



BMBF - Förderschwerpunkt

## Erforschung der kondensierten Materie

Großgeräte der physikalischen  
Grundlagenforschung

### **XAFS-Untersuchungen an Metallproteinen und Metallkomplexen unter Berücksichtigung der Moleküldynamik**

Zuwendungsempfänger:	<b>Medizinische Universität Lübeck</b>
Projektleitung:	<b>Trautwein/Winkler(B)</b>
Förderkennzeichen:	05 SN8FLA/7
Förderzeitraum:	01.04.98 - 31.05.01
Zuwendung:	64.525 €[126.200 DM]
E-Mail:	trautwein@physik.mu-luebeck.de
Projekträger:	DESY-HS

#### **Genutzte Großgeräte:**

DESY - DORIS III

#### **Angaben zum Projekt:**

Veröffentlichungen:	7
Konferenzbeiträge:	6
Diplomarbeiten:	0
Dissertationen:	0
Habilitationen:	0
Patente:	0

## Schlussbericht - Kurzfassung

In der vergangenen Förderperiode wurden absorptionsspektroskopische Untersuchungen an CO Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans*, an Biotin Synthase und an einem oxoverbrückten Trieisenkomplex durchgeführt.

Das aktive Zentrum von CO Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans* wurde mittels Molybdän-, Kupfer- und Selen-K-Kanten-Röntgenabsorptionsspektroskopie untersucht. Es konnte die Struktur des aktiven Zentrums bestimmt werden. Die vergleichende Analyse von nativen und Substrat-inkubierten sowie von unterschiedlich aktiven Enzymproben leistet einen Beitrag zum Verständnis der Funktion des Zentrums enzymatischer Katalyse.

Biotin Synthase ist an der Synthese des Vitamins Biotin beteiligt. Im nativen Zustand enthält das Enzym einen [4Fe-4S] Cluster. Aufgrund der Sequenzanalyse scheint bei einem der Fe-Plätze einer der Schwefel-Liganden durch einen Sauerstoff- bzw. Stickstoff-Liganden ersetzt. Erste EXAFS-Messungen bestätigen diese Vermutung.

Polynukleare oxoverbrückte Eisenkomplexe sind Modellverbindungen für Eisen-Oxo-Proteine. Mittels EXAFS wurde die Ladungslokalisation bzw. -delokalisation eines Elektrons über drei Eisenzentren bei 22K bzw. 300K untersucht.

# Schlussbericht

**Zuwendungsempfänger:** MU Lübeck

**Projektleitung:** Prof. Dr. A.X. Trautwein/ Dr. H. Winkler

"XAFS-Untersuchungen an Metalloproteinen und Modellkomplexen unter Berücksichtigung der Moleküldynamik"

Zu den Aktivitäten des Instituts für Physik der medizinischen Universität zu Lübeck gehören u.a. röntgenabsorptionsspektroskopische (XAS) Untersuchungen an Metalloproteinen und biologisch relevanten Modellkomplexen. In der vergangenen Förderperiode wurden absorptionsspektroskopische Untersuchungen (1) an CO Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans*, (2) an Biotin Synthase und (3) an einem oxoverbrückten Tri Eisenkomplex durchgeführt.

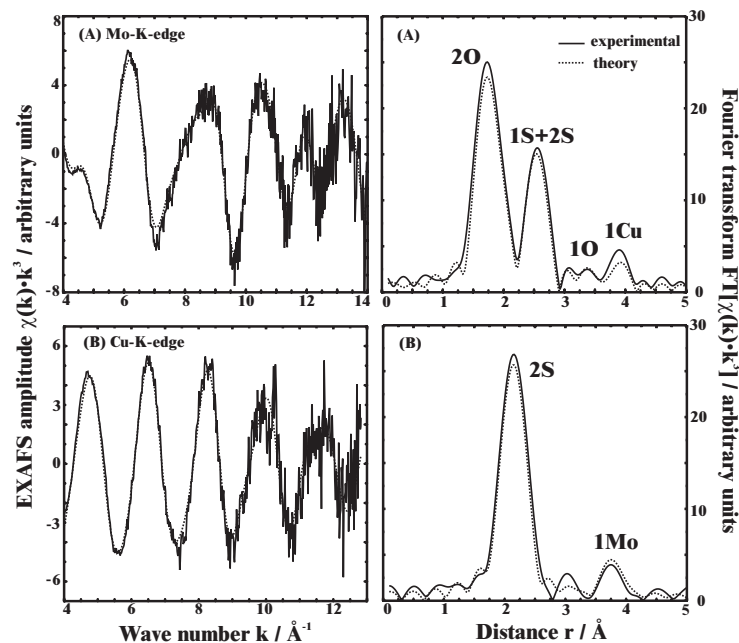
## 1. CO Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans*

