

Max-Planck-Institut für Strahlenchemie

Mülheim an der Ruhr

Geschäftsführender Direktor

Prof. Dr. Karl Wieghardt

Stiftstrasse 34-36

45470 Mülheim an der Ruhr

Postfach 101365

45413 Mülheim an der Ruhr

Telefon 02 08/3 06-36 09

Telefax 02 08/3 06-39 52

E-mail: wieghardt@mpi-muelheim.mpg.de

Internet: http://www.mpi-muelheim.mpg.de/mpistr_home.html

Wissenschaftliche Mitglieder, Direktoren

Prof. Dr. Wolfgang Lubitz · Prof. Dr. Karl Wieghardt

Mitarbeiter

Ende 2000 waren 105 Mitarbeiter (einschließlich der Drittmittelbeschäftigten) am Institut tätig, darunter 22 Wissenschaftler; dazu kamen im Berichtsjahr 57 Nachwuchs- und Gastwissenschaftler.

Forschungsthemen im Überblick

Bioanorganische Chemie; Koordinationschemie; Metalloproteine: Struktur und Funktion des Photosystem II, Nicht-häm-Eisen- und Mangankomplexe mit biologischer Relevanz; Radikalkomplexe in der Biologie (Wieghardt)
Biophysikalische Chemie und Biospektroskopie; Primärprozesse der Photosynthese; Magnetische Resonanzspektroskopie (EPR, ENDOR); Metalloproteine; Molekularbiologische Techniken; Proteinchemie (Lubitz)

Forschungsgruppenleiter:

Prof. Dr. Silvia E. Braslavsky
 Prof. Dr. Clemens von Sonntag

Emeritierte Wissenschaftliche Mitglieder:

Prof. Dr. Kurt Schaffner
 Prof. Dr. Günther O. Schenck
 Prof. Dr. Dietrich Schulte-Frohlinde

Auswärtiges Wissenschaftliches Mitglied:

Prof. Dr. Stephen J. Lippard,
 Cambridge/USA

Fachbeirat:

Prof. Dr. Richard J. Cogdell, Glasgow/UK
 Prof. Dr. Wolfgang Junge, Osnabrück
 Prof. Dr. Bernt Krebs, Münster
 Prof. Dr. Jan Reedijk,
 Leiden/Niederlande
 Prof. Dr. JoAnne Stubbe,
 Cambridge/USA
 Prof. Dr. Heinrich Vahrenkamp,
 Freiburg

Kuratorium:

Dr. Jens Baganz, Mülheim an der Ruhr
 Prof. Dr. Manfred Bormann, Bochum
 Prof. Dr. Karl Heinz Büchel, Burscheid
 Günther Grotkamp, Essen
 Prof. Dr. Gert Kaiser, Düsseldorf
 Prof. Dr. Carl Heinrich Krauch,
 Randburg/Südafrika
 Manfred Kuhmichel, MdL, Düsseldorf
 Gerd Müller, Mülheim an der Ruhr
 Prof. Dr. Günther Wilke,
 Mülheim an der Ruhr

Institutsgeschichte

Das MPI für Strahlenchemie geht auf die 1958 errichtete „Selbständige Abteilung für Strahlenchemie im Max-Planck-Institut für Kohlenforschung“ (Leiter: G. O. Schenck) zurück und führte ab 1973 die Bezeichnung „Institut für Strahlenchemie im MPI für Kohlenforschung“. Seit 1981 ist es ein eigenständiges Max-Planck-Institut. Traditioneller Schwerpunkt der Institutsarbeit war die Strahlenchemie (ein Arbeitsgebiet, zu dem auch

die Photochemie gehörte). Mit der Berufung von Prof. Wieghardt im Jahre 1994 wurde eine Neuorientierung auf das Gebiet der Bioanorganischen Chemie eingeleitet. Mit der Berufung von Prof. Lubitz Anfang 2000 wurde die neue Forschungsausrichtung um das Gebiet der Biophysikalischen Chemie und der Spektroskopie von Metallproteinen ergänzt.

