



BMBF - Förderschwerpunkt

Erforschung der kondensierten Materie

Großgeräte der physikalischen
Grundlagenforschung

XAFS-Untersuchungen an Metallproteinen und Metallkomplexen unter Berücksichtigung der Moleküldynamik

Zuwendungsempfänger:	Medizinische Universität Lübeck
Projektleitung:	Trautwein/Winkler(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 CO₂ 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

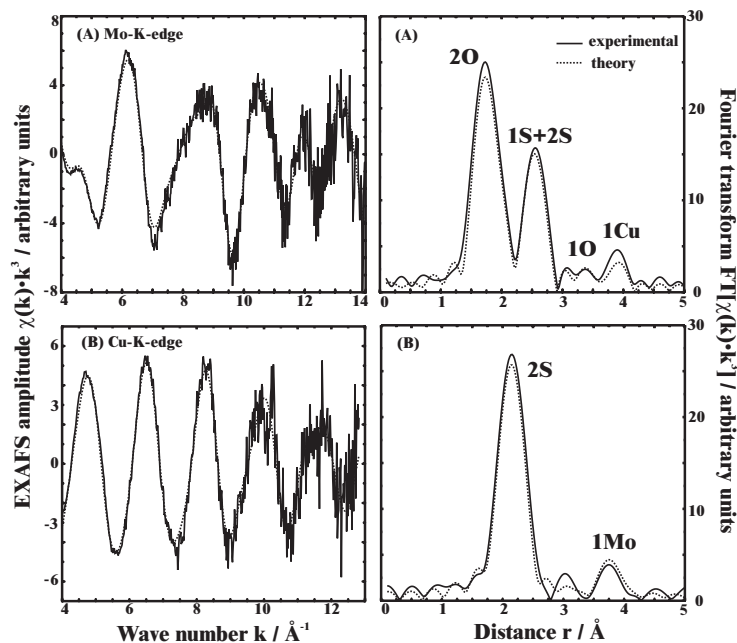


Abbildung 1: Mo- und Cu-EXAFS und Fourier-transformierte EXAFS-Spektren nativer CODH

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.

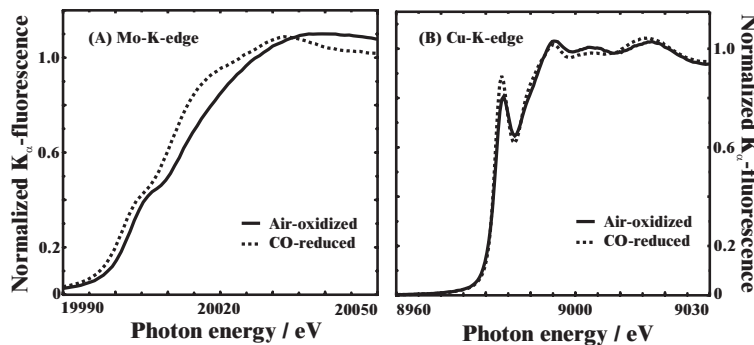


Abbildung 2: Mo- und Cu-K-Kanten nativer (air-oxidized) CODH und Substrat-inkubierter (CO-reduced) CODH.

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).