CO Dehydrogenase (CODH) aus *O. carboxidovorans* ist ein Kupfer- und Selen-haltiges Molybdo-Eisen-Schwefel-Flavoprotein, das die Oxidation von CO zu CO<sub>2</sub> katalysiert. Es ist das Schlüsselenzym in der aeroben Nutzung von CO durch carboxidotrophe Bakterien. Die Gesamtstruktur des Enzyms wurde durch Röntgenkristallstrukturanalyse bestimmt (Dobbek, H.; Gremer, L.; Meyer, O.; Huber, R.; Proc. Natl. Acad. Sci. **96**, 8884 (1999)). Selbige Autoren zeigten auch den dinuklearen Charakter des aktiven Zentrums. Gingen erste Interpretationen von der Elementkombination Molybdän (Mo) und Selen (Se) aus (siehe auch Meyer, O.; Gremer, L.; Ferner, R.; Ferner, M.; Dobbek, H.; Gnida, M.; Meyer-Klaucke, W.; Huber, R.; Biol. Chem. **381**, 865 (2000)), so zeigen neuere Untersuchungen, daß das aktive Zentrum durch Molybdän und Kupfer (Cu) gebildet wird. Die EXAFS-Ergebnisse werden im folgenden dargelegt (neuere Kristallstrukturdaten siehe Dobbek, H.; Gremer, L.; Meyer, O.; Huber, R.; in Handbook of Metalloproteins Vol. 2, Eds. Messerschmidt, Huber, Poulos, Wieghardt, 1136-1147, Wiley 2001), wobei auf die nachstehenden Teilaspekte im Detail eingegangen wird:

- A. Struktur des aktiven Zentrums von nativer CODH,
- B. Strukturelle Veränderungen durch Substratinkubation,
- C. Struktureller Vergleich unterschiedlich aktiver Enzympräparationen,
- D. Selen in CODH und
- E. Zusammenfassung: mechanistische Implikationen.

### A. Struktur des aktiven Zentrums nativer CODH

Abbildung 1 zeigt die Feinstrukturen (EXAFS) der Mo- und Cu-K-Absorptionskanten. Experimentelle Daten sind als durchgezogene Linien, Anpassungen als gepunktete Linien dargestellt



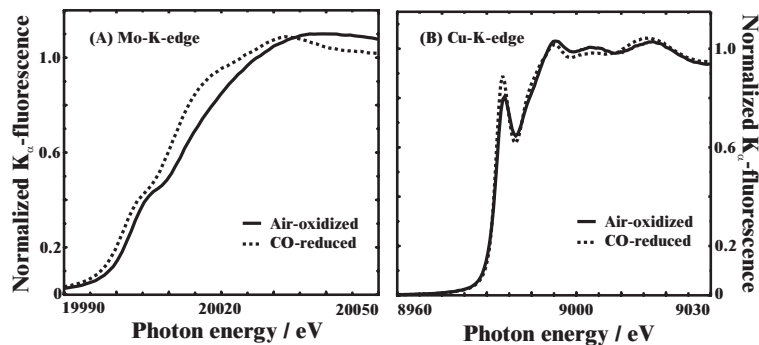
**Abbildung 1:** Mo- und Cu-EXAFS und Fourier-transformierte EXAFS-Spektren nativer CODH

Es ist deutlich zu erkennen, daß sowohl das Mo-Spektrum als auch das Cu-Spektrum einen Beitrag bei ca. 3.7 Å aufweisen, der als Metall-Metall-Abstand zu identifizieren ist. Durch simultane Anpassung beider Spektrum wurde ein detailliertes Modell des aktiven Zentrums erhalten. Insgesamt ergibt sich folgendes Bild (siehe Abb. 5A): Mo ist von zwei Sauerstoff- und drei Schwefelatomen umgeben. Die beiden Schwefelatome bei ca. 2.5 Å lassen sich als Teil eines an das Mo koordinierenden Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotids (MCD)

interpretieren. Der Schwefelbeitrag mit kürzerem Abstand zum Mo (ca. 2.3 Å) verbrückt Mo und Cu, und der Mo-Cu-Abstand ergibt sich zu ca. 3.7 Å. Der Schwefel-Kupferabstand folgt aus dem Cu-EXAFS zu ca. 2.2 Å. Er ist nicht aufgelöst mit einem weiteren Schwefelbeitrag, der vermutlich auf einen Cysteinschwefel zurückzuführen ist, der kovalent ans Cu-Ion gebunden ist. Ein weiteres Sauerstoffatom in ca. 3.5 Å Abstand zum Mo-Zentrum wurde als Glutamatsauerstoff interpretiert.