Abteilung Lubitz*Arbeitsgebiete*

Der Schwerpunkt der Arbeiten liegt auf dem Gebiet der Primärprozesse der bakteriellen und pflanzlichen Photosynthese (lichtinduzierte Ladungstrennung und Elektronentransport, Protein-Kofaktor-Wechselwirkung), der Wasserspaltung im Photosystem II und der biologischen Wasserstoffumsetzung in Hydrogenasen. Dabei wird insbesondere der Struktur-Funktions-Zusammenhang der proteingebundenen Kofaktoren (z. B. Metallzentren) in diesen Systemen untersucht. Ferner werden Radikalenzyme (z. B. Ribonukleotidreduktase) studiert. In allen Systemen spielen paramagnetische Spezies (Radikale, Radikationen, Triplettzustände, Übergangsmetallkomplexe) eine wichtige Rolle und sind häufig direkt am Prozess beteiligt. Als Methoden zum Studium dieser Spezies werden kontinuierliche (cw) und gepulste EPR-Techniken in verschiedenen Frequenzbändern herangezogen, häufig in direkter Kombination mit anderen Verfahren (NMR, optische Spektroskopie). Die zu untersuchenden biologischen Systeme werden im Labor selbst präpariert (Klonierung der Gene, Anzucht, Aufreinigung nativer und rekombinanter Proteine), manipuliert (Isotopenmarkierung, Pigment/Metallaustausch, Aminosäureaustausch) und z. T. auch kristalli-

siert. Ein neues Arbeitsgebiet ist die Synthese von polypeptidbasierten Modellsystemen für photosynthetische, photokatalytische und andere enzymatische Prozesse. Begleitend zu den Experimenten werden quantenchemische Rechnungen durchgeführt, die zu einer strukturellen Charakterisierung der beobachteten Intermediate in biologischen Reaktionszyklen führen sollen. Technische Weiterentwicklungen erfolgen insbesondere auf dem Gebiet der EPR-Spektroskopie zur Steigerung der Empfindlichkeit und des spektralen und zeitlichen Auflösungsvermögens der Methode.

Abteilung Wieghardt

Arbeitsgebiete

Die Schwerpunkte liegen auf Gebieten der Bioanorganischen Chemie (Metalloproteine; wasserspaltendes Manganzentrum des pflanzlichen photosynthetischen Reaktionszentrums PS II), der anorganischen Reaktionsmechanismen (Elektron- und Atom-Übertragungsreaktionen) und synthetischen supramolekularen Chemie mit makrozyklischen Übergangsmetall-Komplexen. Ferner: Ein-Elektron-Redoxchemie von biologisch relevanten (quasi)aromatischen Verbindungen; Selektivität und Elektronentransfer-Mechanismen in Radikal-Molekül-Reaktionen; photo- und strahlenchemische Untersuchungen von Carbeniumionen in nukleophilen Lösungsmitteln; Superoxidradikal-Reaktionen.

Aktueller Forschungsschwerpunkt

Metall-Phenoxyradikalkomplexe: Modelle für radikalhaltige Metalloproteine

Es ist bekannt, dass aus molekularem Sauerstoff abgeleitete radikalische

Spezies, wie z. B. das Superoxidradikal, zu irreversiblen Schädigungen wichtiger Zellbestandteile führen. Der destruktive Charakter der Radikale äußert sich u. a. in der Zellalterung beim Menschen. Demzufolge war es lange Zeit unvorstellbar, dass Radikale bei enzymatischen Katalysezyklen auftreten.

Das sollte sich ändern. 1972 wurde das erste stabile Aminosäureradikal, das Tyrosylradikal, in der Ribonukleotid-Reduktase (RNR) aus *E. Coli* entdeckt. Es ist zurzeit das am besten charakterisierte Proteinradikal, das häufig vorkommt. In den letzten Jahren sind Enzyme entdeckt worden, die in ihren aktiven Zentren neben Metallionen auch paramagnetische Aminosäuregruppen in Form organischer Radikale enthalten. Zu den katalytisch essentiellen, redoxaktiven Aminosäureresten gehören vor allem die leicht oxidierbaren Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan, Cystein und Glycin. In einigen Enzymen treten Tyrosylreste in Verbindung mit Metallen auf. Zu diesen zählen die eisenhaltige Ribonukleotid-Reduktase und Prostaglandin H-Synthase, sowie die Galactose-Oxidase (GO) bzw. Glyoxal-Oxidase mit einem Kupferzentrum. Für die Wirkungsweise dieser Metalloenzyme werden in der Literatur Mechanismen vorgeschlagen, in denen ein bzw. zwei Übergangsmetallionen mit der redoxaktiven Tyrosin-Gruppe reagieren (siehe weiter unten, Abb. 2). Disauerstoff soll für die Bildung des Tyrosylradikals verantwortlich sein, die mit einer Änderung der Redoxstufe des Metallzentrums einhergeht.

