe). Höhere n-Alkohole werden zwar rasch zu den Aldehyden oxidiert, doch die Weiteroxidation der Aldehyde durch das Molybdoenzym Aldehydoxidase zu den Carbonsäuren ist gerade bei höheren Homologen sehr langsam (physiologische Erscheinung des "Kater-Syndroms").

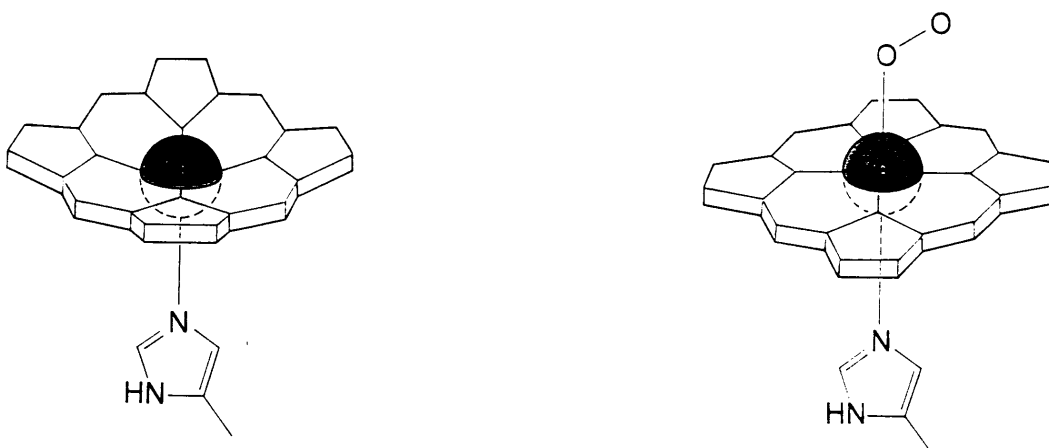
### 3.2 Hämoglobin Hb und Myoglobin Mb (Fe)

- **Vorkommen:** Während wirbellose Lebewesen für den Sauerstoff-Transport die bereits in der Einleitung erwähnten zweikernigen Metallarrangements mit Aminosäurekoordination, Hämerythrin Hr (Fe) und Hämocyanin Hc (Cu), verwenden, findet man bei den höher entwickelten Wirbeltieren das Häm-System (Fe-Porphyrin), als prosthetische Gruppe über das proximale Histidin gebunden an das Protein. Hämoglobin Hb ist ein 4 Hämgruppen enthaltendes Tetramer des monomeren Myoglobins Mb. Kooperativer Effekt der 4 Häm-Gruppen: Mit zunehmender  $\text{O}_2$ -Beladung steigt die Sauerstoffaffinität (nicht-hyperbolische = sigmoide pH-abhängige  $\text{O}_2$ -Sättigungskurve). Hb transportiert den Sauerstoff im Blut von der Lunge zum Muskelgewebe und gibt dort, bei einem niedrigeren pH-Wert,  $\text{O}_2$  an Mb ab.

- **Aktives Zentrum:**

**Desoxy-Formen von Hb und Mb:** Der dianionische Tetrapyrrol-Ligand koordiniert in den Desoxyformen von Hb und Mb ein high-spin Eisen(II)-Zentrum mit vier ungepaarten Elektronen. Entsprechend beobachtet man ein (S = 2)-Grundzustand. Die Reaktion eines theoretisch denkbaren low-spin Eisen(II)-Komplexes (S = 0) mit Triplett-Sauerstoff (S = 1) wäre Spin-verboden.

Was führt zum high-spin-Zustand? Der Ionenradius von  $\text{Fe}^{2+}$  ist zu groß für den Biß des Por-Liganden.  $\text{Fe}^{2+}$  paßt nicht in die Ebene des Liganden hinein und wird in einem entatischen out-of-plane-Zustand (verringerte Metall-Por-Wechselwirkung!) durch einen Histidin-Imidazolliganden des Proteins von der proximalen Seite her stabilisiert (d.h. auf diese Seite gezogen). Schon der relativ geringe "Zug" in die Por-Ligandenebene, etwa durch Koordination  $\pi$ -acider Moleküle  $\text{O}_2$ , CO, NO von der gegenüberliegenden distalen Seite führt zum Spin-Crossover, der Spinpaarung zum low-spin Komplex.

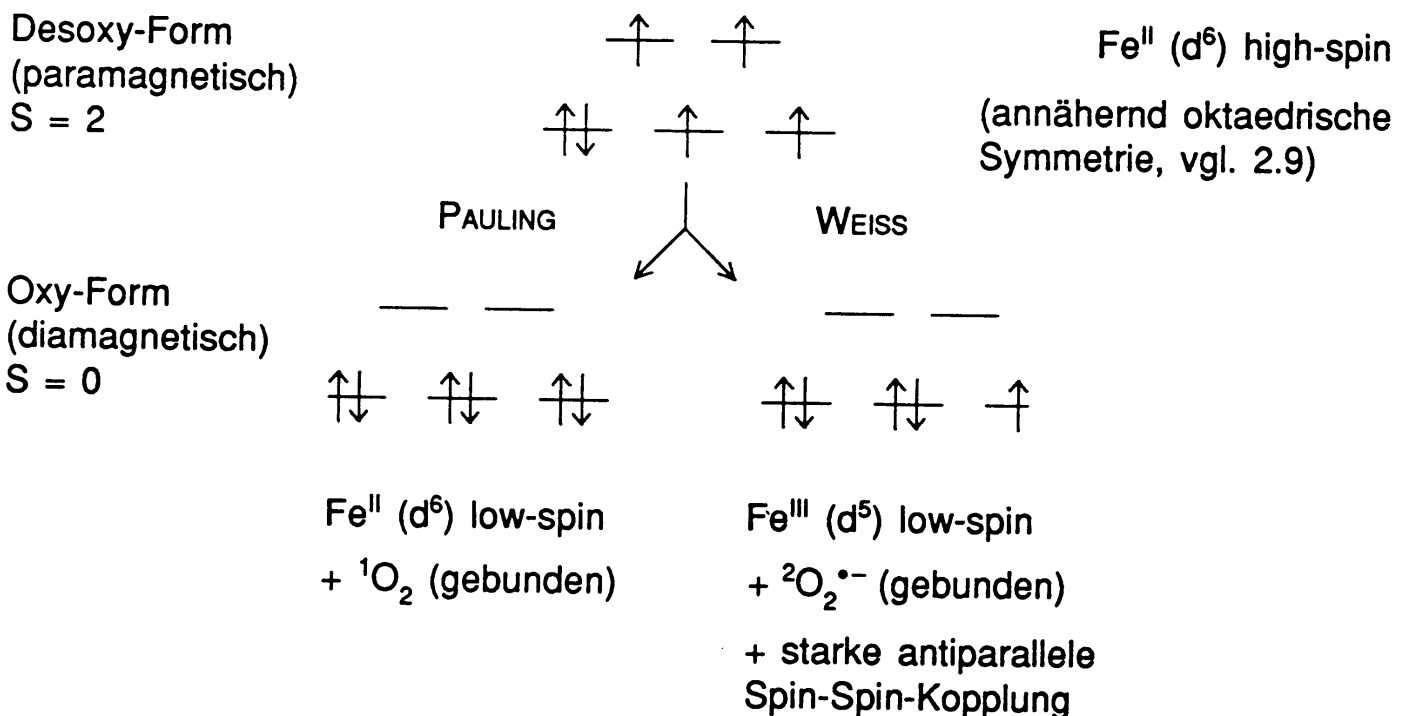


**Oxy-Formen von Hb und Mb:** Nach Sauerstoffaufnahme befindet sich das O<sub>2</sub>-Molekül in end-on Koordination mit einem Winkel Fe-O-O von ca. 115-120°. Oxy-Mb und Oxy-Hb sind diamagnetisch bei Raumtemperatur; das Eisenzentrum befindet sich in der Por-Ebene.

Es gibt zwei kontrovers diskutierte Bindungsmodelle, die diesen Diamagnetismus erklären: **Das Pauling-Coryell-Modell (1936)** führt den Diamagnetismus auf die Bindungswechselwirkung eines low-spin Fe<sup>2+</sup> Zentrums (S = 0) mit Singulett-Sauerstoff <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (S = 0) zurück. Hierbei dient ein lone-pair des O<sub>2</sub>-Moleküls als σ-Donor und das π\*-MO als π-Acceptor-orbital. Wäre die Acceptoreigenschaft des O<sub>2</sub>-Liganden führt im Extremfall der Betrachtung zu einem end-on gebundenen Peroxid η<sup>1</sup>-O<sub>2</sub>. Für die Stabilisierung des reduzierten O<sub>2</sub>-Moleküls ist die Ausbildung einer H-Brücke zu einem distalen protonierten Imidazol (His) wichtig.

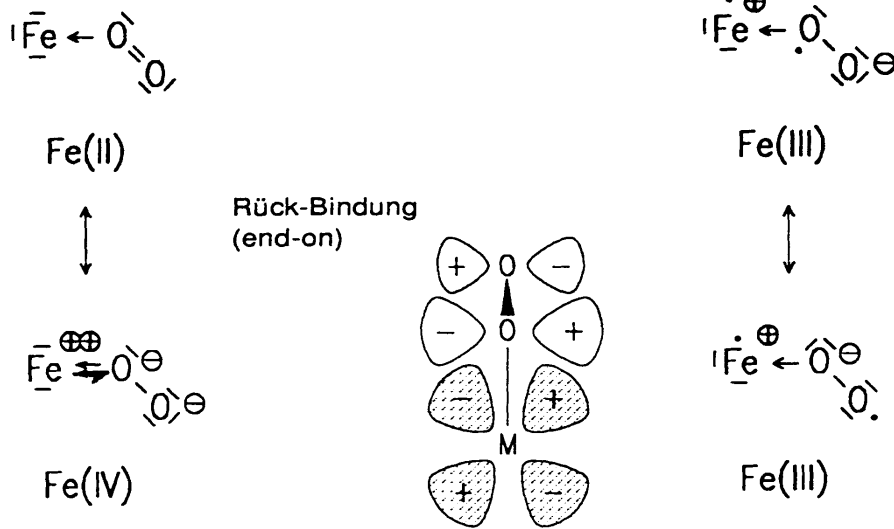
Die plausible Alternative ist das **Weiss-Modell (1964)**: Als Folge einer Einelektronenreduktion sollte das O<sub>2</sub>-Molekül als Hyperoxid-Radikalanion O<sub>2</sub><sup>-</sup> (S = 1/2) end-on koordiniert an einem low-spin Fe<sup>3+</sup> Zentrum (S = 1/2) vorliegen. Der diamagnetische Grundzustand (S = 0) wäre in diesem Modell auf die starke antiferromagnetische (antiparallele) Kopplung beider Spins zurückzuführen. Hinweise auf das Weiss-Modell: Resonanz-Raman-Spektroskopie: ν(O-O) = 1105 cm<sup>-1</sup> entspricht Hyperoxid O<sub>2</sub><sup>-</sup> (O<sub>2</sub>: 1580, O<sub>2</sub><sup>2-</sup>: 802 cm<sup>-1</sup>).