## B. Strukturelle Veränderungen durch Substratinkubation

Inkubation nativer CODH mit dem Substrat CO führt zu strukturellen Veränderungen am binuklearen aktiven Zentrum. Dies ist bereits aus der Betrachtung der Mo- und Cu-K-Kanten ersichtlich. Abbildung 2 zeigt die normierten Mo- (links) und Cu- (rechts) K-Kanten für natives (air-oxidized, durchgezogene Linien) und CO-inkubiertes (CO-reduced, gepunktete Linien) Enzym.



**Abbildung 2:** Mo- und Cu-K-Kanten nativer (air-oxidized) CODH und Substrat-inkubierter (CO-reduced) CODH.

Im Zuge der CO-Inkubation verschiebt sich die Mo-K-Kante zu niedrigerer Energie, d.h. das Mo-Zentrum wird reduziert. Die Kantenpositionen sind mit dem Übergang Mo(+VI) → Mo(+IV) vereinbar. Fernerhin ist die Schulter im ansteigenden Teil der Mo-K-Kante im Substrat-inkubierten Fall schwächer ausgeprägt als bei nativer CODH. Diese Schulter (Dipol-„verbotener“ elektronischer Übergang 1s → 3d) kann mit der Anzahl terminaler Oxogruppen in Verbindung gebracht werden. Eine Verringerung der Intensität dieses Übergangs spricht somit dafür, daß die CO-Inkubation zu einer Reduzierung der Anzahl terminaler Oxogruppen am Mo führt. Auch die Cu-K-Kanten sind aufschlußreich. Der scharfe Peak, der sowohl in nativer als auch CO-inkubierter CODH präsent ist, ist charakteristisch für Cu(+I). Seine Intensität ist mit der Koordinationsgeometrie korreliert. In beiden Fällen ist Cu von zwei Liganden umgeben, jedoch scheint die Zugabe von Substrat zu einer Linearisierung der S-Cu-S-Anordnung zu führen (Zunahme der Peakintensität).

Abbildung 3 zeigt die Mo- und Cu-EXAFS-Spektren für CO-reduzierte CODH. Da im Cu-Spektrum kein Metal-Metal-Abstand zu identifizieren ist („Verschmierung“ des Mo-Beitrags auf Grund höherer Photoreduktion nahe der Cu-K-Kante verglichen mit Mo-K-Kante), ist es nicht möglich, eine simultane Anpassung der beiden Spektren vorzunehmen. Allerdings lassen sich die Spektren getrennt auswerten und zu einem Gesamtbild zusammenfügen. Die identifizierten Rückstreubeiträge sind in Abbildung 3 gekennzeichnet.

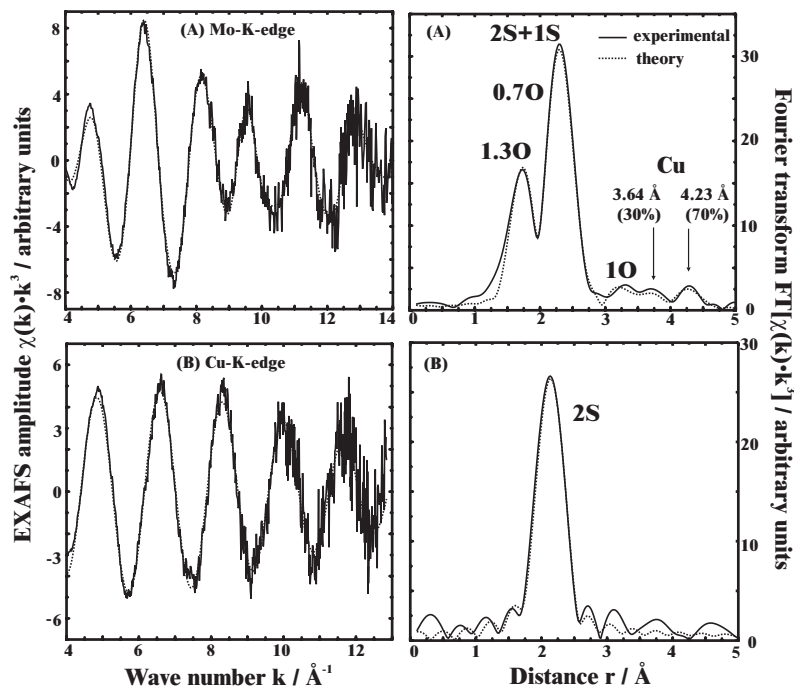


Abbildung 3: Mo- und Cu-EXAFS und Fourier-transformierte EXAFS-Spektren CO-inkubierter CODH.