Ein interessantes Beispiel für das metallgebundene Tyrosylradikal findet man in dem aktiven Zentrum der Galactose-Oxidase (GO). Dieses in Pilzen vorkommende Enzym katalysiert die Oxidation von Galactose und einer Reihe anderer primärer Alkohole mit Luftsauerstoff zu den entspre-

chenden Aldehyden, wobei molekularer Sauerstoff von Wasserstoffperoxid reduziert wird (1):



Nach einer Kristallstrukturanalyse mit einer Auflösung von 1,7 Å besteht das aktive Zentrum aus einem quadratisch-pyramidal koordinierten Kupfer(II)-Ion (Abb. 1). Dieses wird in der äquatorialen Ebene von zwei Histidinresten (His 496, His 581), einem Tyrosinrest (Tyr 272) und einem Wassermolekül, sowie in der axialen Position von einem zweiten Tyrosin (Tyr 495) umgeben.

Das äquatoriale Tyrosin (Tyr 272) weist eine interessante Besonderheit auf: Es ist durch eine Thioetherbindung an ein benachbartes Cystein (Cys 228) gebunden. Dieses Enzym

zählt zu einer interessanten Klasse von Metalloenzymen, die einen Zwei-Elektronen-Oxidationsschritt mit einem einzigen redoxaktiven Metallion im aktiven Zentrum katalysieren.

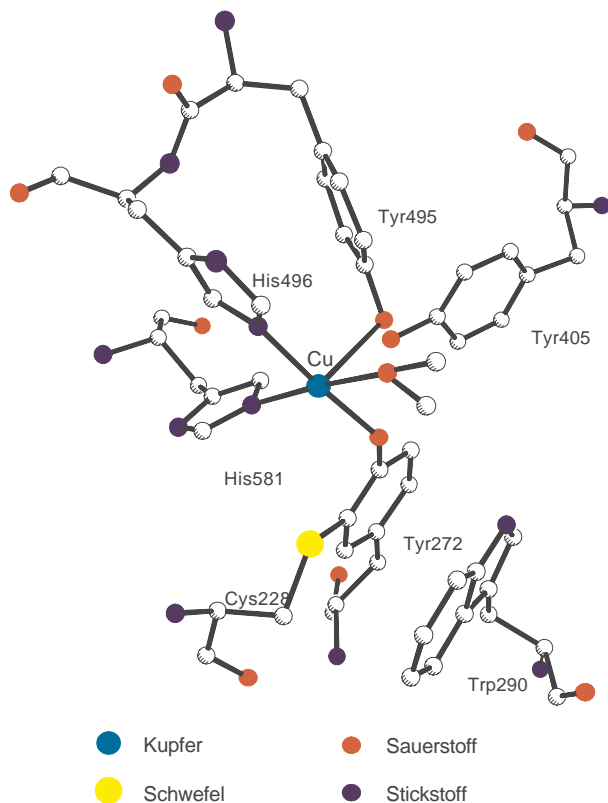
Aufgrund einer Vielzahl kinetischer Messungen am Metalloenzym gilt der in **Abbildung 2** dargestellte Mechanismus als der wahrscheinlichste.

Das Substrat (Zucker/Alkohol) wird nach der Bindung an das Kupfer-Ion durch das Tyr 495 deprotoniert. Als geschwindigkeitsbestimmender Schritt (r. d. s.) tritt anschließend die homolytische Spaltung der α -C-H-Bindung und die Übertragung des H-Atoms auf das Tyrosylradikal (Tyr 272) ein, wobei ein Ketylradikal gebildet wird. Nach weiterer Oxidation des Substrats zum entsprechenden Aldehyd unter Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) durch einen schnellen intramolekularen Elektronentransfer erfolgt die Reaktion mit molekularem Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxid und Rückbildung der Cu(II)-Tyrosyl(272)-Radikalspezies.