### Oxidations- und Spinzustände im System Häm/O<sub>2</sub>:

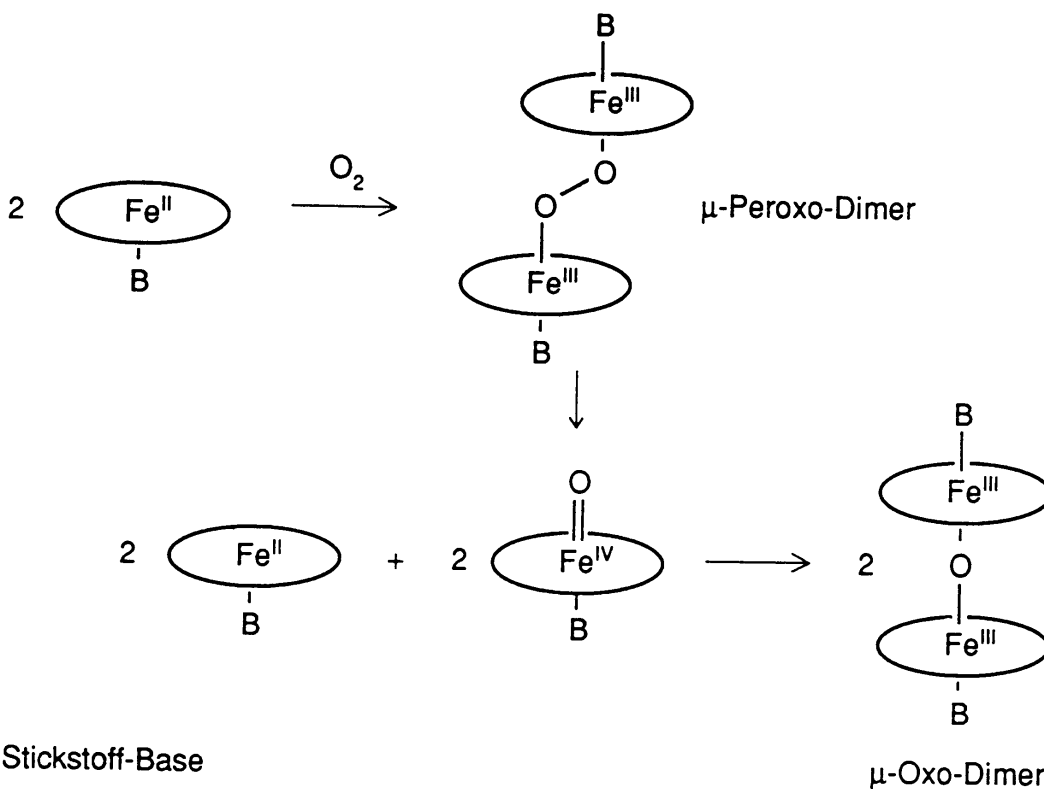


## Formulierung nach PAULING

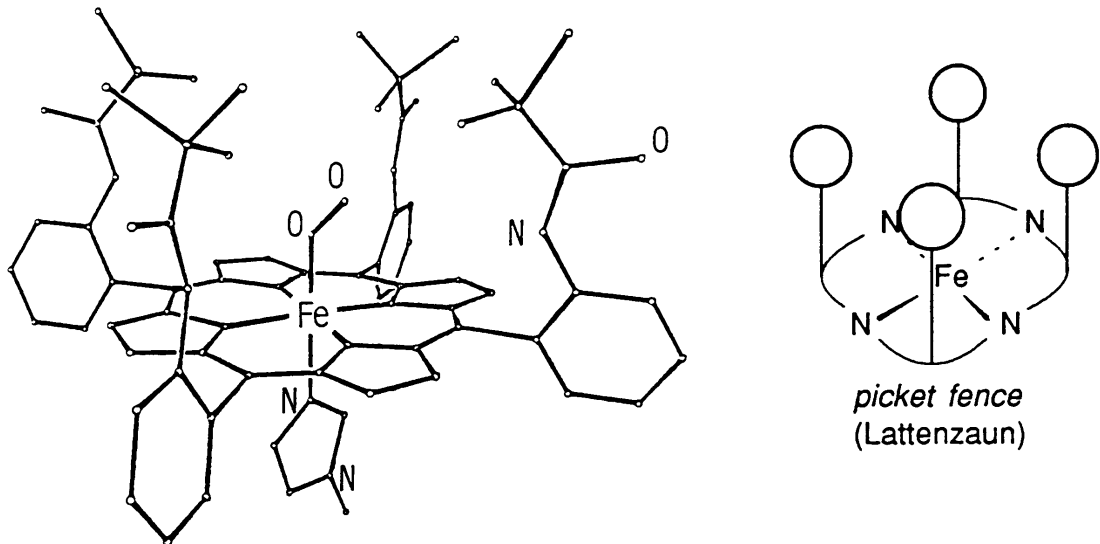
## Formulierung nach WEISS

**Hb-/Mb-Modellchemie:**

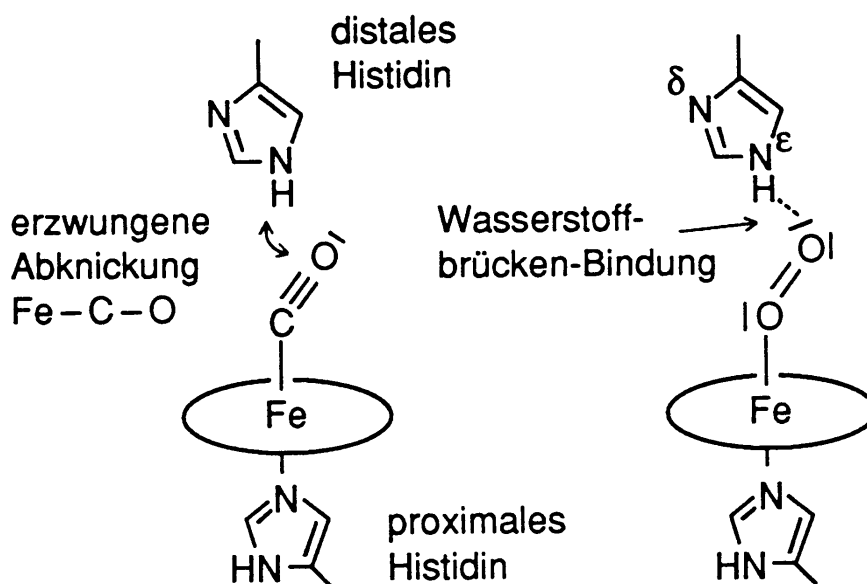
Viele der nicht durch die Proteinumgebung geschützten Eisen(II)-Porphyrin-Komplexe reagieren nur irreversibel mit  $\text{O}_2$ , um über  $\mu$ -Peroxo-Zwischenstufen letztlich  $\mu$ -Oxo-verbrückte Dimere zu liefern. Die gezielte Synthese reversibel  $\text{O}_2$ -bindender Modellverbindungen blieb lange Zeit eine Herausforderung. Erst die Abschirmung des  $\text{O}_2$ -bindenden Halbraumes durch sterisch anspruchsvolle Substituenten (Lattenzaun-Strategie, "picket-fence" Collman) verhinderte die Weiterreduktion zum Peroxid und schließlich Oxid.



### Ein oxygenierter Lattenzaun-Porphyrinkomplex:



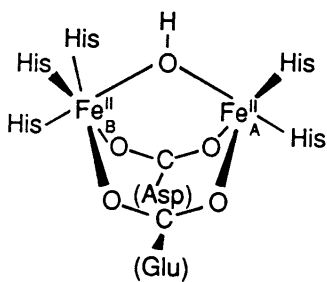
Nicht durch die Proteinumgebung geschützte Eisen(II)-Porphyrin-Komplexe binden CO um ein Vielfaches stärker als O<sub>2</sub>: Komplexbildungskonstanten  $K_{CO} / K_{O_2} = 25\ 000$ . Dieser ungünstigen Gleichgewichtssituation begegnet das Enzym durch eine Blockierung der 6. Koordinationsstelle durch das distale Histidin, das eine terminale CO Koordination mit linearer Achse N<sub>proximal</sub>-Fe-C-O nicht erlaubt. Thermodynamik verbessert sich auf  $K_{CO} / K_{O_2} = 200$ , nicht genug um "immun" gegenüber CO Vergiftung der Häm-Gruppe zu sein.



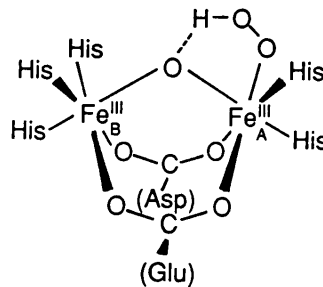
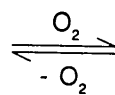
### 3.3 Hämyerthin Hr (Fe)

- **Vorkommen und Aufgabe:** Reversible Sauerstoff-Bindung und -Transport in wirbellosen niederen Lebewesen.
- **Aktives Zentrum:**  
**Desoxy-Hr:** Zwei d<sup>6</sup> high-spin Fe<sup>2+</sup> Zentren ( $S = 4$ , ESR- + Mössbauer-Spektren), die über eine verbrückende  $\mu$ -Hydroxygruppe und zwei  $\mu$ -Carboxylatogruppen (Glutamat und Aspartat) miteinander verknüpft sind. Das eine wird durch drei Histidin-Liganden zum Oktaeder, das andere ist durch lediglich zwei Histidin-Liganden zum 5-fach-koord. Zentrum ergänzt. Die magnetische Kopplung ist aufgrund der langen Fe-OH-Fe Bindung nur schwach ausgeprägt.

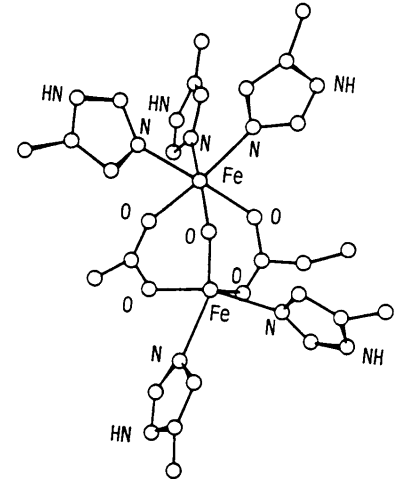
**Oxy-Hr:** Sauerstoff bindet an das 5-fach koordinierte  $\text{Fe}^{2+}$ , nimmt zwei Elektronen von beiden Eisenzentren auf, wird zum end-on gebundenen Peroxid reduziert (violette Farbe der Oxy-Hb kommt vom L→M-Charge-Transfer). Das negativ geladene terminale Peroxid-Sauerstoffatom wird durch eine H-Brücke zum Proton der  $\mu$ -Hydroxygruppe stabilisiert (Grenzfall der Betrachtung: Terminales Hydroperoxid  $\text{HOO}^-$  koordiniert an dem sogenannten **Met-Hr** (= oxidierte Fe(III/III)-Form von Hr mit dem Bauelement  $[\text{Fe}_2\text{O}(\text{O}_2\text{CR})_2]^{2+}$ , jedoch ohne  $\text{OOH}^-$  Ligand, **Struktur:**



Desoxy-Hämerythrin



Oxy-Hämerythrin

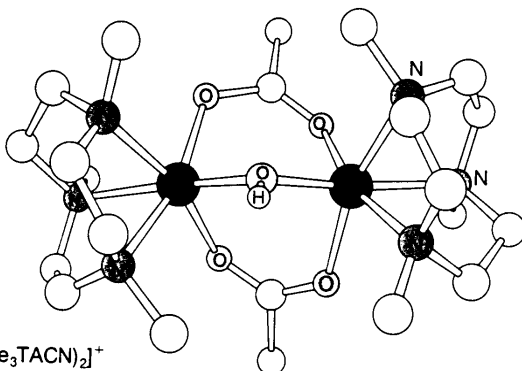
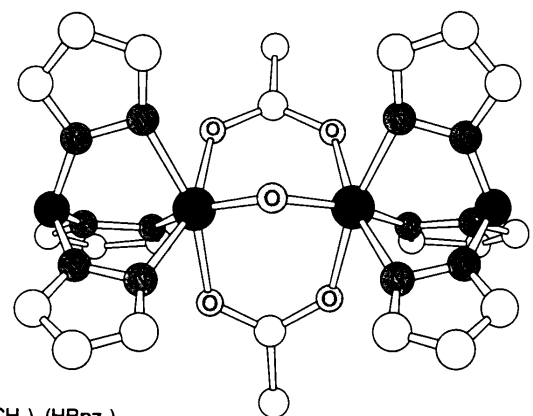


Die beiden  $\text{Fe}^{3+}$  Zentren sind infolge des kürzeren  $\text{Fe}^{3+}\text{-O-Fe}^{3+}$  Abstandes stark antiferromagnetisch gekoppelt, wobei ein diamagnetischer Grundzustand resultiert (ESR-silent). Resonanz-Raman-Spektroskopie lässt sich eine charakteristische O-O Streckschwingung bei  $844\text{ cm}^{-1}$  (Peroxid !) nachweisen. Die Zwei-Elektronen-Reduktion von  $\text{O}_2$  erfolgt über eine gemischtvalente Fe(II / III) Hyperoxid-Zwischenstufe (2 Ein-Elektronen-Red.schritte über "Semimet-Zwischenstufe").

### • Modellkomplexe:

**Azidomet-Hr:** Die purpurrote, oxidierte Fe(III/III)-Form des Enzyms, in der ein Azid-Ligand den Hydroperoxid-Liganden an der Grundeinheit  $[\text{Fe}_2\text{O}(\text{O}_2\text{CR})_2]^{2+}$  ersetzt, wurde strukturell bis zu einer Auflösung von 166 -200 pm charakterisiert. Azidomet-Hr und Oxy-Hr besitzen ähnliche spektroskopische Merkmale (EXAFS, Raman, ESR, Magn. Moment).

Biomimetische Modellkomplexe für die Desoxy-Form  $[\text{Fe}_2(\text{OH})(\text{O}_2\text{CR})_2]^+$  wurden mit dem Triazacyclononan-Liganden ( $\text{Me}_3\text{TACN}$ , Wieghardt), solche, die die oxidierte Met-Form modellieren mit dem monoanionischen Hydrido-trispyrazolylborat- oder dem unsubstituierten TACN-Liganden hergestellt (Fragestellungen der Bioanorganik: Strukturelles Modell? spektroskopisches Modell? funktionales Modell?).