Die Auswertung des Mo-Spektrums zeigte, daß die CO-Inkubation nicht zu einer vollständigen Reduktion des Mo-Zentrums führte, sondern nur zu ca. 70% (Aufspaltung des Cu-Beitrags: 0.3 Cu in einem mit dem nativen Zustand korrespondierenden Mo-Cu-Abstand). Das strukturelle Modell für den reduzierten Anteil ist in Abbildung 5B dargestellt. Im Vergleich zur nativen Probe können die folgenden wesentlichen strukturellen Veränderungen festgestellt werden:

- Verlängerung des Mo-Cu Abstands:  $3.7 \rightarrow 4.2 \text{ \AA}$
- Verringerung der Anzahl an „kurz“ gebundener Oxogruppen (siehe auch Kantenanalyse oben):  $2 \rightarrow 1 =\text{O}$
- Auftreten eines Sauerstoffs in längerem Abstand (vermutlich Wasser):  $0 \rightarrow 1 -\text{OH}_2$

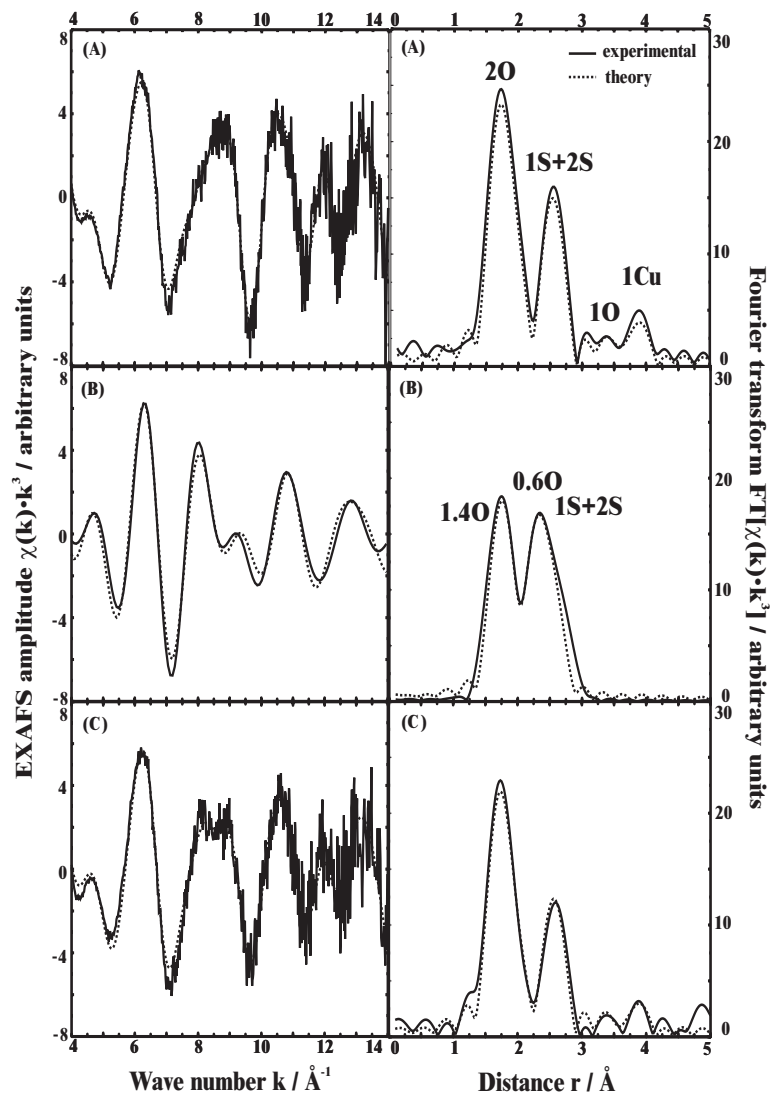
Am Cu hingegen sind – wie die obige Kantendiskussion bereits vermuten ließ – kaum strukturelle Änderungen in der ersten Koordinationsschale erkennbar.