Der hier dargestellte Reaktionsverlauf ist ein sehr gutes Beispiel für die Beteiligung von Proteinradikalen in Enzymkatalysen. Durch die Vorgänge in der Natur angeregt, haben wir nach entsprechenden Modellen gesucht. Es ist uns gelungen, neue radikalhaltige Verbindungen darzustellen, insbesondere Phenoxy-Metallkomplexe mit der Strukturmodellverbindung von GO.

Die von uns durchgeführte Untersuchung der Phenoxyradikal-Komplexe gewähren neue Einblicke in die strukturellen, elektronischen und spektroskopischen Aspekte der Koordinationschemie von Phenoxyradikalen. Trotz des beträchtlichen Fortschritts bei den Erkenntnissen von Strukturmodellverbindungen, deren Synthese durch Strukturen von Biomolekülen inspiriert worden ist, gibt es kaum Untersuchungen zur Reakti-

Abb. 1: Struktur des Katalysezenters der Galactose-Oxidase (GO) (nach Itoh et al.).



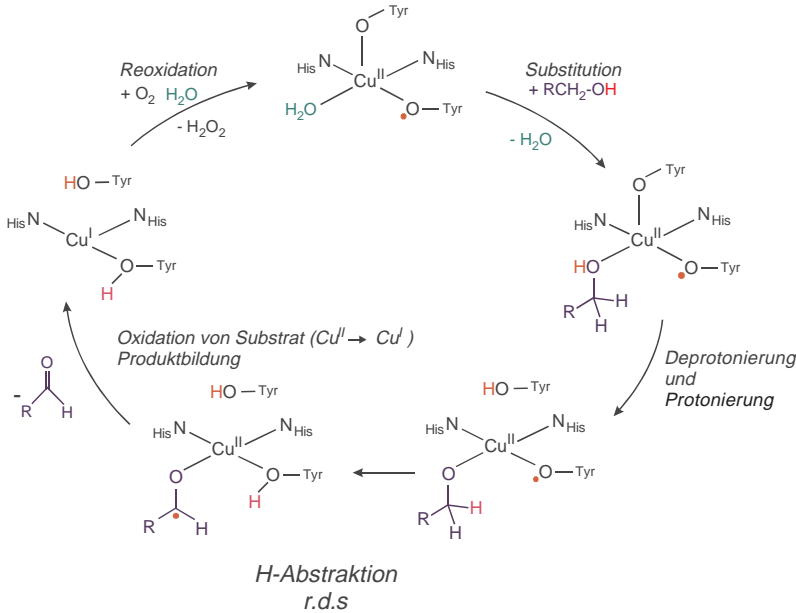


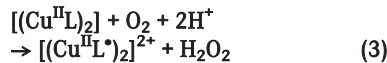
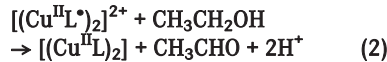
Abb. 2: Vorgeschlagener Mechanismus der Katalyse durch Galactose-Oxidase (nach Whitaker et al.).

vität der koordinierten Phenoxyradikale.

Uns ist es jetzt erstmals gelungen, katalytische Aktivitäten für koordinierte Radikale in ein- und zweikernigen Kupfer(II)-Verbindungen festzustellen. Wir haben einen neuartigen *zweikernigen* Cu(II)-Phenoxyradikalkomplex dargestellt. Dieser Komplex katalysiert die Oxidation primärer und sekundärer Alkohole mit Luftsauerstoff zu Aldehyden und Ketonen, sowie zu 1,2-Glykolen. Als Reduktionsprodukt entsteht H₂O₂. Der katalytisch aktive Bis(Phenolato)-verbrückte Dikupfer(II)-Komplex **1**, in dem jedes Kupfer-Ion auch noch mit einem Phenoxyradikal koordiniert wird, ist in **Abbildung 3** dargestellt.