 $[\text{Fe}_2(\text{OH})(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2(\text{Me}_3\text{TACN})_2]^+$  $\text{Fe}_2\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2(\text{HBpz}_3)_2$   
Hydrotris(1-pyrazolyl)borat ( $\text{HBpz}_3$ )

Andere Nicht-Häm-Eisen-Proteine, deren spektroskopische Eigenschaften mit denen von Met-Hr Fe(III/III) oder Semimet-Hr (Fe(II/III)) übereinstimmen:

Ribonucleotid-Reduktase RR zur Desoxygenierung von RNA- zu DNA-Bausteinen.

Saure Phosphatasen PAP (Hydrolytische P-ester-Spaltung)

Methan-Monooxygenase MMO (aerobe Oxidation von Methan zu Methanol)

### 3.4 Hämocyanin Hc und Azurin (Cu)

• **Hämocyanin, Vorkommen und Funktion:** Sauerstofftransport in Anthropoden.

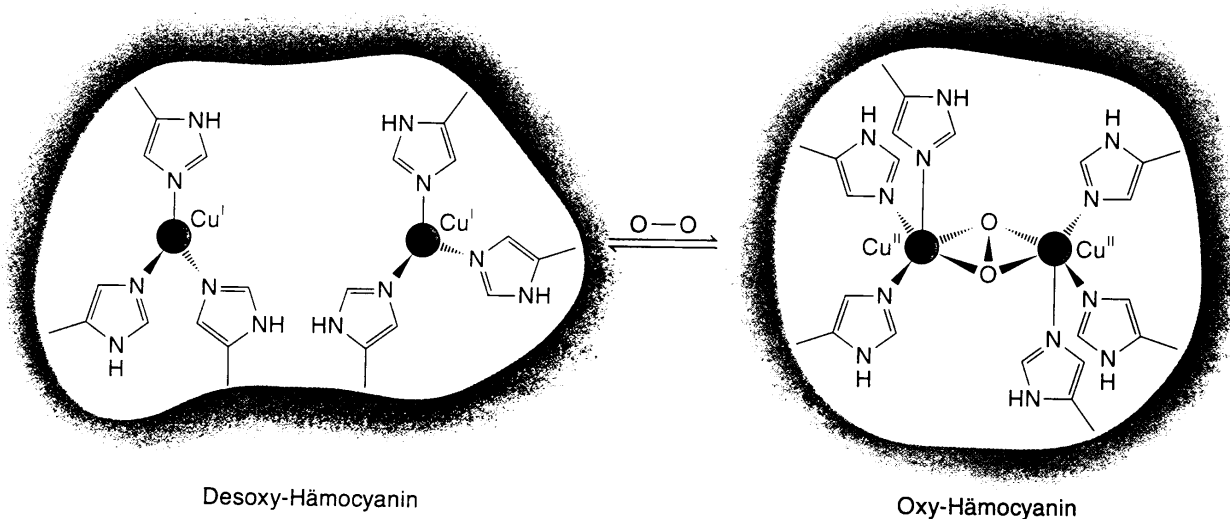
• **Aktives Zentrum:**

**Farbloses Desoxy-Hc** enthält zwei  $d^{10}$ -Cu(I)-Ionen im Abstand von ca. 370 pm jeweils von drei His-Imidazoliganden koordiniert. Diamagnetischer Grundzustand, es wird jedoch spekuliert, ob nicht eine elektronisch angeregte Triplet-Konfiguration ( $3d^94p^1$  oder  $3d^94s^1$ ) an der Reaktion mit Triplet-Sauerstoff beteiligt ist.

**Oxy-Hc** enthält in der Tasche zwischen den Cu-Zentren einen  $\mu, \eta^2, \eta^2$ -O<sub>2</sub>

**Peroxidliganden.** Beide  $d^9$ -Cu(II)-Zentren sind stark antiferromagnetisch gekoppelt (bei RT diamagnetisch, ESR-silent). Weitere spektroskopische Kennzeichen:

Resonanz-Raman:  $\nu(\text{O-O})$  803  $\text{cm}^{-1}$ , UV-VIS: 345 nm Absorption mit extrem hohem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  (Peroxid-L $\rightarrow$ M-Charge-Transfer).



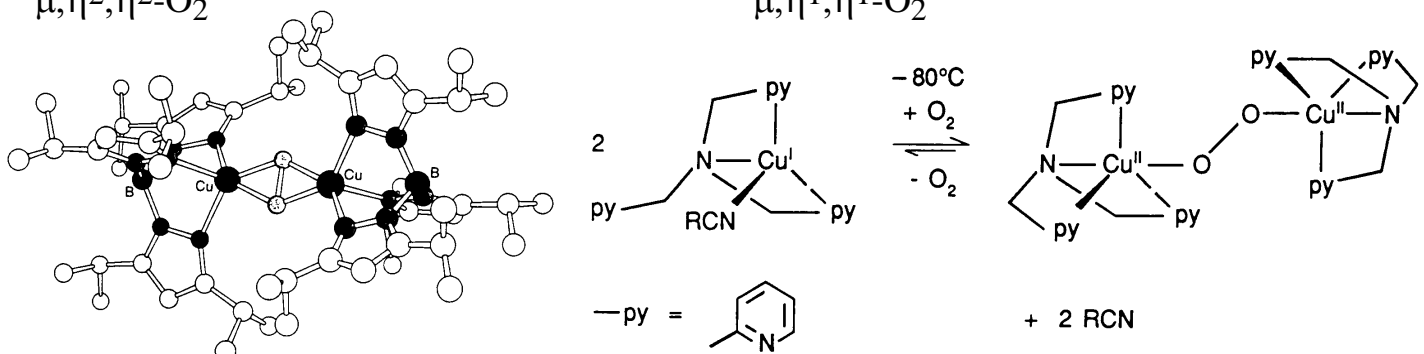
• **Modellkomplexe**, die ebenfalls reversibel O<sub>2</sub> aufnehmen und diamagnetisch (antiferromagnetisch gekoppelt) sind:

Cu(II)-Hydrido-tris-1-pyrazolylborat

$\mu, \eta^2, \eta^2$ -O<sub>2</sub>

Cu(II)-Tris-2-pyridylmethylamin

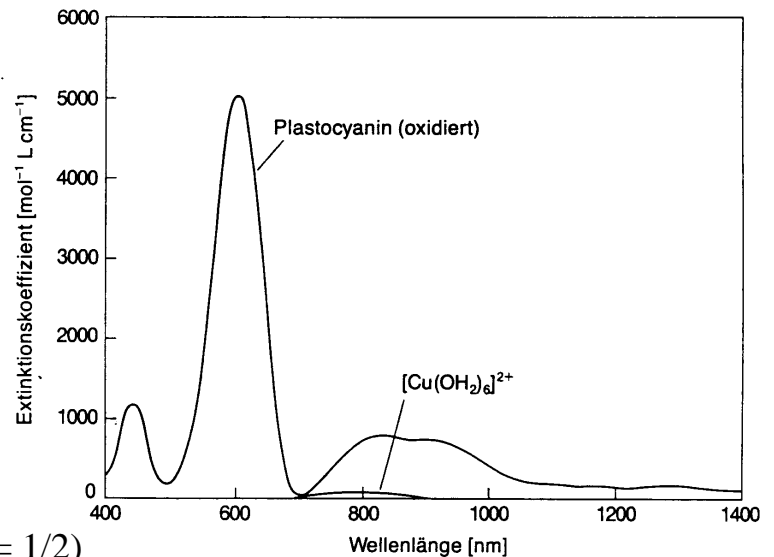
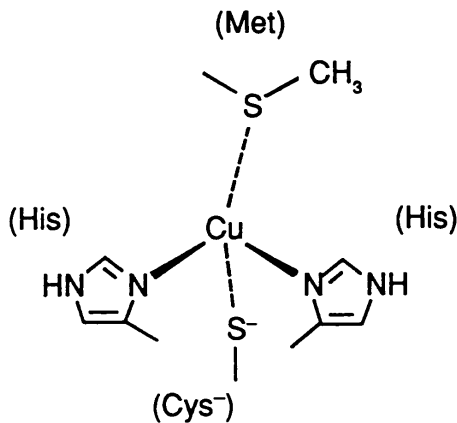
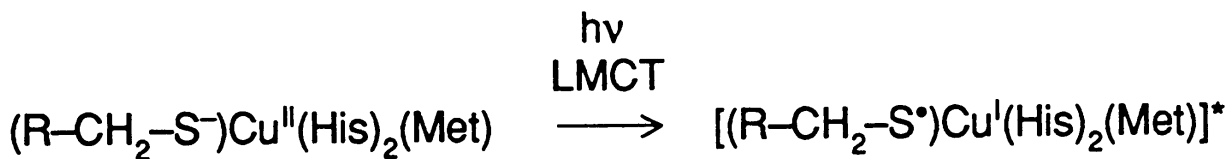
$\mu, \eta^1, \eta^1$ -O<sub>2</sub>



- **Azurin, Vorkommen und Funktion:** Reversibler Elektronentransfer, Beteiligung an bakterieller Photosynthese.
- **Plastocyanin, Vorkommen und Funktion:** Reversibler Elektronentransfer, Beteiligung an pflanzlicher Photosynthese.
- **Aktives Zentrum:**

Beide gehören zu den sogenannten "**Blauen Kupferproteinen**", die ihren Namen vom intensiven L→M-CT des Cysteinatliganden ableiten. Cu(I / II) wird durch zwei Histidinliganden, ein Cysteinat-Anion und die Thioetherfunktion des Methionins koordiniert.

Die Redoxpotentiale für Cu(I / II) liegen generell höher als für Fe(II / III).

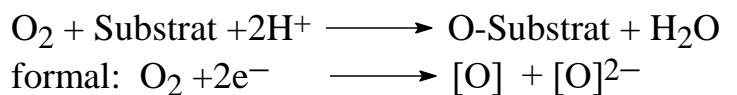


ESR: Spindelokalisation von  $d^9$ -Cu<sup>2+</sup> ( $S = 1/2$ ) auf Cysteinat bereits im Grundzustand.

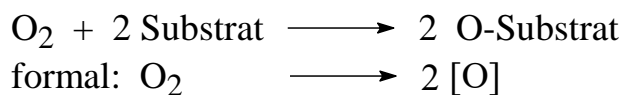
### 3.5 Cu-Monooxygenasen am Beispiel der Tyrosinase

#### Definition:

**Monooxygenasen** verwerten ein O-Atom des molekularen Sauerstoffs für die Oxidation organischer Substrate, das andere wird zu H<sub>2</sub>O reduziert.



**Dioxygenasen** verwerten beide O-Atome des molekularen Sauerstoffs für die Oxidation organischer Substrate.



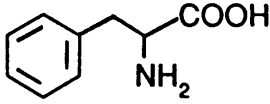
- **Funktion und Vorkommen:** Als Alternative zu den eisenhaltigen Häm-Enzymen mit Monooxygenase-Aktivität, etwa Cytochrom P450 (siehe 3.6), kennt die Pflanzen- und Tierphysiologie auch Kupferenzyme mit ähnlicher Funktion: Mono- und Di-Hydroxylierung

von Aromaten zur Biosynthese wichtiger natürlicher Wirkstoffe (Vitamine C +E, Hormone, Neurotransmitter etc.), weiterhin die Oxidation von Catecholen zu lichtabsorbierenden o-Chinonen (natürlicher Lichtschutz), die oxidativ zu Melanin  $[C_8H_3NO_2]_X$  polymerisieren. Melanin ist das Braunpigment der Haut + Haare sowie von oxidiertem Fruchtfleisch

(Banane + Apfel). Melanin bildet selbst stabile Radikale, die als Radikalfänger für die durch Sonneneinstrahlung in der Haut gebildeten Radikale dienen. Dysfunktion der Enzyme: → Albinismus

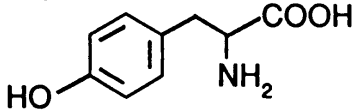
**Beispiel: L-Phenylalanin-Stammbaum**

L-Phenylalanin



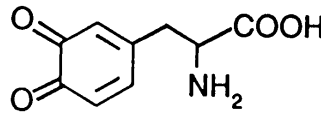
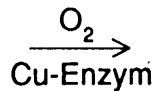
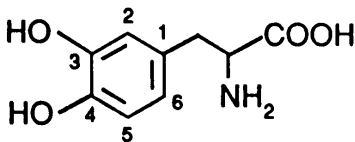
Phenylalanin-4-Monooxygenase  
(Fe/Pterin oder Cu/Pterin)

L-Tyrosin

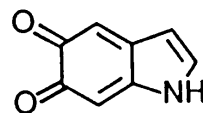
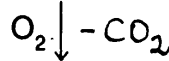


Tyrosin-3-Monooxygenase (Cu)