### **C. Struktureller Vergleich unterschiedlich aktiver Enzymproben**

Verschiedene Proben nativer CODH weisen unterschiedliche Aktivitäten auf. Es wurden die Mo-XAS-Spektren dreier Enzympräparationen (spezifische Aktivitäten 4, 16 und 23 units/mg; 1 unit ist diejenige Enzymaktivität, bei der bei 30°C 1µmol Substrat pro Minute oxidiert) analysiert. Interessanterweise lassen die Mo-XAS-Spektren von Proben verschiedener Aktivität systematische Trends erkennen, die zu den beiden folgenden Annahmen führten:

- Die Probe mit höchster Aktivität (23 units/mg) stellt eine katalytisch vollständig kompetente Enzympräparation dar. Diese Probe wurde in den Abschnitten A und B diskutiert; das Modell für das aktive Zentrum im nativen Enzym ist in Abbildung 5A gezeigt.
- Die anderen Präparationen stellen Zweikomponentenmischungen aus der aktiven Spezies (23 units/mg) und einer inaktiven Spezies dar, wobei der Anteil aktiver Spezies durch den Wert der spezifischen Aktivität reflektiert wird (23 units/mg = 100%, 16 units/mg = 70%, 4 units/mg = 17% aktiv).

Diese Annahmen konnten durch eine Differenz-EXAFS-Analyse verifiziert werden (Abbildung 4). Abbildung 4A zeigt das bereits aus Abschnitt A bekannte Spektrum der 23 units/mg – Probe, die wir zu 100% aktiv annehmen (Modell: Abbildung 5A). Zieht man vom Spektrum der 4 units/mg – Probe nun 17% der aktiven Spezies ab und normiert das so erhaltene Differenzspektrum (nach vorhergehender Fourier-Filterung der signifikanten Beiträge), so erhält man das in Abbildung 4B dargestellte Spektrum des inaktiven Anteils. Aus diesem Spektrum läßt sich ein strukturelles Modell für inaktive CODH ableiten (Abbildung 5C). Dieses Vorgehen ist gerechtfertigt, da man mit den so

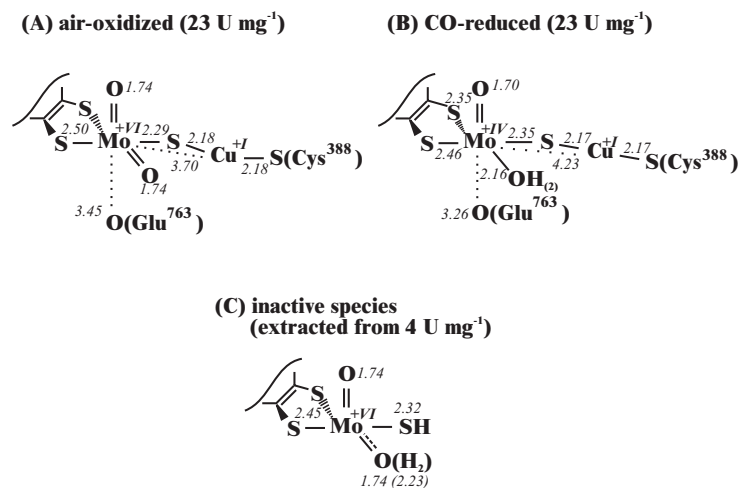


**Abbildung 4:** Mo-EXAFS und Fourier-transformierte EXAFS-Spektren nativer CODH mit verschiedenen Aktivitäten: (A) 23 units/mg (aktive Spezies), (B) inaktive Spezies (extrahiert aus dem Spektrum von 4 units/mg), (C) Reproduktion des experimentellen Spektrums der 16 units/mg – Probe.

erhaltenen Modellen für aktive und inaktive CODH das experimentelle Spektrum der Probe mit 16 units/mg ohne jede Anpassung einwandfrei reproduzieren kann (Abbildung 4C).