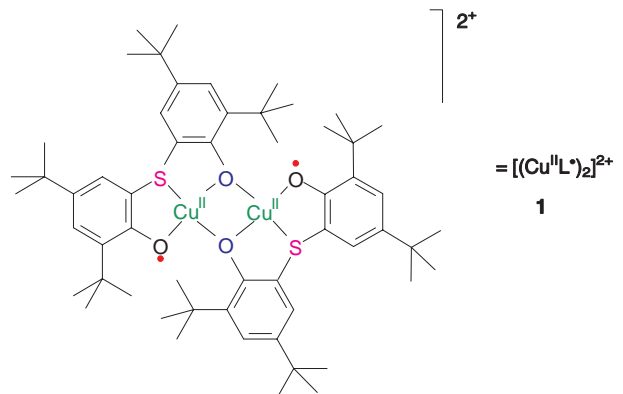
Eine sauerstofffreie grüne Lösung von **1** in Tetrahydrofuran (THF) wird nach Zugabe von Ethanol im Überschuss unter Argon bei Raumtemperatur blau. Dabei entsteht ein Äquivalent Acetaldehyd (Reaktionsgleichung 2). Der ursprüngliche grüne Komplex **1** kann in einer Reaktion

mit molekularem Sauerstoff wieder hergestellt werden, wobei Wasserstoffperoxid entsteht (Reaktionsgleichung 3).



Die Kombination der Reaktionsgleichungen (2) und (3) ergibt die homo-

Abb. 3: Struktur des Bis(Phenolato)-verbrückten Dikupfer(II)-Komplexes $[(\text{Cu}^{\text{II}}\text{L}^*)_2]^{2+}$, Verbindung **1**.



lyse von **2** belegt, wie in **Abbildung 6** gezeigt, dass das Cu^{II} -Ion den dreizähligen radikalischen $(\text{L}^2)^{\cdot-}$ -Liganden ($S_{\text{L}} = 1/2$) und ein NEt_3 -Molekül koordinativ in einer quadratisch-planaren N_2O_2 -Umgebung bindet.

2 weist einen diamagnetischen Grundzustand ($S = 0$) auf, der durch intramolekulare antiferromagnetische Kopplung des Radikalspins ($S_{\text{L}} = 1/2$) mit dem des Cu^{II} -Ions ($S_{\text{Cu}} = 1/2$) zustande kommt. Dieses Verhalten entspricht dem der aktiven Form der GO.

An der Luft gerührte Lösungen von **2** in THF, zu denen Benzylalkohol oder Ethanol als Substrate gegeben wurden, gaben nach 20 h bei 20°C die entsprechenden Aldehyde und H_2O_2 in jeweils ca. 55%iger Ausbeute. Mit den selektiv deuterierten Substraten PhCD_2OH und $\text{CH}_3\text{CD}_2\text{OH}$ wurden kinetische Isotopieeffekte $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ von ca. 8 erhalten. Die H-Absorption vom α -C-Atom des koordinativ gebundenen Alkoholations ist hier offensichtlich – wie in der GO – der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katalyse.

In **Abbildung 7** stellen wir einen Mechanismus für die Katalyse vor, der mit allen von uns gewonnenen Daten und dem Mechanismus der GO übereinstimmt. Zunächst bindet **2** ein Alkoholmolekül. Im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt erfolgt dann ein H-Atomtransfer vom α -C-Atom des Alkoholations zum Radikalliganden $(\text{L}^2\text{H})^{\cdot-}$, der dabei zu $(\text{L}^3\text{H}_2)^{\cdot-}$ reduziert wird. Das entstandene, koordinierte Ketylradikalanion ist ein sehr starkes Einelektronenreduktionsmittel, das sehr schnell intramolekular ein Elektron auf das $\text{Cu}(\text{II})$ -Ion überträgt. Der gebildete Aldehyd, ein schlechter Ligand, dissoziiert. Die $\text{Cu}(\text{I})$ -Form reagiert dann mit O_2 zur intermediären Bildung des Superoxokupfer(II)-Komplexes **3** zu nichtkoordiniertem H_2O_2 und Rückbildung der aktiven Form **2**. Wir