L-Dopa

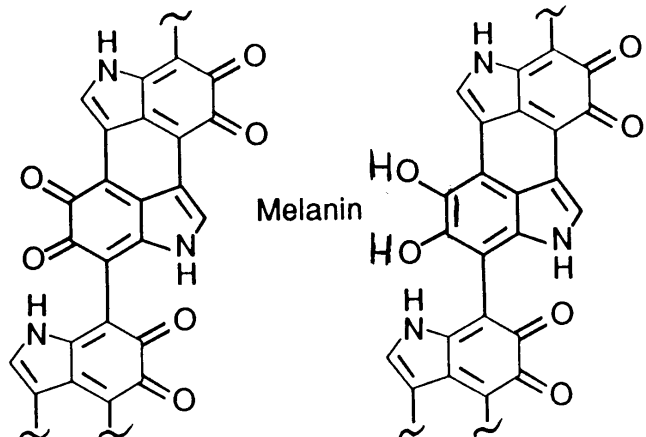


Dopachinon



Indol-5,6-chinon

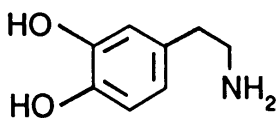
Polymerisation  
(+ Oxidation)



oxidierte Form  $\xrightarrow{2H}$  reduzierte Form

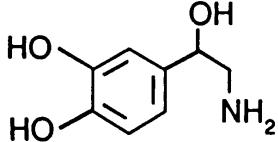
Dopa-Decarboxylase

Dopamin



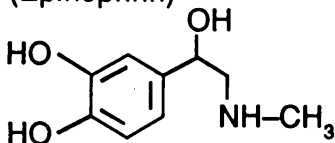
Dopamin-β-Monooxygenase (Cu)

R-Noradrenalin



Noradrenalin-N-Methyltransferase

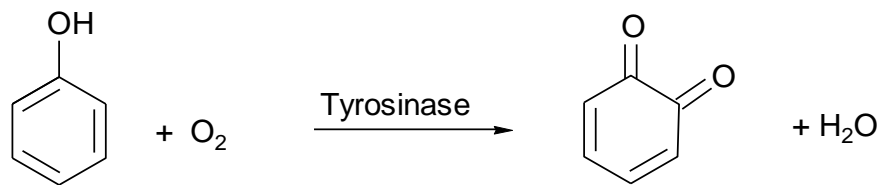
R-Adrenalin  
(Epinephrin)





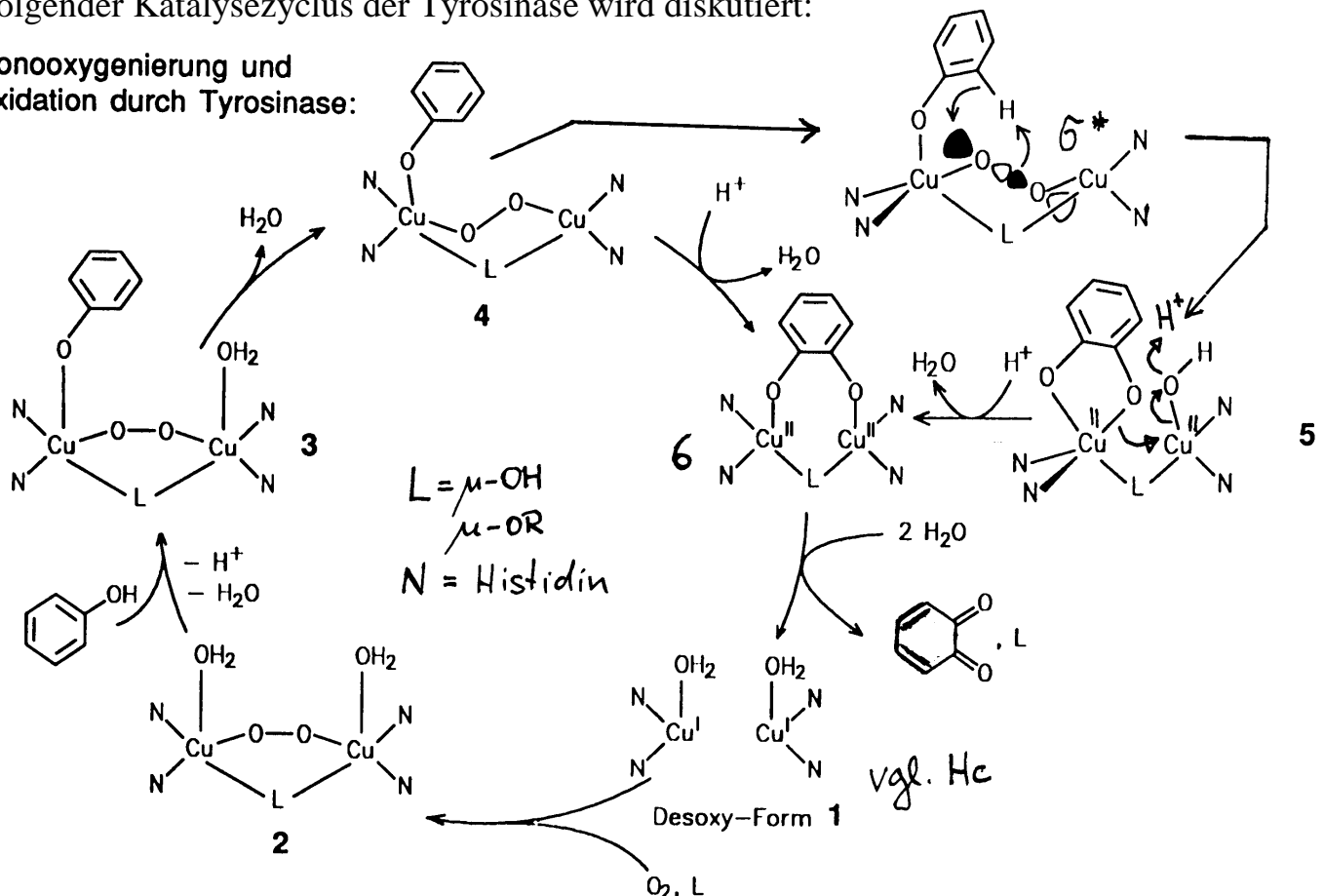
## Aktives Zentrum und Katalysezyklus

Gesamtreaktion:



Gesicherte Kristallstrukturdaten liegen noch nicht vor. Mindestens zwei (oder max. drei) Histidinliganden pro Kupfer, ähnlich Hämocyanin, kein S-Ligand (Met od. Cys). Folgender Katalysezyklus der Tyrosinase wird diskutiert:

Monooxygenierung und Oxidation durch Tyrosinase:



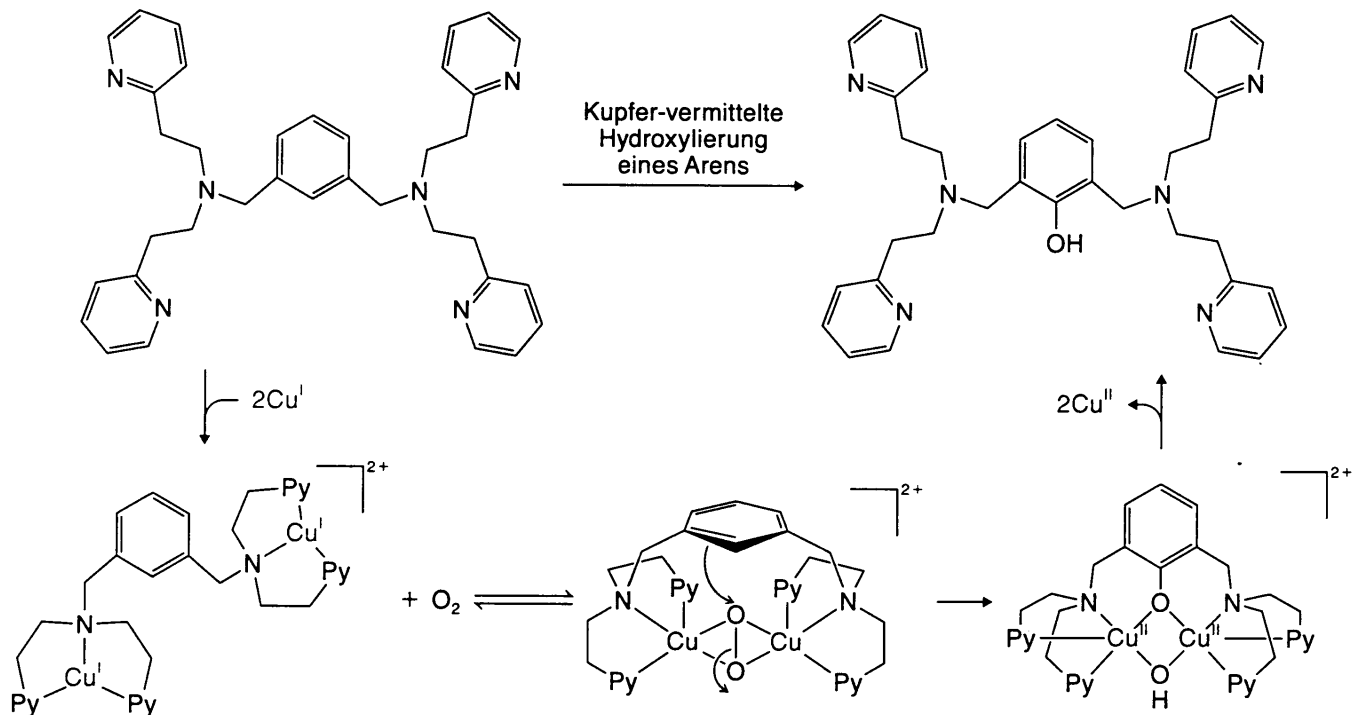
**Modell A:** Oxidative Addition von Sauerstoff an die Desoxy-Form **1** führt zu einem dinuclearen Cu(II)- $\mu, \eta^1, \eta^1$ -Peroxo-Komplex: Fünfring über verbrückende  $\mu\text{-OH}$  Funktion ( $L = \text{OH}^-$ ) lagert Phenolat an, verdrillt sich zu **4**, damit das Phenolat-HOMO in das antibindende  $\sigma^*$ -Orbital der O-O-Bindung (LUMO) angreifen kann.

Intermediat stabilisiert sich unter Protonenwanderung zunächst zum chelatisierenden Catecholato- / Hydroxo-Komplex **5**.

Nach Protonierung des Hydroxyliganden und Abspaltung von Wasser wird ein verbrückender Catecholatokomplex **6** diskutiert, der evtl. leichter das o-Chinon reaktiv eliminieren kann unter Regenerierung der Desoxy-Form **1**, die gleich wieder durch O<sub>2</sub> gequenchet wird.

**Modell B:** Das Fünfring-Peroxid **4** könnte auch durch den vom Hämocyanin her bekannten  $\mu, \eta^2, \eta^2$ -Peroxo-Komplex ersetzt sein. Anlass zu dieser Überlegung gibt die folgende nachgewiesene Modellreaktion, in der ein konformativ starr ausgerichteter Aromat (ursprünglich als Ligand-Spacer konzipiert) gezielt in ortho-Position hydroxyliert wurde.

• **Modellreaktion:**

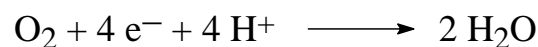


**11.10** In einem synthetischen Modellsystem beobachtete Monooxygenase-Aktivität. Der zweikernige Kupfer(I)-Komplex vermittelt die Insertion von Sauerstoff in eine aromatische C–H-Bindung des gebundenen Liganden mit gleichzeitiger Oxidation der Kupfer-Ionen zu Cu(II).

### 3.6 Cytochrom P450 (Fe)

Allgemeine Def. Cytochrome: Man kennt über 50 Cytochrome (= "Zellfarbstoffe"). Sie sind Hämoproteine, deren Hämgruppen [FePor] distal und proximal von unterschiedlichen Aminosäure-Seitenketten ligiert sind, folglich unterschiedliches Redoxpotential aufweisen:

**Cytochrom a<sub>1</sub> ... n Serie:** z.B. das Atmungsferment Cytochrom a<sub>3</sub> in "Cytochrom c-Oxidase" wird durch zwei His-Liganden koordiniert → hohes Oxidationspotential, zuständig für die energieliefernde, protonenverbrauchende 4-Elektronen-Reduktion von Sauerstoff:



(damit das Gegenstück zu O<sub>2</sub>-produzierenden Mangan-Membranproteinen der Photosynthese)

**Cytochrom b<sub>1</sub> ... n Serie:** Histidin / Histidin Koordination

**Cytochrom c<sub>1</sub> ... n Serie:** Histidin / Methionin Koordination

**Cytochrom f:** Histidin / Lysin Koordination

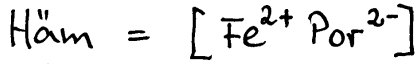
**Cytochrom P450:** "P" steht für Pigment, 450 für das Absorptionsmaximum (Soret-Bande in nm) des low-spin Fe(II)-Kohlenmonoxid-Komplexes. Cysteinat / Wasser Koordination.