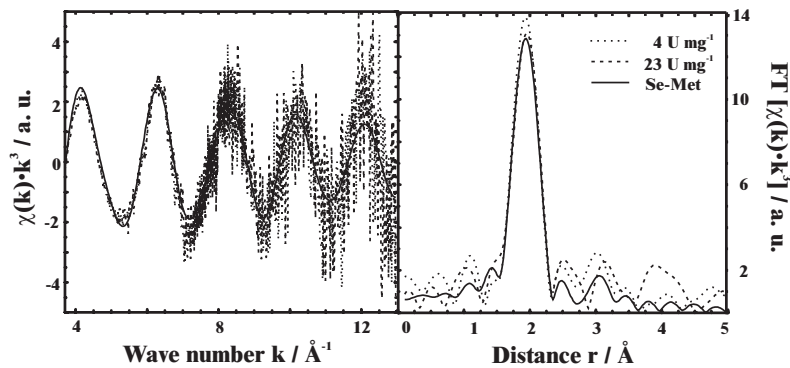
Vergleicht man nun die Modelle für aktive und inaktive CODH (Abbildungen 5A und 5C), so wird ersichtlich, daß der wesentliche Unterschied darin besteht, daß in inaktiver CODH das Cu-Zentrum (Mo-Cu-Abstand ca. 3.7 Å) fehlt. Die strukturellen Veränderungen in der direkten Koordinationsumgebung des Molybdäns sind nur gering. Sowohl aktive als auch inaktive CODH zeigen im Mittel zwei Sauerstoff- und drei Schwefelliganden des Molybdäns



**Abbildung 5:** Strukturelle Modelle: (A) aktive CODH nativ, (B) aktive CODH CO-inkubiert, (C) inaktive CODH.

#### D. Selen in CODH

Frühere kristallographische Untersuchungen an CODH postulierten Se im Abstand von ca. 3.8 Å vom Mo. Aus diesem Grund wurden die nativen Enzymproben mit 23 und 4 units/mg spezifischer Aktivität gleichfalls an der Se-K-Absorptionskante untersucht. In beiden Fällen erhält man lediglich einen Beitrag zweier Kohlenstoffatome in einem Abstand Se-C von ca. 1.9 Å. In Abbildung 6 sind die Se-EXAFS der beiden Enzymproben mit den Rückstreubeiträgen der dem Se nächsten drei Kohlenstoffatome in Selenomethionin (erhalten aus einer Messung einer Selenomethionin-Pulverprobe) verglichen. Es ist offensichtlich, daß diese Kohlenstoffbeiträge die experimentellen Befunde für die Enzymproben sehr gut reproduzieren. Wir folgern, daß Se überwiegend als Selenomethionin in CODH inkorporiert wurde und nicht in der Nähe des Molybdäns gebunden ist.



**Abbildung 6:** Se-EXAFS und Fourier-transformierte EXAFS-Spektren. Vergleich der experimentellen Spektren nativer CODH niedriger (4 units/mg) und hoher (23 units/mg) spezifischer Aktivität mit dem Rückstreubeitrag der dem Se nächsten drei Kohlenstoffatome in Selenomethionin (Se-Met).

### E. Zusammenfassung: mechanistische Implikationen

Die Mo- und Cu-Spektren hochaktiver, nativer CODH (Abschnitt A) belegen, daß das binukleare katalytisch aktive Zentrum des Enzyms aus der ungewöhnlichen Elementkombination Mo und Cu gebildet wird.

Die Se-Spektren (Abschnitt D) zeigen einwandfrei, daß Se nicht an der Architektur des aktiven Zentrums beteiligt ist, sondern vermutlich als Selenomethionin in das Protein eingebaut wird.

Die Mo- und Cu-Spektren CO-inkubierter CODH (Abschnitt B) lassen folgende Schlußfolgerungen zu:

- Mo ist das redoxaktive Zentrum.
- Eine Mo-gebundene Oxogruppe dient als Sauerstoffquelle für die Substratoxidation.
- Der Mo-Cu-Abstand ist sehr flexibel und ist bedeutend größer in CO-reduzierter als in nativer CODH.
- Cu ist nicht am Redoxprozess beteiligt und unterliegt kaum strukturellen Veränderungen.

Welche Funktion Cu im Zuge der Katalyse besitzt, bleibt aus diesen Daten zunächst ungeklärt.

Die Analyse der Mo-Spektren verschieden aktiver CODH-Präparationen resultierte jedoch in einem strukturellen Modell für inaktive CODH. Gegenüber aktiver CODH fehlt hier das Cu-Zentrum. Hieraus leitet man ab, daß das Cu-Zentrum essentiell für die Funktionalität des aktiven Zentrums ist. Vermutlich besteht die Funktion in einer strukturellen Fixierung des Mo-Redoxzentrums und in einer Aktivierung des Substrats CO.