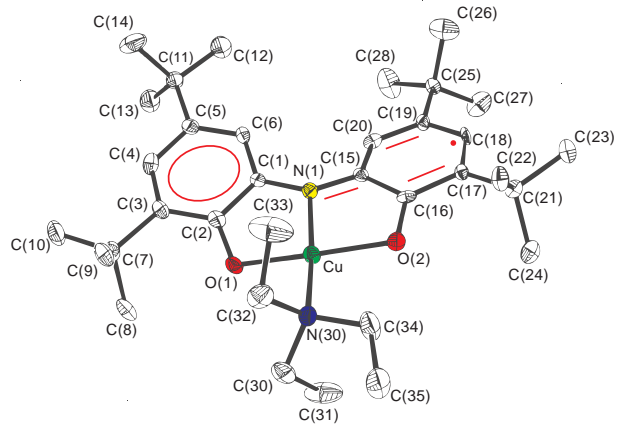
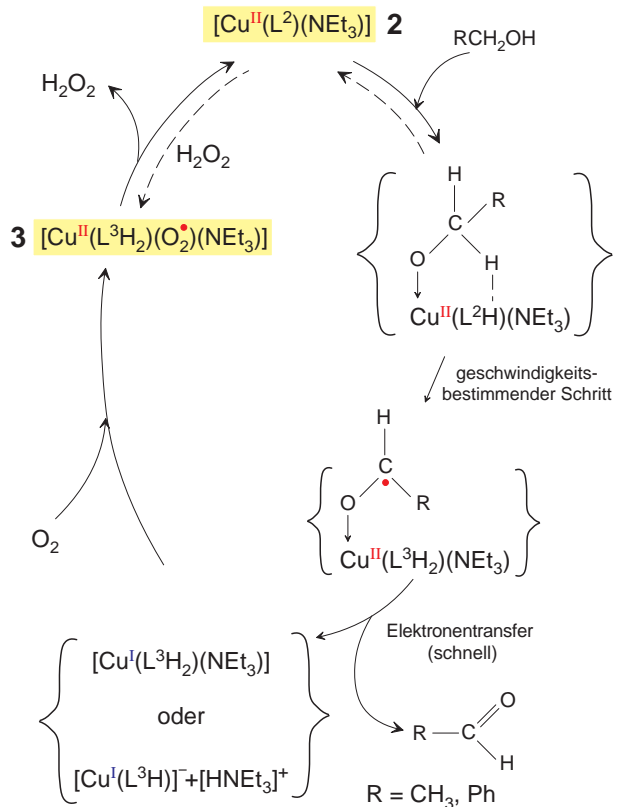


Abb. 6: Struktur von $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L}^2)(\text{NEt}_3)]$ **2** – eine $\text{Cu}(\text{II})$ -Radikal-Verbindung.

Abb. 7: Schema der Oxidation primärer Alkohole zu Aldehyden mittels Katalysator **2** (vgl. Abb. 6).



nehmen an, dass in **3** eine *end-on*-Koordination des Superoxid-Liganden, O_2^- , vorliegt. Dies ließe sich durch eine Isotopenmarkierung von **3** mit ^{16}O - ^{18}O beweisen.

Ausblick. - Die vorliegenden Forschungsergebnisse belegen, dass neue Katalysatoren, die keine Strukturähnlichkeit zu den aktiven Zentren eines bestimmten Enzyms aufweisen, dennoch Funktionsweisen zeigen, die auf gleichen reaktionsmechanistischen Grundlagen wie bei dem Enzym beruhen. Die hier beschriebene Katalyse ist im Hinblick auf potenzielle Anwendungen interessant, da zum einen Alkohole unter sehr schonenden Bedingungen oxi-

diert werden und zum anderen konzentriertes H_2O_2 bei Raumtemperatur aus Luft entsteht. Die synthetisierten Komplexe sind in der Praxis besser handhabbar als das Enzym.

Es ist unser Ziel, neue Erkenntnisse über Radikale in der enzymatischen Katalyse zu gewinnen. Wir untersuchen nicht nur die funktionellen Modelle der Galactose-Oxidase, sondern auch von anderen radikalhaltigen Enzymen, wie z. B. von Amin-Oxidase. Damit werden sich die Kenntnisse über Metall-Radikale im Allgemeinen und insbesondere über Metall-Phenoxyradikale erheblich erweitern lassen (*Chaudhuri, Weyhermüller, Bill, Wieghardt*).