- **Funktion der Cytochrome a,b,c,f:** Elektronentransfer in der Atmungskette, Photosynthese und anderen biologischen Redoxreaktionen. Elektronentransfer rasch, da die "Reorganisationsenergie" gering ist (M-L Bindungslängenangleichung im Übergangszustand der oxidierten/ reduzierten Form, vgl. Vorlesung Mechanismen in der Koord.chemie). Im Sinne der Theorie des entatischen Zustandes liegt der enzymatische Grundzustand bereits in der Nähe des Übergangszustandes, Gründe hierfür:

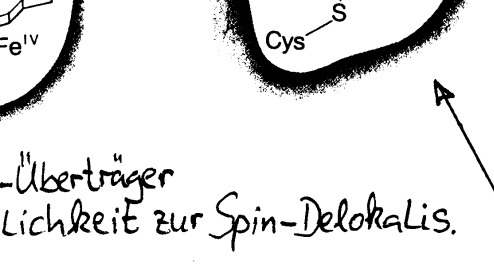
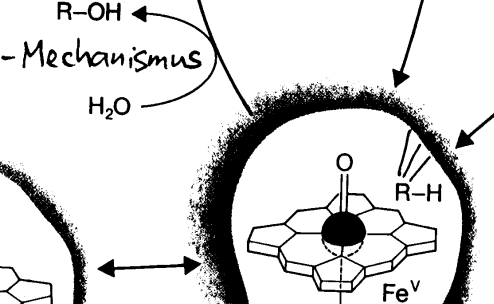
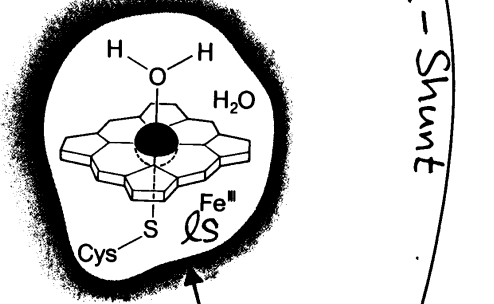
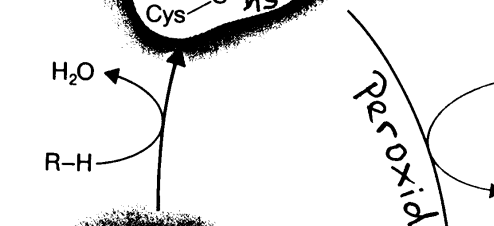
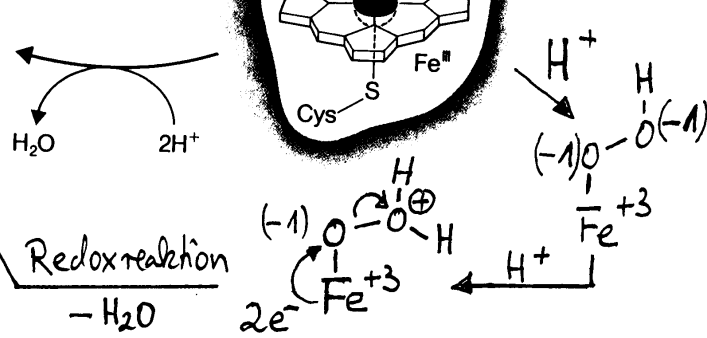
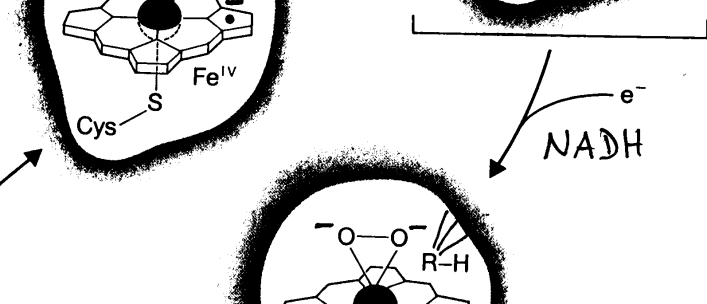
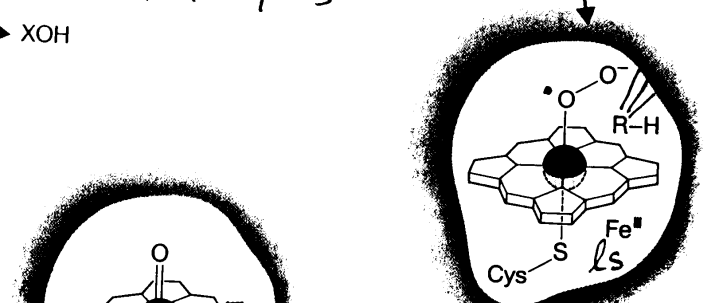
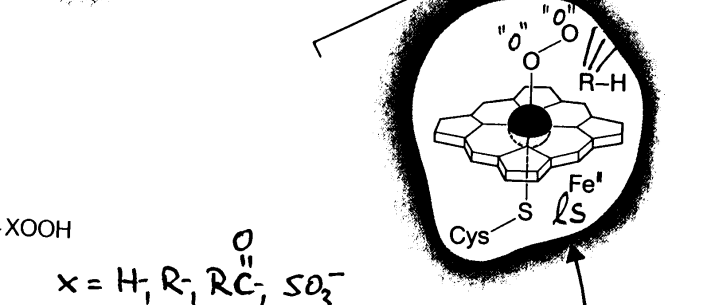
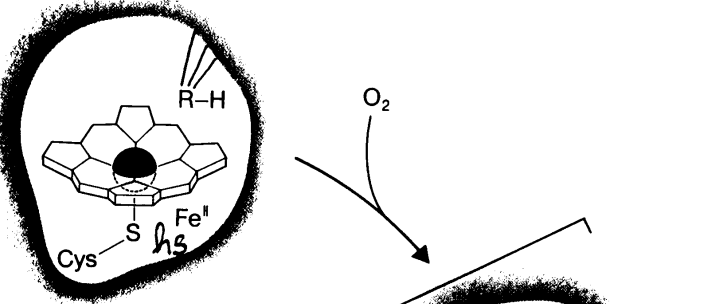
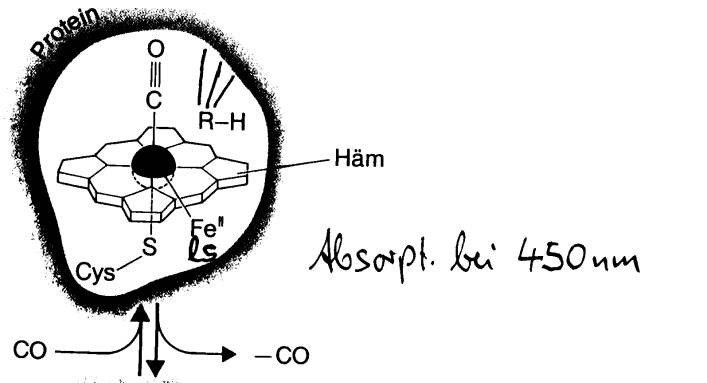
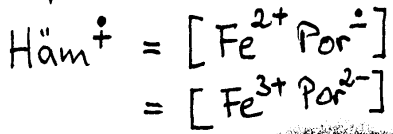


Katalysezyklus von Cytochrom P450:

Beachte gleichberechtigte Nomenklatur:



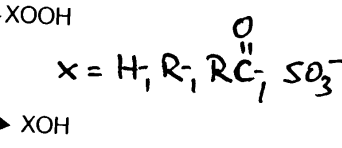
$\downarrow -1e^-$  (Oxidation)



START

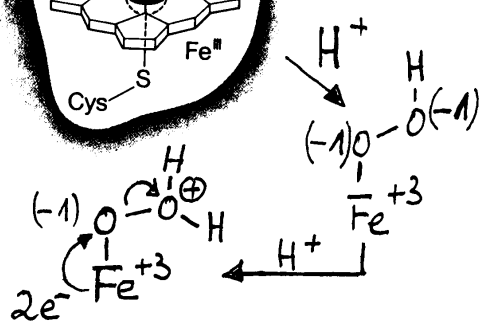
Rebound-Mechanismus

Peroxyd-Schritt



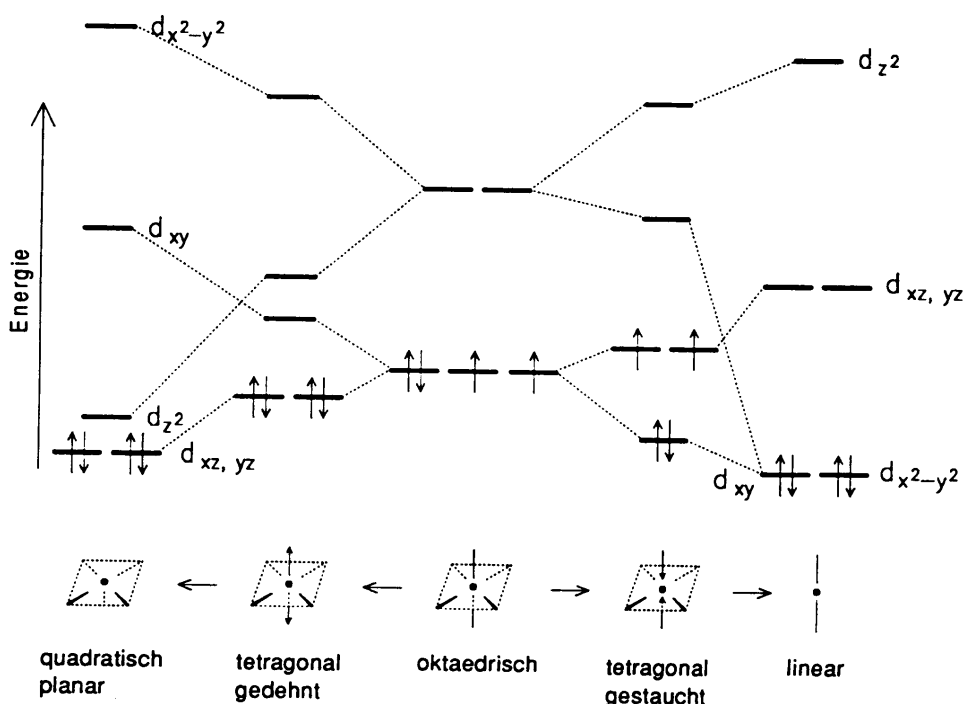
O-Atom-Überträger mit Möglichkeit zur Spin-Delokalisierung.

Redoxreaktion  
 $- \text{H}_2\text{O}$



### Die Katalyseschritte im P450:

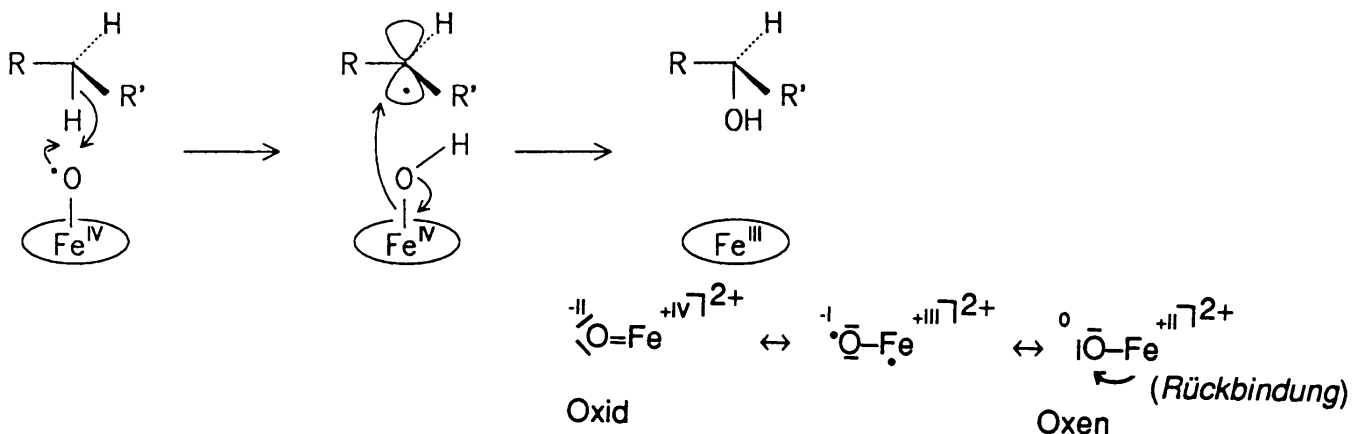
1. **START:** In dem oktaedrischen  $ls$ -Fe(III) Komplex (starke Ligandenfeldaufspaltung) dissoziiert der Aqualigand ab, so dass ein fünffach koordinierter  $hs$ -Fe(III)-Komplex entsteht (geringere Ligandenfeldaufspaltung). Der Halbraum nahe der sechsten Koordinationsstelle wird durch die räumliche Nähe des Substrates, z.B. Campher, abgeschirmt, das hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkung in die Proteintasche eingebettet ist.
  2. NADPH liefert über eine Kopplung mit Reduktase (Flavinderivate FMN, FAD, s.o.) ein Elektron für die Reduktion zum  $d^6$ - $hs$ -Fe(II) out-of-plane Zustand, der mit seinem Gesamtspin  $S = 2$  geradezu prädestiniert für die Reaktion mit Triplett-Sauerstoff ist.
  3. Die Koordination von  ${}^3O_2$  liefert die oktaedrische  $ls$ -Oxyform (vgl. Hämoglobin), deren Elektronenverteilung sich am treffendsten durch Koordination des Superoxid-Radikalanions an ein Fe(III)-Zentrum beschreiben lässt.
  4. Der Superoxid-Komplex geht nach Aufnahme eines weiteren Elektrons in einen sehr labilen Fe(III)-Peroxid-Komplex ( $\eta^2-O_2^{2-}$ ) über oder - nach Protonierung - in einen  $\eta^1$ -Hydroperoxid-Komplex Fe(III)-OOH.
  5. Der erneuten Protonierung am endständigen Peroxosauerstoffatom folgt die Redoxreaktion unter O-O-Spaltung und Eliminierung von Wasser. Die gebildete Fe(V)-Oxen-Spezies stabilisiert sich durch Ligand $\rightarrow$ Metall-Charge-Transfer, wobei sowohl der  $O^{2-}$  Ligand als auch der  $Por^{2-}$  Ligand zu den entsprechenden Radikalanionen oxidiert, das Eisen entsprechend zu  $d^4$ -Fe(IV) reduziert werden kann. Das größte Gewicht kommt der Oxyferryl-Fe(IV)-Form mit oxidiertem Por-Liganden ( $S = 1/2$ ) zu.
- Aus der Ligandenfeldaufspaltung eines in erster Näherung  $D_{4h}$ -symmetrischen Komplexes mit Oxid und Cysteinat als besonders stark gebundenen axialen Liganden ergibt sich ein Korrelationsdiagramm für  $d^4$ -Fe(IV), das sich durch Stauchung aus dem Oktaeder ableitet und mit vier Elektronen entsprechend einem Triplett-Grundzustand ( $S = 1$ ) besetzt ist.