Abschließend sei erwähnt, daß es durch die Differenz-EXAFS-Analyse gelungen ist, die Enzymprobe mit 23 units/mg als katalytisch vollständig kompetente Präparation zu

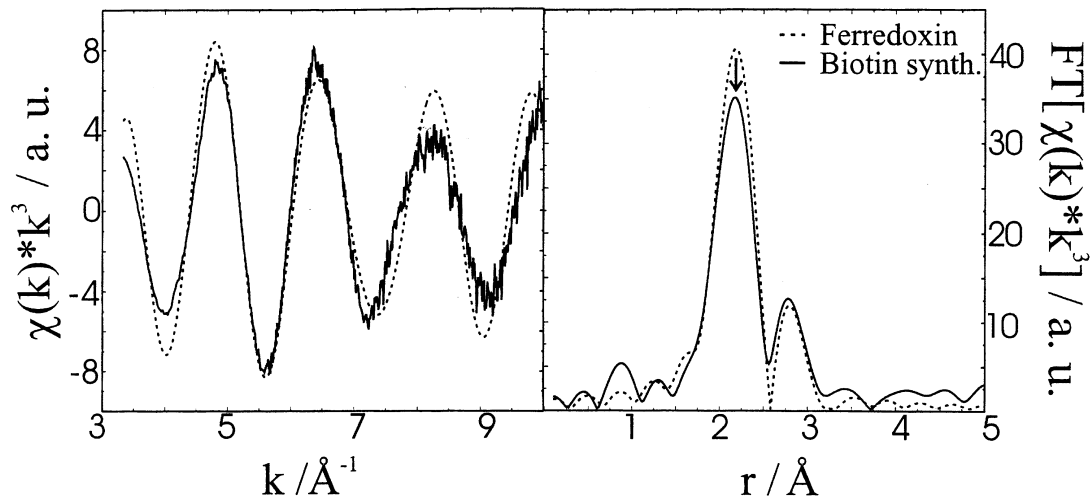
identifizieren. Dies rechtfertigt, sich in Zukunft bei strukturellen Untersuchungen auf diese CODH-Präparation zu konzentrieren.

## **2. Biotin Synthase**

Biotin Synthase ist an der Synthese des Vitamins Biotin beteiligt. Das aerob gereinigte Enzym von *E. coli* ist ein Homodimer, wobei jedes der beiden Monomere einen [2Fe-2S] Cluster enthält. Aufgrund der Sequenzanalyse scheint bei einem der Fe-Plätze einer der Schwefel-Liganden durch einen Sauerstoff- bzw. Stickstoff- Liganden ersetzt. Um diese Vermutung zu prüfen, wurden EXAFS Messungen an (i) aerob präparierter Biotin Synthase und (ii) an 2Fe-Ferredoxin von *Synechocytis PCC 6803* an der EMBL EXAFS beamline D2 aufgenommen. Das 2 Fe-Ferredoxin diente als Referenzprobe, da hier beide Fe-Plätze ausschließlich mit Schwefel ligandiert sind. Die Spektren wurden mit EXPROG und EXCRRU98 analysiert.

In Abb. 7 (links) wird das  $k^3$ -gewichtete EXAFS Signal von Biotin Synthase (durchgezogene Linie) mit dem entsprechenden (gemittelten) Signal von Ferredoxin verglichen. In Abb. 7 (rechts) werden die hieraus resultierenden Radialverteilungen der Rückstreuatome der beiden Proben miteinander verglichen. In Biotin Synthase ist die Rückstreuamplitude der ersten Koordinationsschale deutlich geringer als bei Ferredoxin, was darauf hinweist, daß bei Biotin Synthase ein Schwefel-Ligand durch einen leichteren Rückstreuer (z. B. O oder N) ersetzt ist oder diese Bindungsstelle überhaupt nicht besetzt ist.

Die normierten Fe-K Absorptionskanten von Biotin Synthase und Ferredoxin (hier nicht gezeigt) weisen beide bei 7112 eV einen Vorkantenpeak auf, der charakteristisch für tetraedrische Ligandenkoordination des Zentralatoms ist (A.L. Roe et al., JACS 106, 1676 (1984)).



**Abb. 7:** Experimentelles EXAFS Spektrum von Biotin Synthase und gemittelt EXAFS Spektrum von 2 Fe-Ferredoxin (links). Fourier Transformierte (rechts).