6. Der sogenannte Peroxid-Shunt eröffnet einen Weg, bei dem der Oxenkomplex direkt, d.h. ohne Umweg über  $O_2 + 2e^-$ , aus Peroxiden (Oxenoiden, O-Überträgern) generiert werden kann. Daher dienen P450 Modellverbindungen auch als Katalysatoren für die Aktivierung von Peroxiden in der Oxidationskatalyse.

7. Von der Vielzahl möglicher Resonanzformulierungen für die Oxy-Hämgruppe haben für die P450 spezifische Reaktivität besonders diejenigen Gewicht, in denen der O-Radikalcharakter zum Ausdruck kommt:  $\bullet O-Fe(IV)Por^{2-}$  oder  $\bullet O-Fe(III)Por\bullet^-$

Man geht heute davon aus, dass der Einschub eines [O]-Atoms in die C-H-Bindung des Substrates nicht in konzertierter Weise über den Oxen-Mechanismus verläuft (Typ nucleophiler Angriff der C-H-Bindung auf das Oxen-O-Atom), sondern schrittweise über den sogenannten Rebound-Mechanismus: Das eisengebundene O-Radikal abstrahiert ein H-Atom vom Substrat in der Bindungstasche des Enzyms. Danach wird in rascher Folgereaktion ein OH-Radikal vom Eisenzentrum oxidativ auf das fixierte Substrat-Radikal übertragen.



### 3.7 Xanthin-Oxidase (Mo)

Molybdän ist das einzige 4d Metall mit biologischer Bedeutung:  $MoO_4^{2-}$  ist bei pH 7 recht gut in Wasser löslich (im Gegensatz zu Wolframat) und in seiner Oxidationswirkung selektiver als Chromat (carcinogen, mutagen). Die physiologisch relevanten Oxidationszustände des Molybdäns reichen von +4 bis +6, hierbei besitzt es eine gleichermaßen hohe Affinität zu O- und S-Liganden (Oxid/ Hydroxid, Sulfid / Thiolat).

Typisches Kennzeichen der Mo-Oxidasen: Sie katalysieren den O-Transfer auf ein 2-Elektronen-Substrat (C-H-Bindung oder Sulfit), wobei der übertragene Sauerstoff nicht aus  $O_2$  stammt (vgl. Fe + Cu-Oxygenasen), sondern aus Wasser, indem Einelektronenüberträger (Cytochrome, FeS-Cluster, Flavine, Pterine) an den Mehrelektronen-Redoxprozess angekoppelt werden.

#### • Struktur der Xanthin-Oxidase:

Die oxidierte Mo(VI)-Form besitzt einen Oxo-Liganden, einen Sulfido-Liganden, einen Endithiolat-Liganden aus der Seitenkette der reduzierten chinoiden Dihydropterins, den sogenannten Molybdopterin-Cofaktor. Das Endithiolat ist redoxaktiv, es lässt sich durch das Metallzentrum reversibel zum  $\alpha$ -Dithioketon oxidieren. Zwei Untereinheiten des Enzyms mit je einem Flavinadeninucleotid und zwei  $Fe_2S_2$ -Clustern als Elektronenreservoirs.

• **Funktion und Katalysemechanismus:**

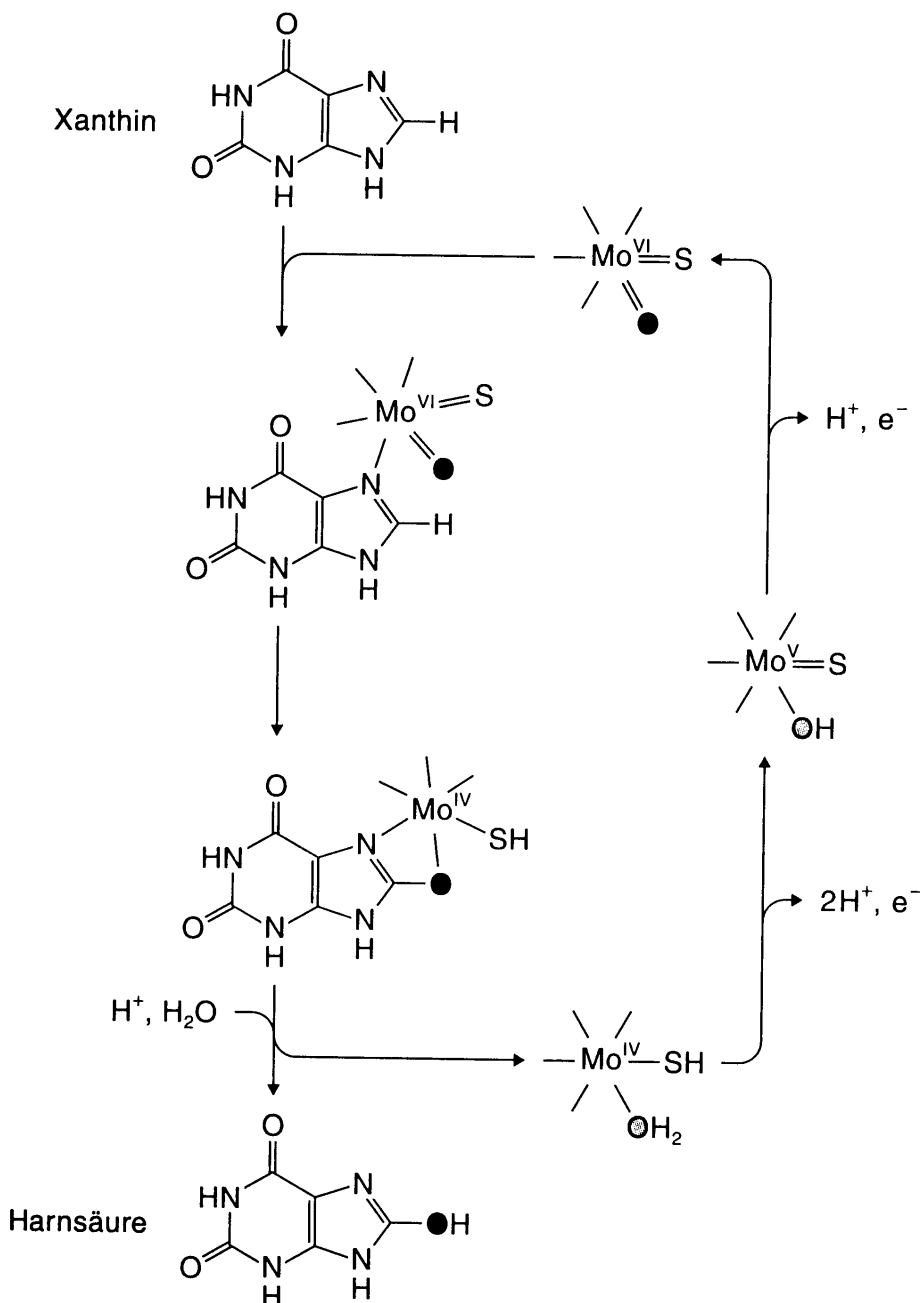
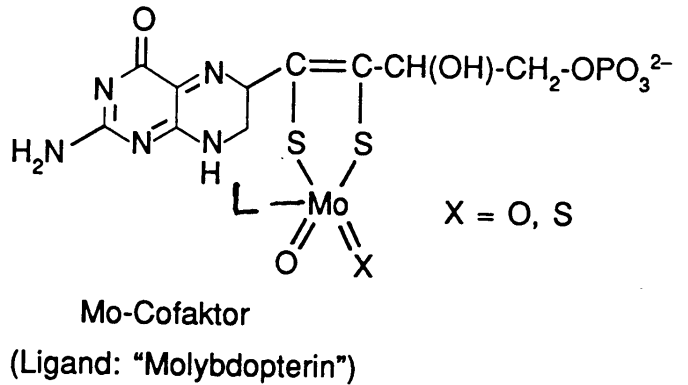
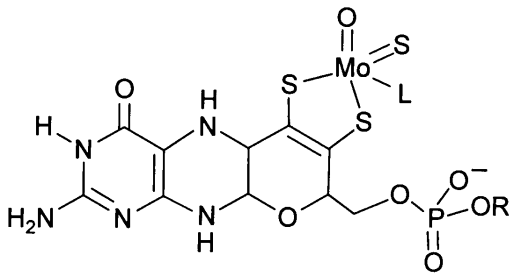
Die Oxidation von Xanthin zur Harnsäure ist ein wichtiger Schritt im Harnsäuremetabolismus.

Dysfunktion: →Gicht.

Wahrscheinliche Struktur des Molybdopterin-Cofaktors:

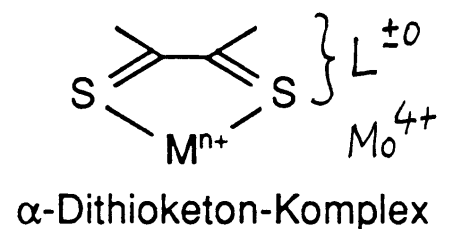
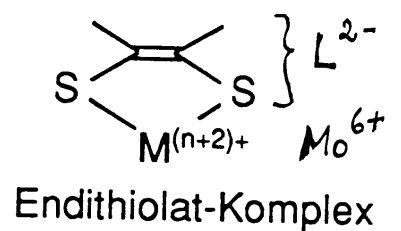
Mo-Cofaktor mit Molybdopterin (Endithiolat)

als Ligand. L = H<sub>2</sub>O oder Xanthin



Endithiolate sind  
ähnlich wie  
Endiolate und  
Endiamide  
redoxaktive Liganden!