### 3. $\mu^3$ -Oxotrieisen-Komplex $[\text{Fe}_3\text{OL}_3]$

Polynukleare Eisenkomplexe, insbesondere oxoverbrückte Polyeisen-Aggregate sind Modellverbindungen für Eisen-Oxo-Proteine, Katalysatoren oxidativer und Inhibitoren korrosiver Vorgänge. Mittels EXAFS wurden die temperaturabhängigen strukturellen Eigenschaften des gemischtvalenten Eisenkomplexes  $[\text{Fe}_3\text{OL}_3]$  untersucht. "L" ist ein zweifach negativ geladener fünfzähliger Ligand, der über fünf Stickstoffatome das Eisen koordiniert. Formal enthält der Cluster ein  $\text{Fe}^{2+}$ -Zentrum und zwei  $\text{Fe}^{3+}$ -Zentren; Mößbauer-spektroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß das "Überschußelektron" temperaturabhängig über die drei Eisenzentren delokalisiert ist. Um die temperaturabhängige Ladungsdelokalisation mit strukturellen Eigenschaften des Komplexes zu korrelieren, wurden EXAFS Messungen bei 22 Kelvin und bei Raumtemperatur durchgeführt. In Tab. 1 werden Fitparameter der Tief- und Raumtemperaturspektren verglichen. Die einzelnen Fe-Ligandenabstände lassen sich selbst bei 22 K, wo Mößbauerspektroskopisch unterschiedliche Elektronenlokalisation auf den drei Fe-Plätzen detektiert wurden, nicht auflösen. Bei Raumtemperatur deutet sich die komplette Ladungsdelokalisation über den Cluster durch die relativ großen Debye-Waller-Faktoren bei den Fe-Fe Abständen an.

**Tab. 1:** Fitparameter von [Fe<sub>3</sub>OL<sub>3</sub>]

	T = 22K		T = 300K	
	Abstand r/ Å	Debye-Waller- Faktor $2\sigma^2/\text{Å}^2$	Abstand r/ Å	Debye-Waller- Faktor $2\sigma^2/\text{Å}^2$
$\mu^3$ -O-Fe	1.844(6)	0.012(2)	1.840(5)	0.012(2)
Pyridin-N-Fe	2.066(6)	0.012(1)	2.109(4)	0.015(1)
Amid-N-Fe	2.128(6)	0.012(1)	2.109(4)	0.015(1)
Tetrazol-N-Fe	2.128(6)	0.012(1)	2.109(4)	0.015(1)
Fe-Fe	3.265(3)	0.009(1)	3.281(4)	0.019(2)

## Schlussbericht - Liste der Veröffentlichungen

### Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

1. P. Konarev, A. Menushenkov, K. Klementev, W. Meyer-Klaucke, M. Gnida, A. Tsvyashchenko, L. Fomicheva, „EXAFS-Study of  $Y_{1-x}Yb_xNi_2B_2C$ , synthesized at high pressure“, HASYLAB Jahresbericht 1999, Teil 2, S. 433f.
2. M. Gnida, R. Ferner, O. Meyer, A.X. Trautwein, W. Meyer-Klaucke, „Molybdenum K-edge spectra of CO dehydrogenase of *Oligotropha carboxidovorans*“, HASYLAB Jahresbericht 1999, Teil 2, S. 435f.
3. M. Gnida, W. Meyer-Klaucke, V. Schünemann, H. Winkler, R. Saalfrank, A.X. Trautwein, „Temperature dependent EXAFS of a triiron complex – a model for the electronic properties of di- or polynuclear oxo-bridged iron proteins“, HASYLAB Jahresbericht 1999, Teil 2, S. 441f.
4. O. Meyer, L. Gremer, R. Ferner, M. Ferner, H. Dobbek, M. Gnida, W. Meyer-Klaucke, R. Huber, „The role of Se, Mo and Fe in the structure and function of carbon monoxide dehydrogenase“, Biol. Chem., Vol. 381, S. 865ff. (2000).
5. M. Gnida, R. Ferner, L. Gremer, O. Meyer, W. Meyer-Klaucke, A.X. Trautwein, „The molybdenum coordination environment in CO dehydrogenase studied by EXAFS“, HASYLAB Jahresbericht 2000, Teil 2, S. 373f.
6. M. Gnida, R. Ferner, L. Gremer, O. Meyer, W. Meyer-Klaucke, A.X. Trautwein, „The role of selenium in wildtype and recombinant CO dehydrogenase – an EXAFS study“, HASYLAB Jahresbericht 2000, Teil 2, S. 375f.
7. M. Gnida, R. Benda, B. Tse Sum Bui, A. Marquet, W. Meyer-Klaucke, A.X. Trautwein, „[2Fe-2S] cluster in biotin synthase: X-ray absorption spectroscopic investigation of the terminal ligands“, HASYLAB 2000, Teil 2, S. 391f.