So lässt sich das  
Endithiolat unter  
Abgabe von zwei  
Elektronen an das  
Metall zum  
 $\alpha$ -Dithioketon  
oxidieren:



### 3.8 Sulfit-Oxidase (Mo)

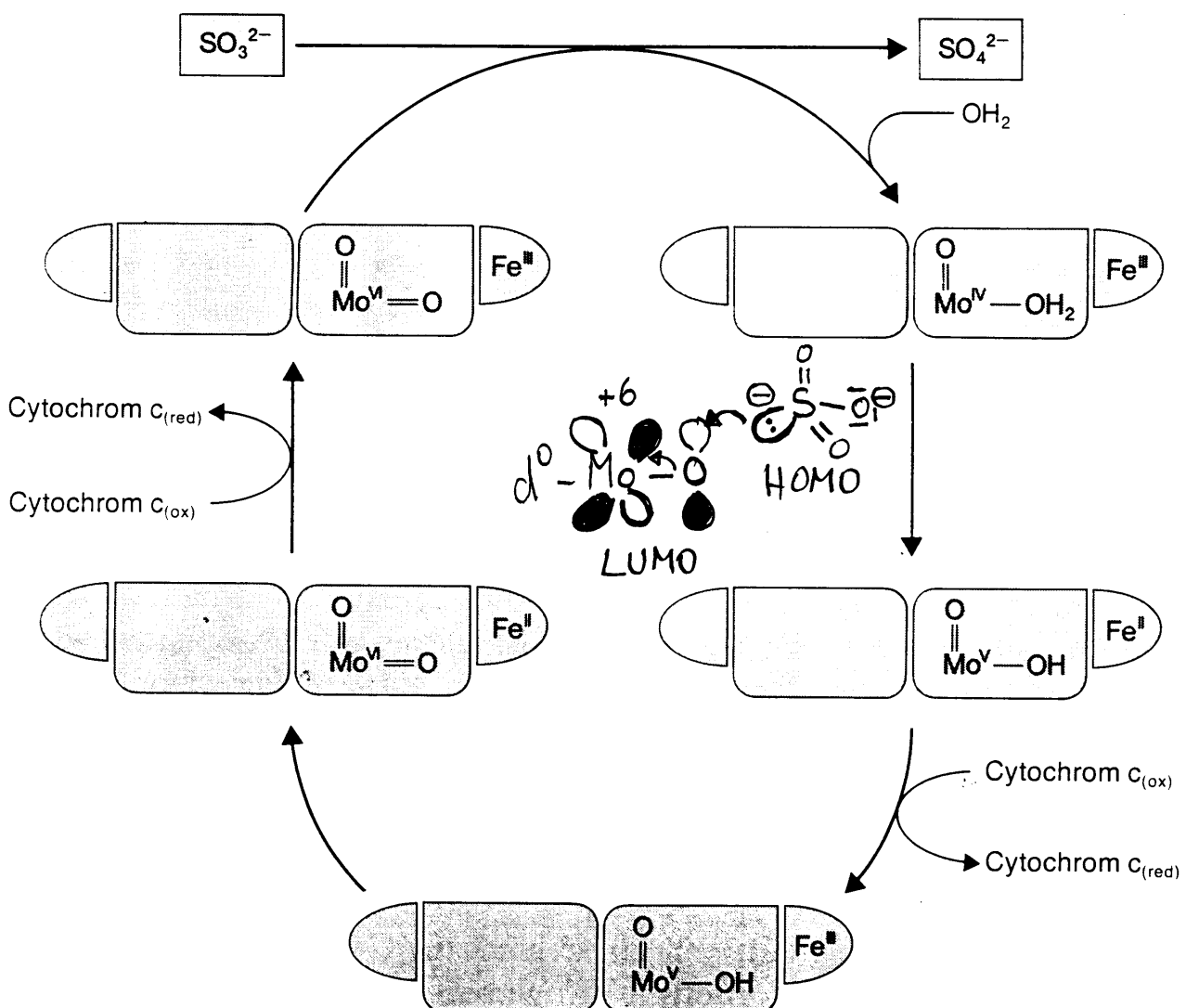
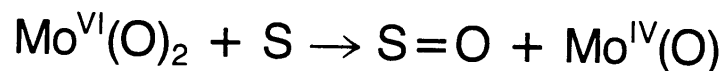
#### • Struktur der Sulfit-Oxidase:

Es handelt sich um ein Dimer. In der monomeren Untereinheit bindet der Molybdopterin-Ligand ebenfalls über das Endthiolat an Molybdän(VI), die oxidierte Form besitzt jedoch zwei Oxoliganden (keinen Sulfidliganden). Eine Hämgruppe (Cytochrom b) koppelt das Molybdänzentrum an das Cytochrom c als eigentliches Elektronenreservoir an.

#### • Funktion und Katalysemechanismus:

Oxidation von Sulfit zu Sulfat. Ist sie gestört, so treten Nervenstörungen auf. Sulfid greift mit seinem S-lone-pair in das LUMO der Mo=O Bindung eines Dioxomolybdän(VI)-Molybdopterin-Komplexes an. Es entsteht unter [O]-Transfer Sulfat und ein Monooxomolybdän(IV)-Komplex (zwei Elektronen von O<sup>2-</sup> landen auf dem Mo). Wasser koordiniert an der frei gewordenen Koordinationsstelle. Über ein Häm-Eisenzentrum (Cyt b) wird die Reoxidation des Molybdäns zu Mo(VI) bei gleichzeitiger Deprotonierung des Aqualiganden zum Oxoliganden vermittelt. Die zwei Elektronen werden (über das Häm) an die oxidierte Form eines Cytochrom c abgeführt. Als ESR-spektroskopisch beobachtbare Zwischenstufe wird ein d<sup>1</sup>-Mo(V)-Hydroxo(oxo)-Komplex durchlaufen.

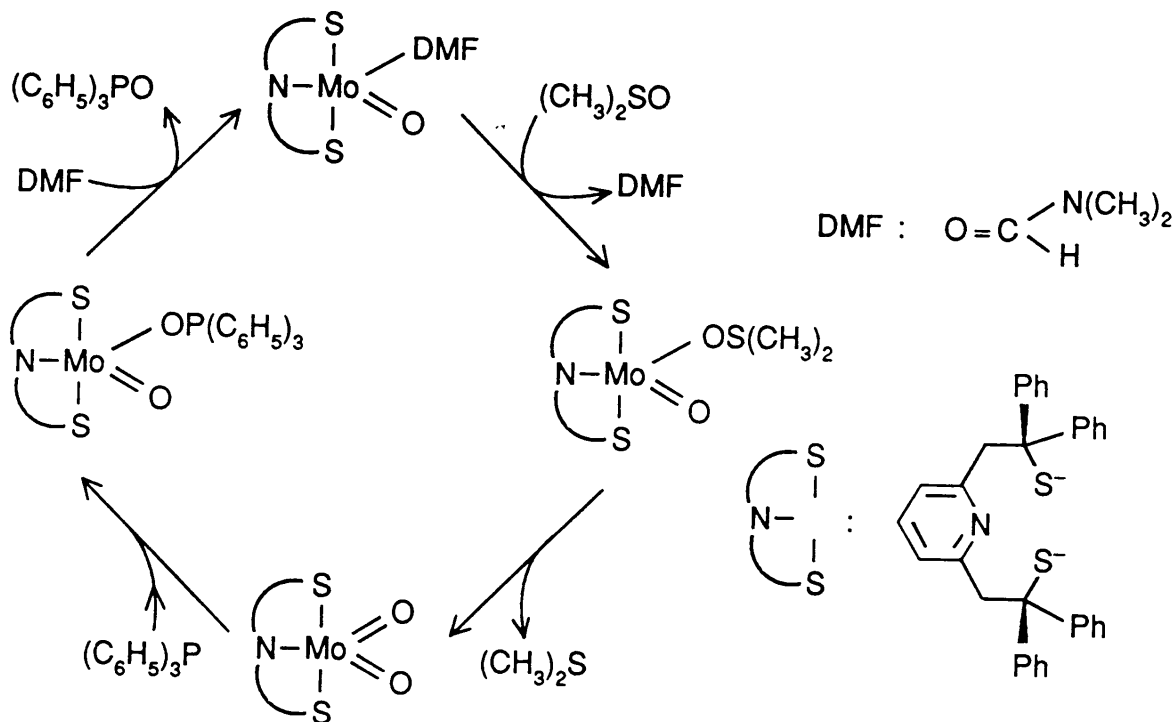
Prinzip des O-Transfer-Schrittes:





**Modellchemie:**

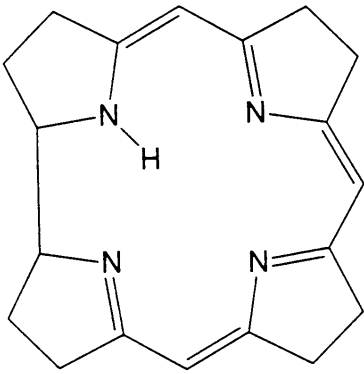
Molybdän(VI)-katalysierte Übertragung eines Sauerstoffatoms vom DMSO auf PPh<sub>3</sub> in DMF (nicht-physiologisch)

**3.9 Vitamin B<sub>12</sub> (Co)**

- **Aktives Zentrum:** Die biologisch relevante Gruppe der Cobalmine enthalten ein Cobalt-Zentrum in den Oxidationsstufen +1,+2 oder +3, das an das monoanionische Corrin-Ligandgerüst (Cor) gebunden ist. Die Cobalmine gehören zu den wenigen metallorganischen Biomolekülen mit einer bei pH 7 luft- und wasserstabilen Co-C Bindung.

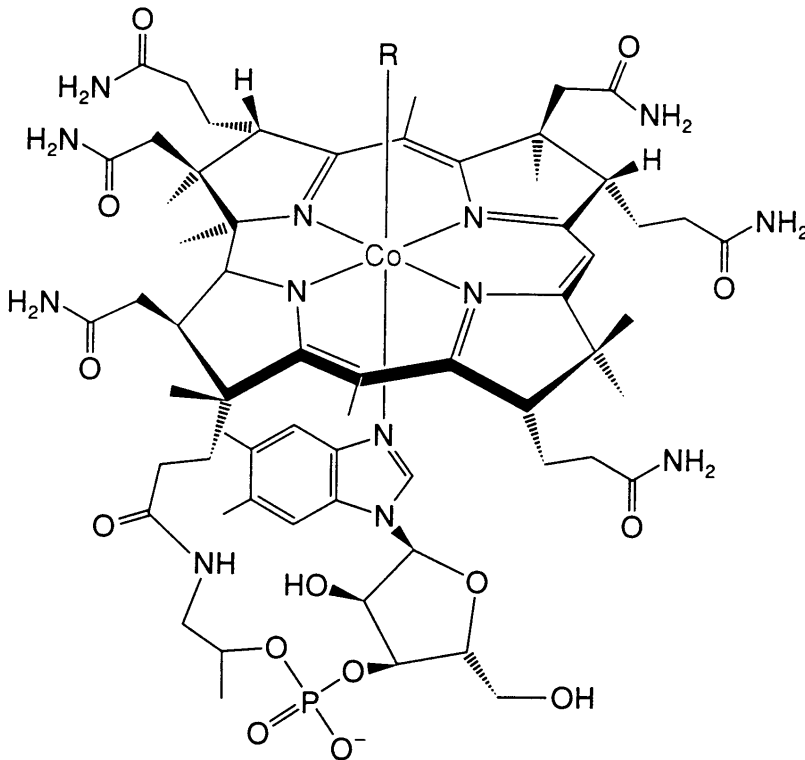
Cor unterscheidet sich von Por: Eine C<sub>1</sub>-Brücke zwischen A + D Ring im Por fehlt, Cor ist monoanionisch und nicht eben (Sattelkonformation im Komplex), das Cor-System ist weitgehend reduziert, alle äußeren C-Atome sind sp<sup>3</sup>-hybridisiert (9 Chiralitätszentren). Der Ligand erzeugt ein starkes Ligandenfeld (ls-Komplexe). Über einen Spacer ist ein Dimethylbenzimidazol-Ligand in der axialen Koordinationsstelle gebunden. Die zweite axiale Position wird im Vitamin B<sub>12</sub> von CN<sup>-</sup>, im biologisch relevanten Coenzym B<sub>12</sub> von einem 5'-Desoxyadenosylradikal belegt.

- **Funktion und Mechanismus:** Das Coenzym B<sub>12</sub> besitzt Mutase-Aktivität, d.h. es katalysiert 1,2-Kohlenstoff-Umlagerungen. erzeugt durch Co-C Homolyse reaktive Adenosylradikale, die an Enzym-Substraten ein H-Atom abstrahieren. Es wird in kinetisch kontrollierter Reaktion das sterisch leichter zugängliche H-Atom abstrahiert, nach Umlagerung in das thermodynamisch stabilere, höhersubstituierte Radikal erfolgt ein Rücktransfer von H.

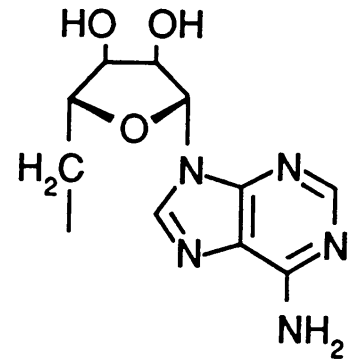


Corrin

- $R = CH_3$  : Methylcobalamin (MeCbl oder MeB<sub>12</sub>)
- CN : Cyanocobalamin (Vitamin B<sub>12</sub>)
- OH : Hydroxycobalamin
- H<sub>2</sub>O : Aquocobalamin
- R : 5'-Desoxyadenosylcobalamin (Coenzym B<sub>12</sub>)

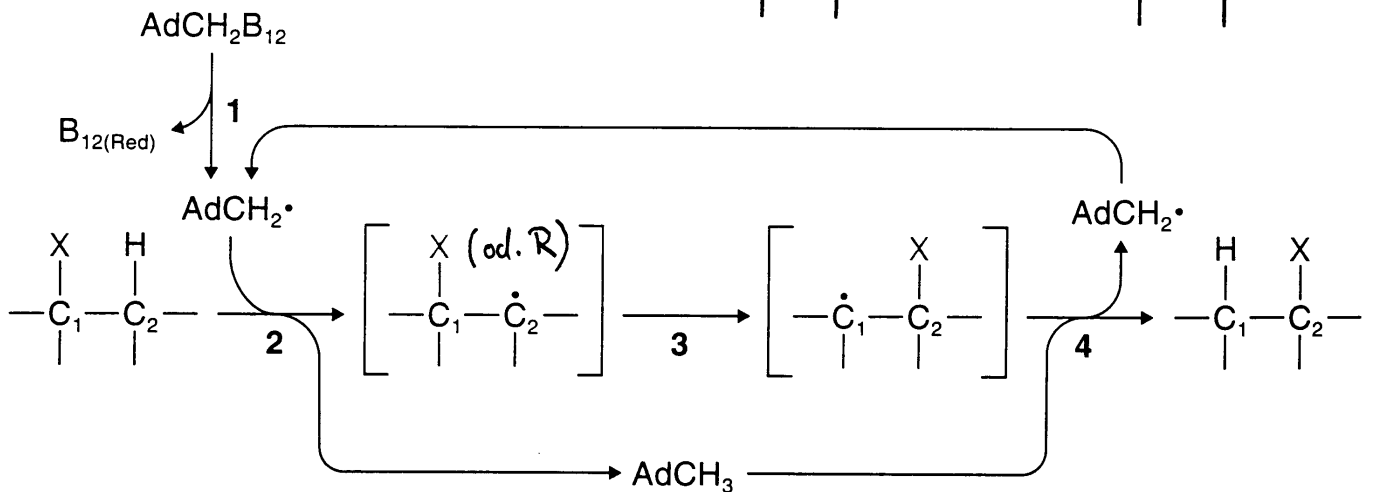
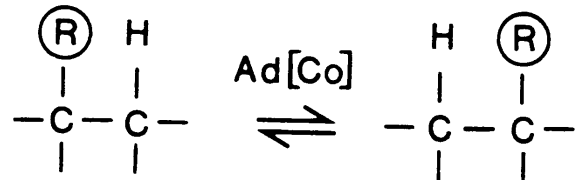


R = 5'-Desoxyadenosyl

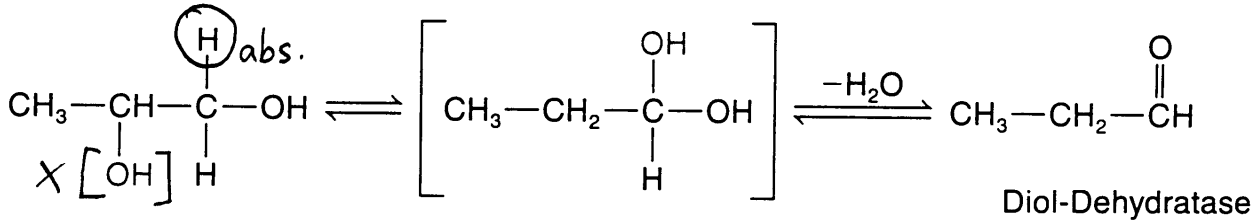
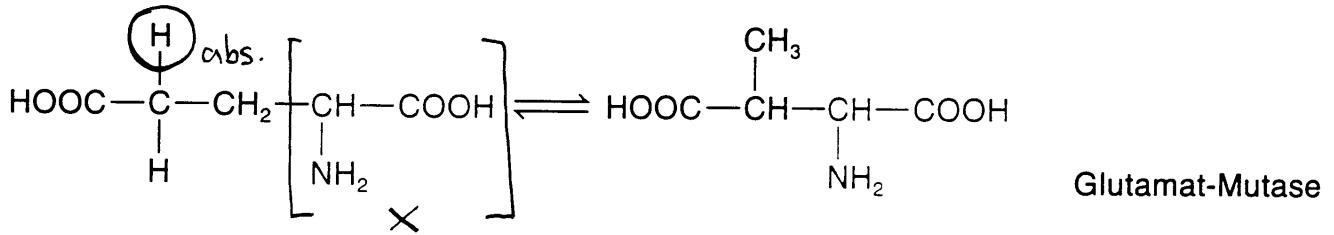


**Mutase-Aktivität:**

1,2-C-Umlagerungen über Radikale

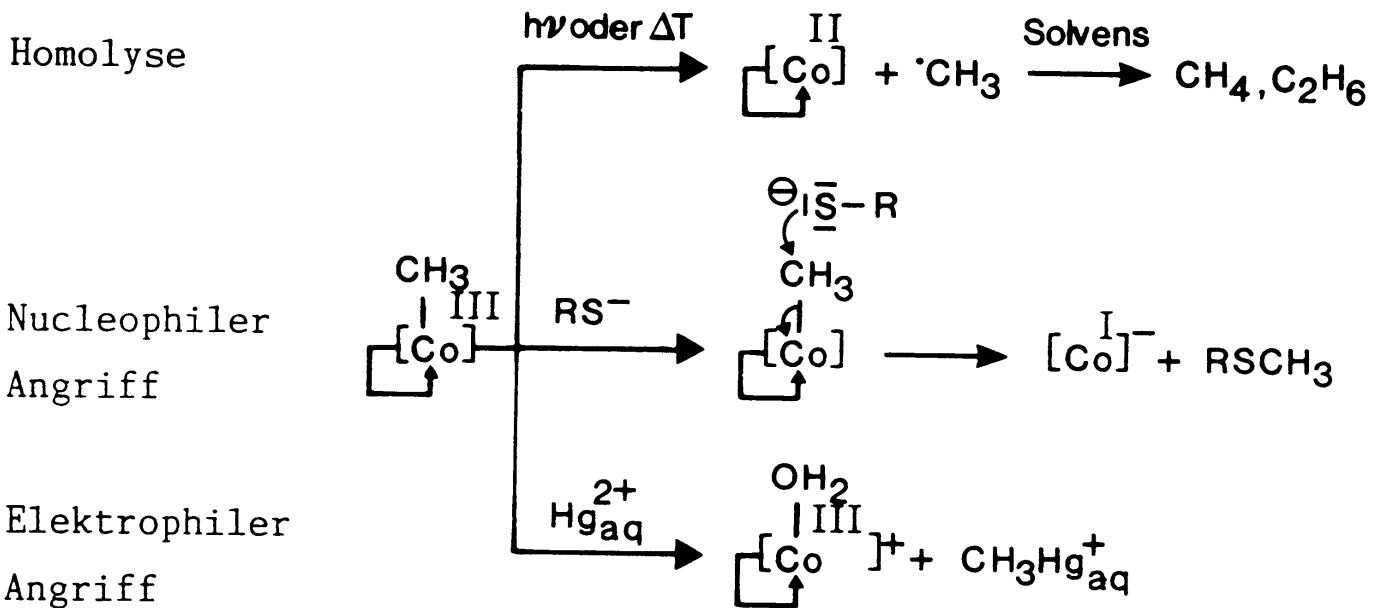


Beispiele für Coenzym B<sub>12</sub> abhängige, physiologische Umlagerungen:



• **Modellchemie:**

Die Co-C Bindung der Cobalamine lässt sich, je nach Art des angreifenden Substrates radikalisch (homolytisch) spalten oder aber polarisieren, wobei weiche Nucleophile wie Thiolat zur einer S-Methylierung (CH<sub>3</sub><sup>+</sup> Übertragung, z.B. bei der Biosynthese von Methionin aus Homocysteinat), weiche Elektrophile wie Hg<sup>2+</sup> dagegen zu einer Hg-Methylierung (CH<sub>3</sub><sup>-</sup> Übertragung, z.B. bei der Biosynthese des hochtoxischen MeHg<sup>+</sup><sub>aq</sub> Ions) führen.

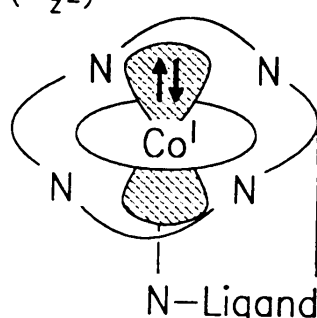
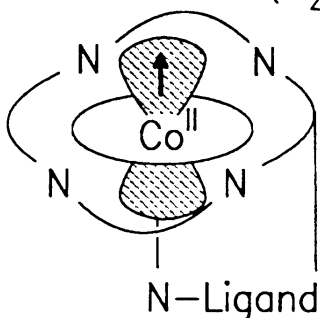


Radikalfänger: d<sup>7</sup> ls

Supernucleophil: d<sup>8</sup>.

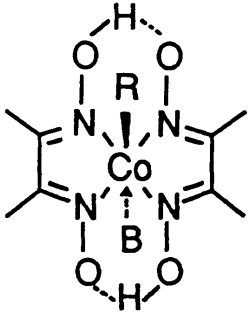
(d<sub>z<sup>2</sup></sub>)<sup>1</sup>

(d<sub>z<sup>2</sup></sub>)<sup>2</sup>

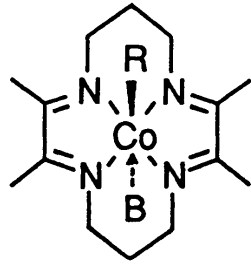


Die Bildung des metallorganischen Adenosyl-Cobalmins erfolgt durch nucleophilen Angriff der Metallbase (Super-Metallnucleophil) am Adenosyl-CH<sub>2</sub>-Triphosphat, mit Triphosphat als guter Abgangsgruppe.

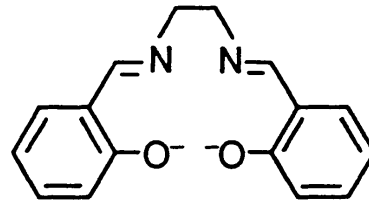
Als Modellkomplexe für Reaktivitätsstudien dienen Cobalamine selbst oder Cobaloxime etc.



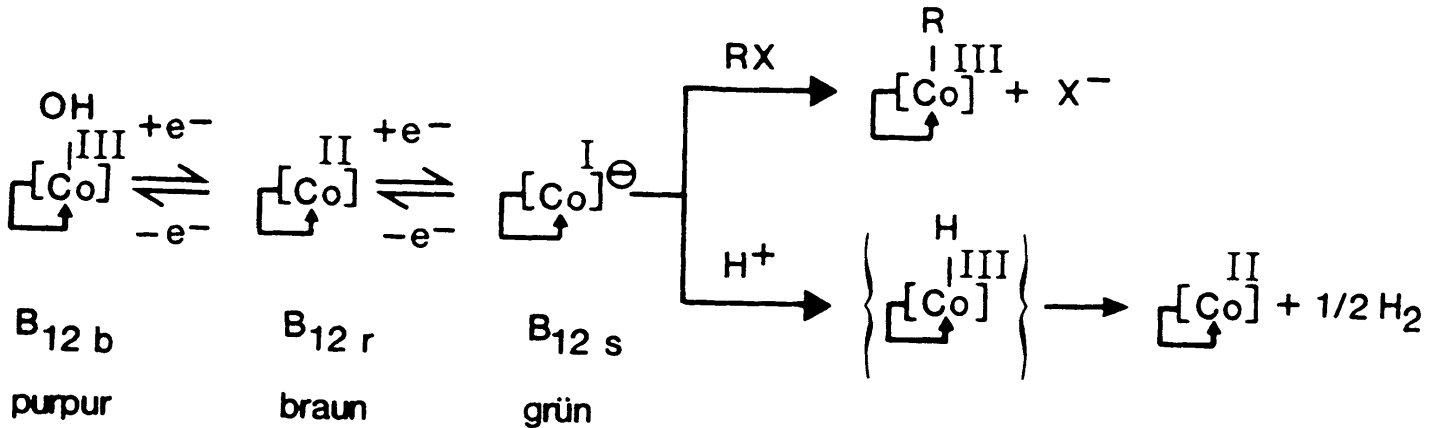
Cobaloxim



Costa-Komplex

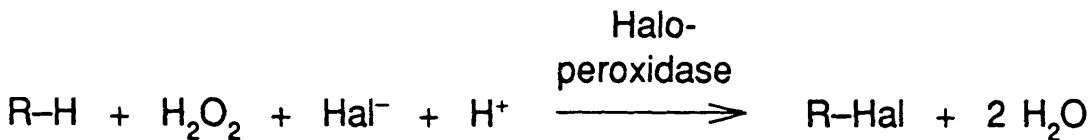


salen-Ligand



### 3.10 Bromperoxidase (V)

- Bedeutung und Vorkommen:** Haloperoxidasen katalysieren die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Halogenid-Ionen ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ) zum Zwecke der Chlorierung, Bromierung und Iodierung organischer Substrate. Biosynthese von Halogenorganen, z.B.  $\text{CHBr}_3$  über Hypobromit, u.a. natürlicher Biozide von Meeresorganismen etc.



R: organischer Alkyl-

Vanadium-Bromperoxidase enthält V(V)-Peroxid  
2 Histidin-Liganden und weitere 3 O/N-Liganden.  
Vermuteter Mechanismus:

