

Biochemie der Spurenelemente des Menschen

(772.309, 2 Std.)

Kupfer 1

Spurenelement Kupfer

1. Chemie des Kupfers
2. Aufnahme, Transport und Speicherung
3. Typen von Kupferproteinen
4. Typ 1: Blaue Kupferzentren
5. Typ 2: Cu-Zn-Superoxid-Dismutase, Amin-Oxidasen, Dopamin- β -Monooxygenase
6. Typ 3: Tyrosinase
7. Typ 4: Cytochrom *c* Oxidase
8. Spezialisierte Oxidasen (Mischtypen): Caeruloplasmin

Spurenelement Kupfer

1. Chemie des Kupfers

	1 1A											13 3A	14 4A	15 5A	16 6A	17 7A	18 8A	
1	1 H	2 2A											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
2	3 Li	4 Be											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
3	11 Na	12 Mg	3 3B	4 4B	5 5B	6 6B	7 7B	8 -----	9 8	10 Copper, Cu	11 Ni	12 Zn	13 Ga	14 Ge	15 As	16 Se	17 Br	18 Kr
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
6	55 Cs	56 Ba	71 Lu	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra	103 Lr	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Uun	111 Uuu	112 Uub		114 Uuq		116 Uuh		118 Uuo
6			57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb		
7			89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No		

Groups ▼

Copper, Cu

29
Cu

Element Data

Copper, Cu

Atomic number (<i>Z</i>) 29	Electronegativity (Pauling) 1.9	Ionic radius 72 (2+) pm
Molar Mass 63.55 g/mol	Electron configuration [Ar]3d ¹⁰ 4s ¹	Ionization energy (1) 745 kJ/mol (2) 1958 kJ/mol (3) 3554 kJ/mol
Atomic Radius 128 pm	Stable isotopes ⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu	
Normal state solid / metal	Melting point 1084 °C	Density 8.93 g/cm ³
Enthalpy of fusion 13 kJ/mol	Boiling point 2562 °C	Molar heat capacity 24.4 J K ⁻¹ mol ⁻¹
Enthalpy of vaporization 304.6 kJ/mol		Standard molar entropy 33.2 J K ⁻¹ mol ⁻¹

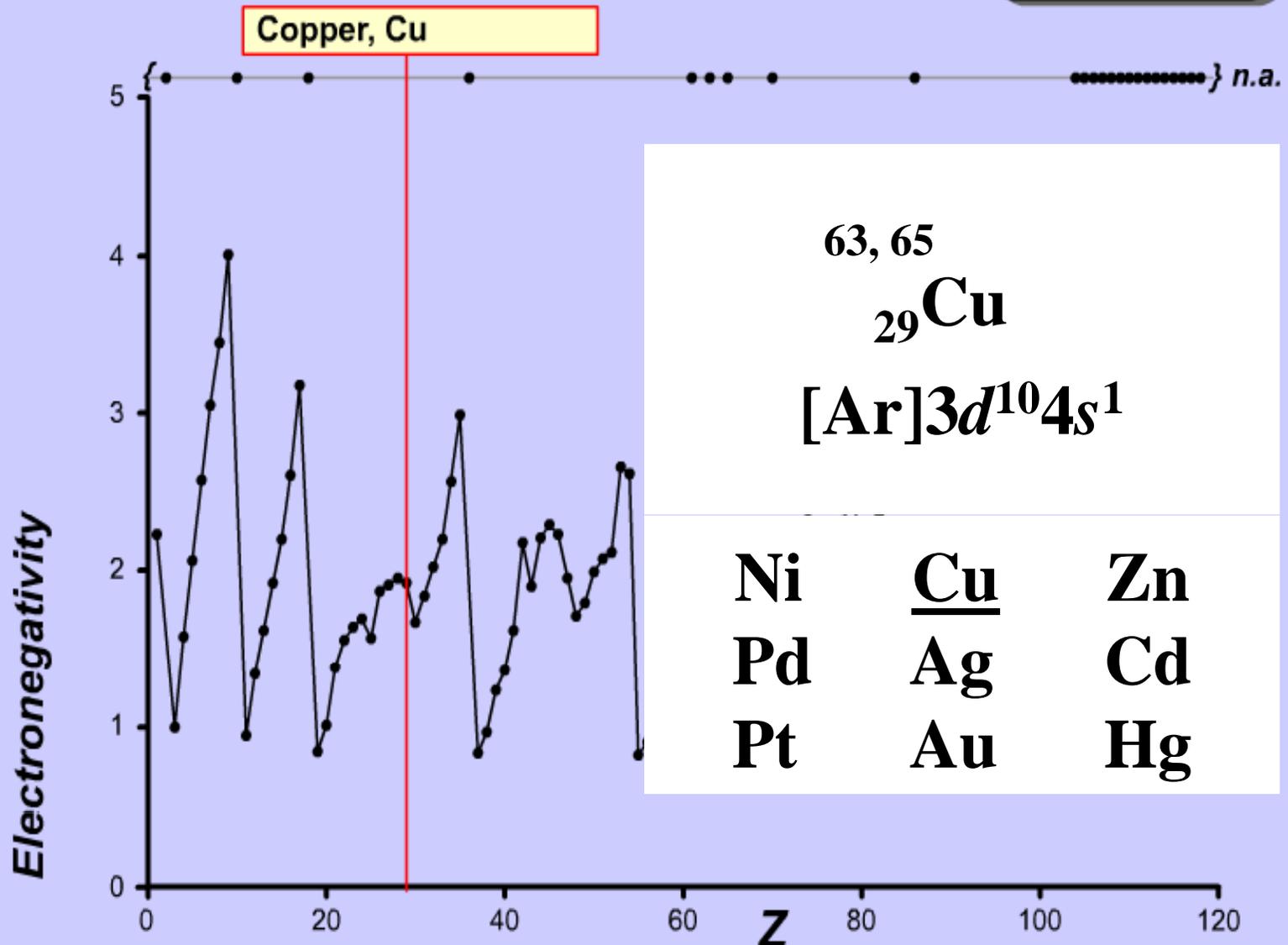
				18 8A
14 4A	15 5A	16 6A	17 7A	2 He
6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
114 Uuq		116 Uuh		118 Uuo
66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb
98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No

Electronegativity

Properties ▼

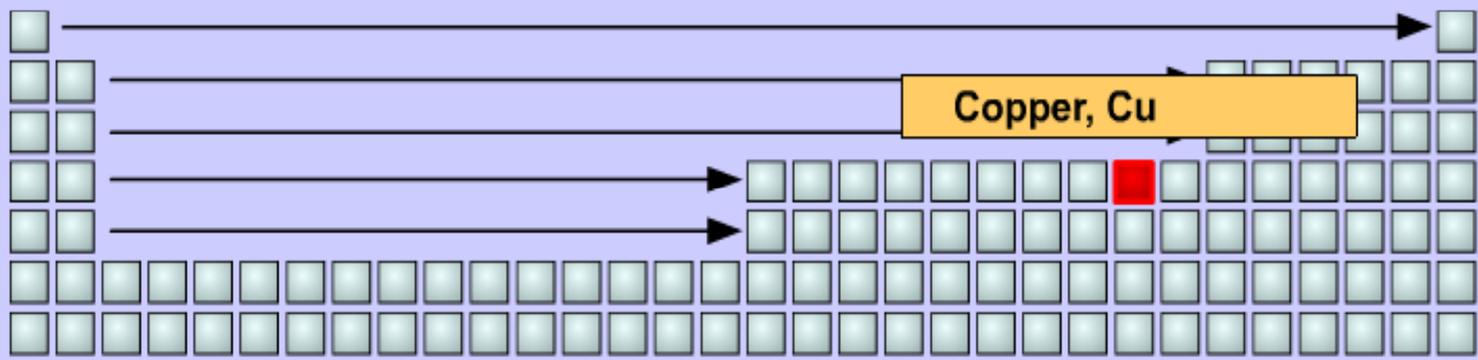
Groups ▼

Copper, Cu

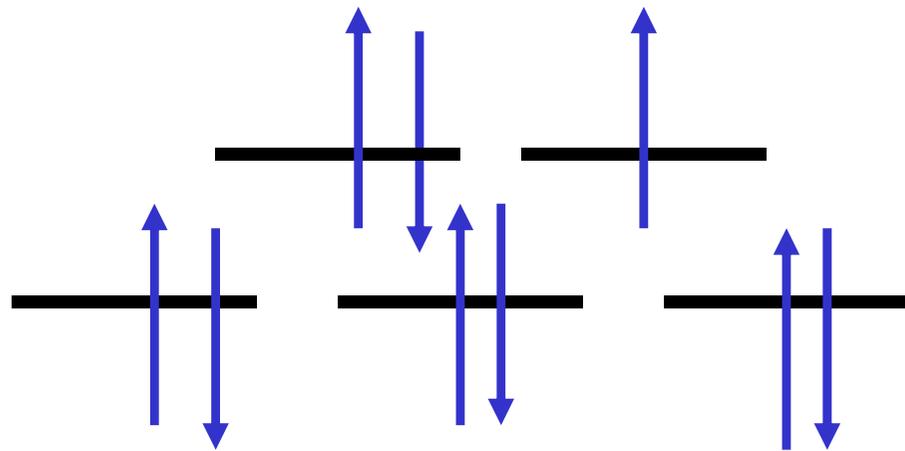


63, 65
 $_{29}\text{Cu}$
 $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$

Ni	<u>Cu</u>	Zn
Pd	Ag	Cd
Pt	Au	Hg

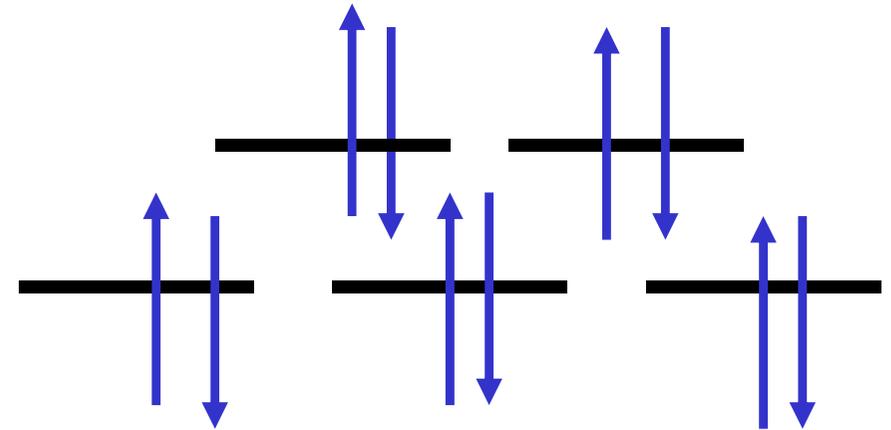


Oktaedrisches Ligandenfeld:



d^9

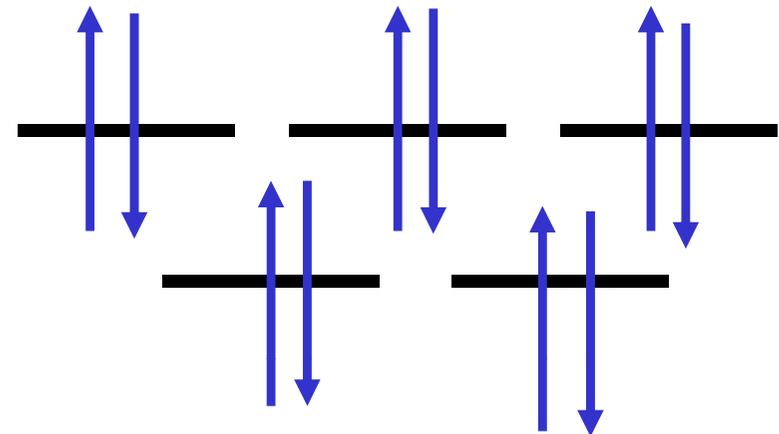
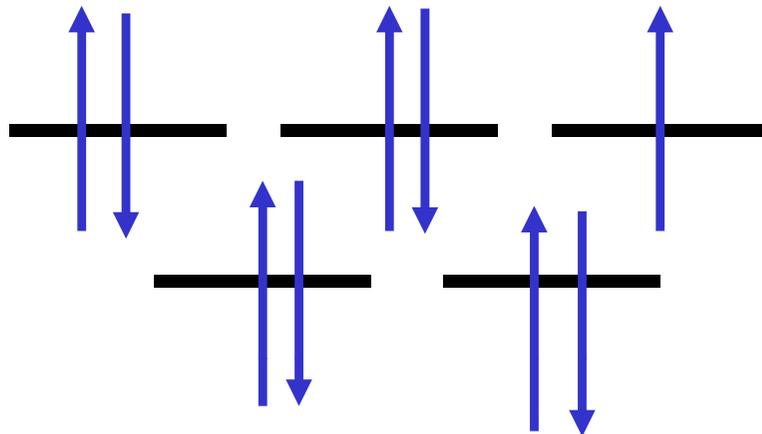
Cu(II)



d^{10}

Cu(I)

Tetraedrisches Ligandenfeld (häufiger):



In biologischen Systemen 2 relevante Oxidationszustände:

Cu(I) (Cupro)

d^{10}

diamagnetisch, meist farblos (Ausnahme: Ligand → Metall-Ladungsaustausch Banden)

Cu(II) (Cupri)

d^9

EPR aktiv (falls Elektronenspins von Cupri-Zentren nicht koppeln*), oft bläulich gefärbt

* z.B.: Oxyhämocyanin: zwei Cu^{2+} -Ionen, aber kein EPR - Signal. Starke Spinkopplung → diamagnetisch

In wässrigen Lösungen ist $\text{Cu}^+(\text{aq})$ instabil \rightarrow
Disproportionierung in $\text{Cu}(\text{s})$ und $\text{Cu}^{2+}(\text{aq})$ -Ionen:



Stabilisierung von Cu(I) durch

A. Nichtwässrige Medien: z.B. Acetonitril

B. Abwesenheit von Sauerstoff

C. Liganden

Stabilisierung durch schwefelhaltige Aminosäuren: Cu(I)-Thiolate sind stabil, während Cu(II)-Thiolate in der Regel instabil sind.

Bei Cu(II)-Thiolaten passiert Reduktion des Metalls und Oxidation des Liganden („Disproportionierung“):



In einer Proteinmatrix sind jedoch auch Cu(II)-Thiolate stabil (z.B. Typ 1 - Elektronencarrier)

D. Immobilisierung an Matrix (**Proteinmatrix**)

Anorganische Speciation einiger Metalle im Meerwasser bei 25°C, 1 atm und pH 8

Metall	Speciation
Al ³⁺	Al(OH)₃ 100%
Cr ³⁺	Cr(OH)₃ 100%
Mn ²⁺	Mn²⁺ 58%, MnCl⁺ 37%, MnSO ₄ 4%, MnCO ₃ 1%
Fe ²⁺ (theor.)	Fe²⁺ 59%, FeCl⁺ 20%, FeCO ₃ 5%, FeSO ₄ 4%, Fe(OH) ⁺ 2%
Fe ³⁺	Fe(OH)₃ 100%
Co ²⁺	Co²⁺ 58%, CoCl⁺ 30%, CoCO ₃ 6%, CoSO ₄ 5%, Co(OH) ⁺ 1%
Ni ²⁺	Ni²⁺ 47%, NiCl⁺ 34%, NiCO ₃ 14%, NiSO ₄ 4%, Ni(OH) ⁺ 1%
Cu²⁺	Cu²⁺ 9%, CuCO₃ 79%, Cu(OH)⁺ 8%, CuCl⁺ 3%, CuSO₄ 1%
Zn ²⁺	Zn²⁺ 46%, ZnCl⁺ 35%, Zn(OH) ⁺ 12%, ZnSO ₄ 4%, ZnCO ₃ 3%
Mo ⁶⁺	MoO₄²⁻ (100%)

Referenz: Turner, D., Whitfield, M., and Dickson, A. G. (1981) *Geochimica et Cosmochimica Acta* **45**, 855

Charakteristika der Biochemie des Kupfers

1. Cu(I) und Cu(II) bindet effektiv organische Liganden; hohe Elektronenaffinität von Cu(II) → gute Lewissäure bei pH 7,0 (!), jedoch selten als Lewis-Säure in katalytischen Zentren verwendet [→ Zn(II)].
2. Ähnliche Tendenz von Cu(I) und Cu(II) zur Komplexbildung mit vielen organischen Liganden (unabhängig von deren Größe und Stereochemie) → Cu(II)/Cu(I)-Redoxpaar im Bereich + 0,2 bis + 0,8 V, d.h. eher im oxidierenden Bereich der biologischen Redox-Skala.

Standard Reduktionspotentiale, E° , von Kupferproteinen

Protein		E° (mV)
Laccase	Typ 1 (blau)	+785
	Typ 2	+500
	Typ 3	+400
Azurin	Typ 1 (blau)	+330
Plastocyanin	Typ 1 (blau)	+370
Tyrosinase	Typ 3	+370
Hämocyanin		> +800
Dopamin-Monooxygenase	Typ 2	+310
Cu(II)/Cu(I) (wässriges Medium)		+170

Fünf Charakteristika der Biochemie des Kupfers

4. Diamagnetisches Cu(I) in zweikernigen Kupferzentren $3d^{10}-3d^{10}$ (z.B. Hämocyanin) kann als π -Elektronenakzeptor fungieren (über freie $4s$ und $4p$ -Orbitale) \rightarrow Bindung von O_2 und CO als Liganden (Sauerstoff und Sauerstoff-hältige niedermolekulare Verbindungen als Substrate von Kupferproteinen)
5. Mit der Ausnahme von wenigen cytosolischen Proteinen (z.B. CuZn-SOD) sind alle Cu-Metalloproteine periplasmatisch lokalisiert bzw. matrixgebunden.

Biologische Funktionen von Cu-Metalloproteinen

A. Elektronentransfer-Proteine

B. Reaktionen mit relativ kleinen anorganischen (bzw. z.T. organischen) Verbindungen, die erst seit der Bildung einer oxidierenden Atmosphäre in ausreichenden Mengen entstanden sind: O_2 , NO_x
Typische **Oxidoreductasen** (typischerweise Zweisubstrat-Enzyme).

Cu-Enzyme

Substrate

Einfache Oxidasen

O₂ plus Phenole, Amine,
Ascorbat, Ferro-Ionen
usw.

Cytochrom *c* Oxidase

O₂ plus Cytochrome *c*

NO_x umsetzende
Enzyme

NO, NO₂⁻, N₂O plus
Oxidationsmittel oder
Reduktionsmittel

Spezialisierte
Oxidasen

O₂ plus Proteine oder
Polysaccharide
(Quervernetzungen)

Kupfer- und Eisen-Proteine besitzen häufig vergleichbare Funktionalität. Beide Metalle treten in Elektronentransfer-Proteinen für die Photosynthese und Atmung sowie beim Metabolismus des Sauerstoffs (**Oxidasen, Oxygenasen**) und bei der Detoxifizierung reaktiver Sauerstoff-Spezies auf (usw.).

Beispiele für die Korrespondenz von Eisen- und Kupfer-Proteinen:

Funktion	Fe-Protein	Cu-Protein
O ₂ -Transport	Hämoglobin Hämerythrin	Hämocyanin
Oxygenierung	Cytochrom P-450 Catechol- Dioxygenase	Tyrosinase Quercetinase (Dioxygenase)
Oxidase-Aktivität	Peroxidasen	Amin-Oxidasen Laccase

Beispiele für die Korrespondenz von Eisen- und Kupfer-Proteinen:

Funktion	Fe-Protein	Cu-Protein
Elektronen- übertragung	Cytochrome	“blaue” Cu-Proteine
Antioxidations- funktion	Peroxidasen Superoxid- Dismutase	Superoxid-Dismutase
Nitrit-Reduktion	Nitrit-Reduktase	Nitrit-Reduktase

Trotz dieser offensichtlichen Gemeinsamkeiten in physiologischen Funktionen weisen Eisen und Kupfer einige wesentliche Unterschiede auf.

Unterschiede zwischen Eisen- und Kupferzentren

- A. $E^{\circ} [Cu(II)/Cu(I)] > E^{\circ} [Fe(III)/Fe(II)]$
sowohl mit physiologischen als auch mit nicht-physiologischen Liganden!
- B. Löslichkeiten in neutraler wässriger Lösung
(Meerwasser) in heutiger O_2 -reicher Atmosphäre,
in der die höheren Oxidationsstufen stabil sind:
- **Cu(II) besser löslich als Cu(I)**
(Cu^+ bildet schwerlöslichen NG mit Halogeniden oder Sulfid-/Thiolat-Liganden)
 - **Fe(III) schwerer löslich als Fe(II)**

Im Laufe der Erdgeschichte fand also Fe-AUSFÄLLUNG und Cu-MOBILISIERUNG statt! Die Änderung der Verfügbarkeit von Kupfer (Zunahme im Laufe der Erdgeschichte!) spiegelt sich sowohl in der zellulären Lokalisierung der Cu-Proteine als auch in den verwendeten Substraten wider.

Sowohl die zelluläre Lokalisation (extrazellulär) als auch die Verwendung von O₂ oder kleinen sauerstoffhaltigen Substraten (z.B. NO_x) legen den Schluss nahe, dass Cu von biologischen Systemen erst in “späterer” Zeit im Zuge der zellulären Diversifikation in seiner Funktionalität „entdeckt“ wurde.

Humane Kupfer-Proteine und –Enzyme: Lokalisation und Funktion

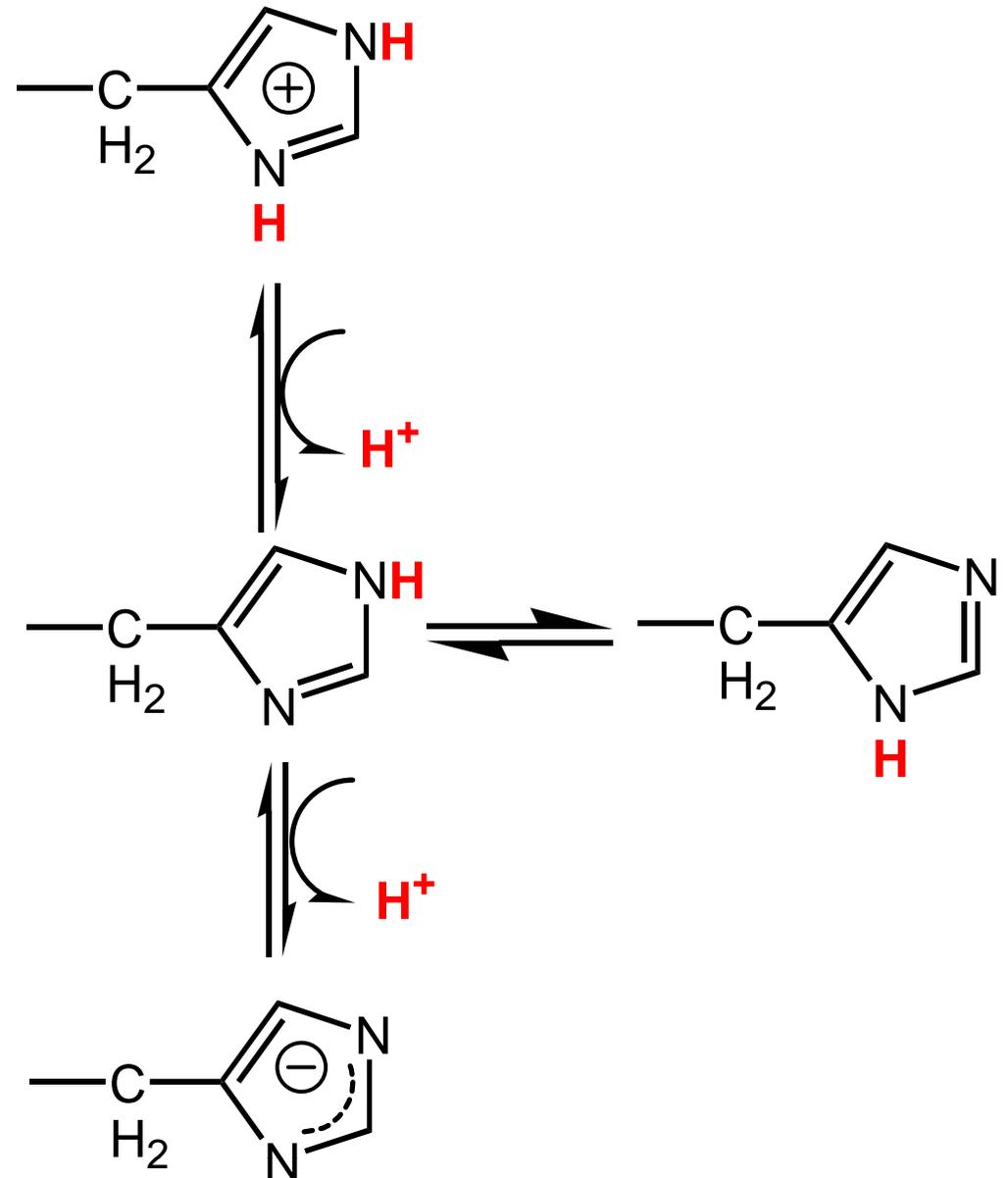
Cytochrom <i>c</i> Oxidase	Innere mitochondr. Membran	Reduktion von O ₂ zu H ₂ O
Tyrosinase	Extracellulär	Phenoloxidation Red. von O ₂ zu H ₂ O
Caeruloplasmin	Extrazellulär (Blutplasma)	Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) Red. von O ₂ zu H ₂ O
Lysin Oxidase	Extrazellulär	Kollagenquer- vernetzung (Red. von O ₂)
Amin Oxidase	Extrazellulär	Hormon (z.B. Adrenalin) Abbau
Superoxid-Dismutase	Cytosol	Superoxid Dismutation

Bevorzugte Liganden in biologischen Systemen

A. Cysteinat ($\text{R-CH}_2\text{-S}^-$)
und Methionin
($-\text{R-CH}_2\text{-S-CH}_3$)

B. Histidin: Imin-
Stickstoffzentrum im
Imidazol des Histidins

Insbesondere der Imin-
Stickstoff im Imidazol-
Ring des Histidins ist in
der Lage, Cupro und
Cupri thermodynamisch
und kinetisch stabil zu
binden.



Spurenelement Kupfer

1. Chemie des Kupfers

2. Aufnahme, Transport und Speicherung

Die durchschnittliche elementare Zusammensetzung des menschlichen Körpers (70 kg).

Element		Masse (g)		Entdeckung als essentielles Element
Eisen	Fe	4,2	17 Jh.	Essentiell
Zink	Zn	2,3	1896	Essentiell
Silicium	Si	1,4	1972	Essentiell
Rubidium	Rb	1,1		Nicht essentiell
Fluor	F	0,8	1931	Essentiell
Zirconium	Zr	0,3		Nicht essentiell
Brom	Br	0,2		Nicht eindeutig
Strontium	Sr	0,14		Nicht essentiell
Kupfer	Cu	0,11	1925	Essentiell
Aluminium	Al	0,10		Nicht essentiell
Blei	Pb	0,08		Nicht eindeutig

RDA-Werte (mg/Tag)

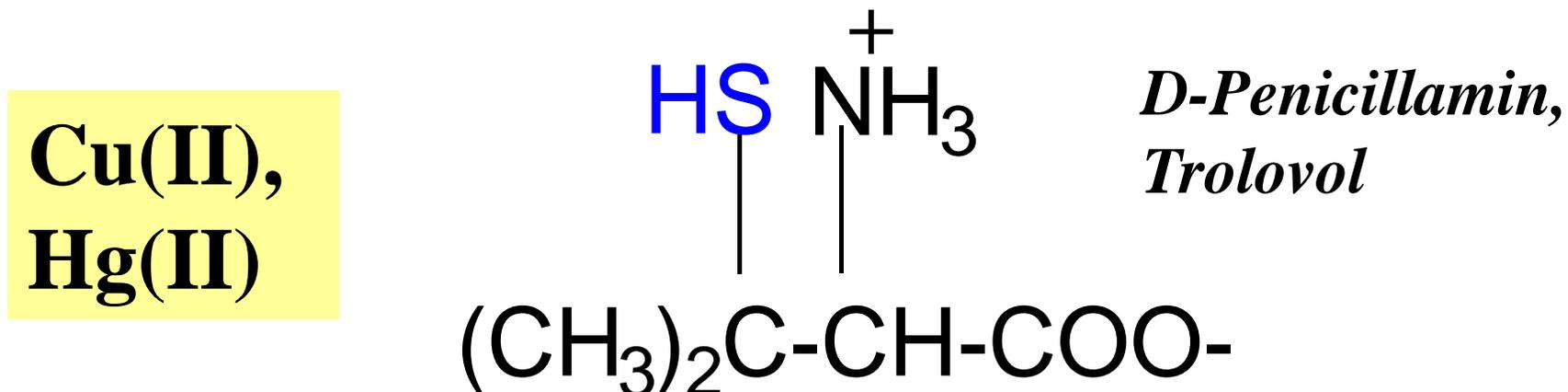
Element	Erwachsener	Säugling
K	2000-5500	530
Na	1100-3300	260
Ca	800-1200	420
Mg	350-400	60
Zn	15	6
Fe	10-20	7.3
Mn	2,5-5	1,3
Cu	1.5-3	1,0
Mo	0,15-0,5	0,06
Cr	0,05-0,2	0,04
Co	ca. 0,2 (Vitamin B₁₂)	0,001
Se	0,05-0,07	0,015
F	1,5-4,0	0,6

Kupferüberschuss und Kupfermangel

Wilsonsche Krankheit: Erbliche Störung der primären Kupfer-Speicherfunktion des Körpers durch das Protein **Caeruloplasmin** bzw. Defekt im Gen der **Wilson disease copper transporting ATPase** → Anreicherung von Cu in Leber und Gehirn → Demenz, Leberversagen.

Abhilfe: Verabreichung von Cu-komplexierenden Chelatliganden, vor allem Penicillamin:

R-β,β-Dimethylcystein



Kupfermangel bei Neugeborenen: Der komplexe Mechanismus des Transport- und Speichermechanismus (umfaßt Serumalbumin, Caeruloplasmin, Metallothioneine) stabilisiert sich erst nach einigen Lebensmonaten. Defekte → Ungenügende Sauerstoffverwertung im Gehirn (Rolle des Kupfers in der Atmungskette: **Cytochrom c Oxidase!**) → bleibende Schäden. Normal ist bei der Geburt eine hohe Konzentration an Kupfer in der Leber.

Menkesches Kraushaar Syndrom: erblich bedingte Störung des intrazellulären Kupfertransports (Defekt im Gen der **Menkes copper-transporting ATPase**) → Störungen der geistigen und körperlichen Entwicklung. Typisch: Auftreten von sprödem Kraushaar (kinky hair); Abhilfe: intravenös zugeführtes Kupfer.

Amyotrophische Lateralsklerose (erblich): Defekte (Mutationen) in der **CuZn-Superoxiddismutase**. Neurodegenerative Erkrankung mit Lähmung der motorischen Nerven (nicht selten).

Tierzucht: Antagonistische (Konkurrenz-)Situation mit Molybdän, das ebenfalls N- und S-hältige Liganden bevorzugt ist.

Kupfermangel bei Weide auf Mo-reichen und Cu-armen Böden.

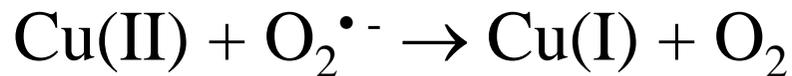
Chemische Grundlage dürfte die Koordination des Kupfers an die im Verdauungstrakt aus Molybdän und schwefelhaltigen Verbindungen gebildeten Thiomolybdate ($\text{MoO}_n\text{S}_{4-n}^{2-}$) sein.

Abhilfe: Anreicherung der Tiernahrung.

Sekundäre Kupfer-Mangelercheinungen sind auch bei übermäßiger Belastung mit Fe, Zn oder Cd bekannt (Verdrängung des Kupfers aus den aktiven Zentren).

Kupfer ist redox-aktiv, $\text{Cu(II)} \rightleftharpoons \text{Cu(I)}$, und würde in aerober Umgebung die Bildung von toxischen Hydroxylradikalen, OH^\bullet , katalysieren:

Fenton-Reaktion:



Es ist daher wichtig, dass extra- und intrazellulär die Konzentration an Kupfer-Ionen gering gehalten wird → Komplexierung in Transport- und Speicherproteinen bzw. Chaperonen.

Wie kommt **Kupfer** aus der **Nahrung** über das **Blutplasma** zu den **Zielgeweben**?

Während der Eisen-Gehalt des Körpers über die Resorptionsrate im Dünndarm gesteuert wird, reguliert die **Ausscheidung über die Galle** die Kupfer-Homöostase des Körpers. Das **Kupferangebot in der Nahrung** liegt in der Regel bei etwa 1-3 mg/Tag und übersteigt den Bedarf bei weitem.

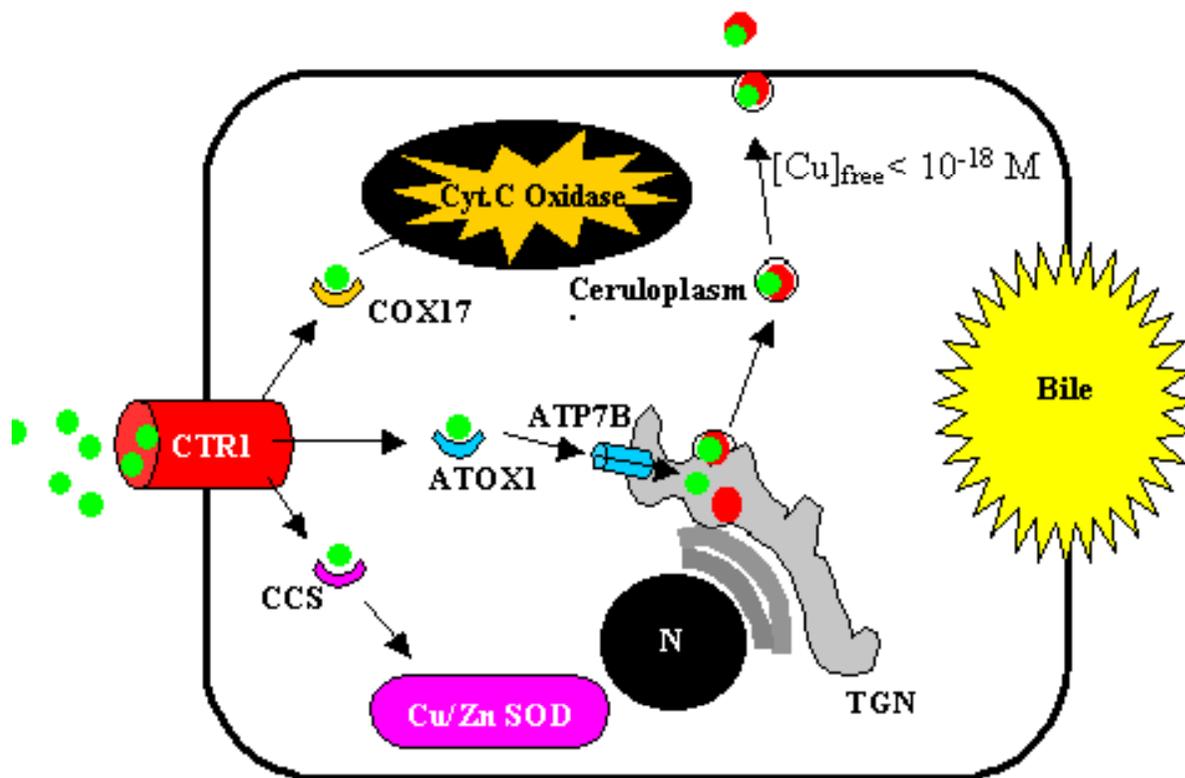
Besonders **kupferreich sind Leber und Innereien**,
Molkereiprodukte hingegen sind kupferarm. In Nahrungsmitteln pflanzlicher Herkunft hängt der Kupfer-Gehalt im allgemeinen von der Bodenbeschaffenheit und von der Nahrungsmitteltechnologie ab, die bei der Verarbeitung und Konservierung angewendet wurde. Nüsse enthalten am meisten pflanzliches Kupfer.

Nach der Trinkwasserverordnung darf 1 Liter Trinkwasser bis zu 3 mg Kupfer enthalten.

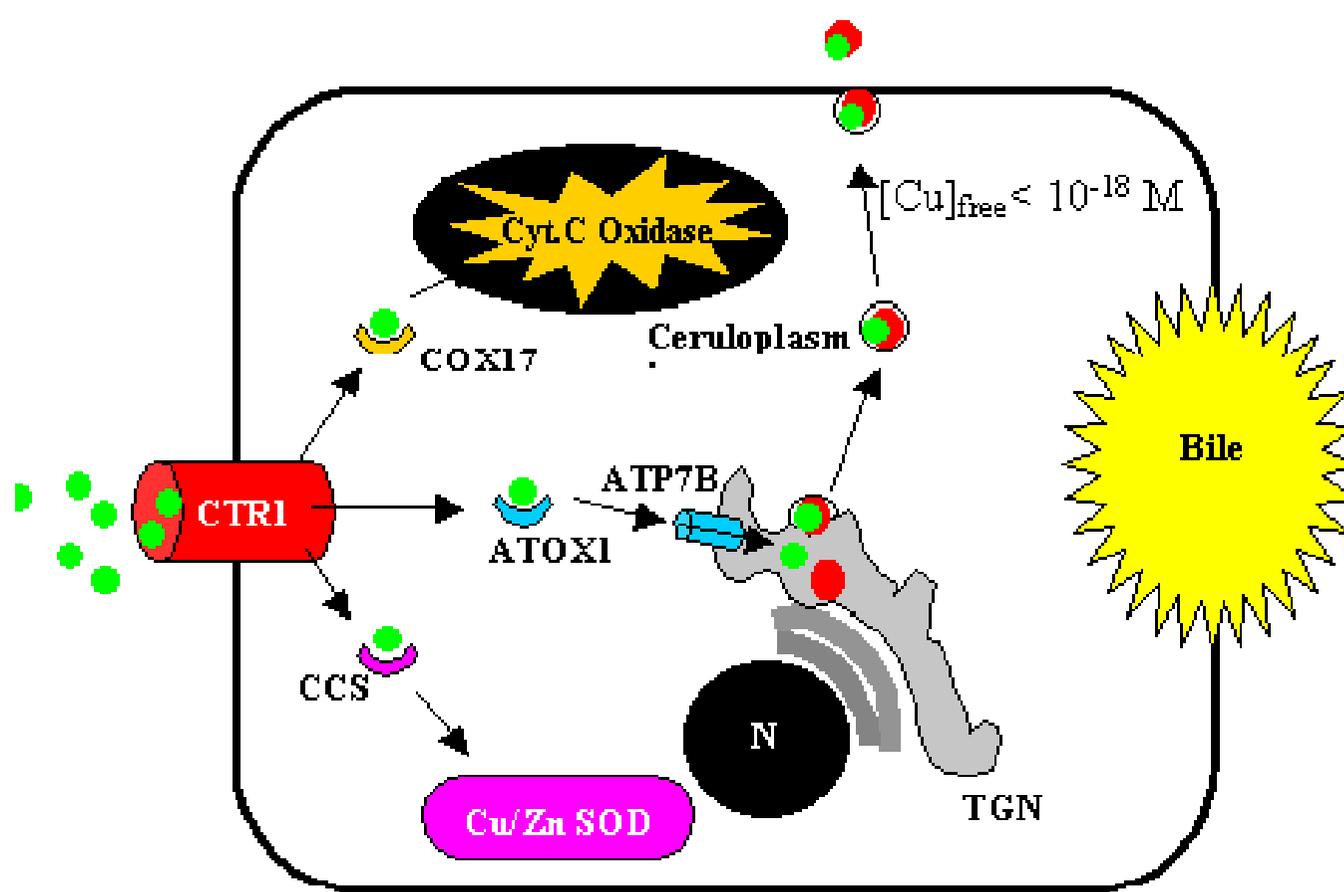
Kupfer bei Neugeborenen. In den ersten 6 Lebensmonaten beträgt die empfohlene Aufnahme $80 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$. Klinische Effekte eines Kupfer-Mangels in der frühen Kindheit umfassen Anämie, Erkrankungen im Nervensystem und Knochenveränderungen. Sie werden bei Kindern mit Malabsorption und chronischer Diarrhoe beobachtet. Der Kupfer-Gehalt der Brust-Milch ist ausreichend, um keinen Mangel entstehen zu lassen.

Ungefähr 10% des Kupfers in der **Nahrung** werden absorbiert. Der Anteil ist bei Brust-gefütterten Kindern höher als unter Gabe von Formula-Milch. Zink-Gabe reduziert die Kupfer-Aufnahme durch die Induktion der **Metallothionein**-Bildung im Enterozyten. Kupfer wird dadurch vermehrt an Metallothionein gebunden. Das Metallothionein-gebundene Kupfer kann nicht mehr mobilisiert werden, wodurch ein mukosaler Block in der Resorption entsteht. Es verbleibt in der Mukosazelle, die am Ende ihres Lebenszyklus in das Darmlumen abgeschilfert wird.

Vom Portalblut wird das resorbierte Kupfer an **Albumin, Histidin** und **Caeruloplasmin** (siehe Einheit 8) gebunden und zur Leber transportiert. Im Serum ist der Großteil (98%) an Caeruloplasmin, der Rest hauptsächlich an Albumin gebunden. Der membranständige Kupfertransporter (**CTR1**) sorgt für eine sehr schnelle und effektive Aufnahme in die Leberzelle.



Über den Kupfer-Transporter (**CTR1**) wird Kupfer [Cu(I) = grüne Kreise] in die Leberzelle aufgenommen und spezifisch zielgerichtet über Chaperone der Zelle weitertransportiert.



Chaperone für zielgerichteten Kupfer-Einbau: **COX17** für Einbau in die **Cytochrom *c* Oxidase**, **CCS** für Einbau in die CuZn-Superoxid-Dismutase, **ATX (ATOX1)** für Transport zum Wilson-Protein. Das Wilson-Protein ist eine Membran-ständige, Kupfer-transportierende ATPase (**ATP7B**) des trans-Golgi-Netzwerks (**TGN**). Im TGN erfolgt der Einbau von Kupfer in **Caeruloplasmin**, das über Exozytose ins Blut ausgeschleust wird.

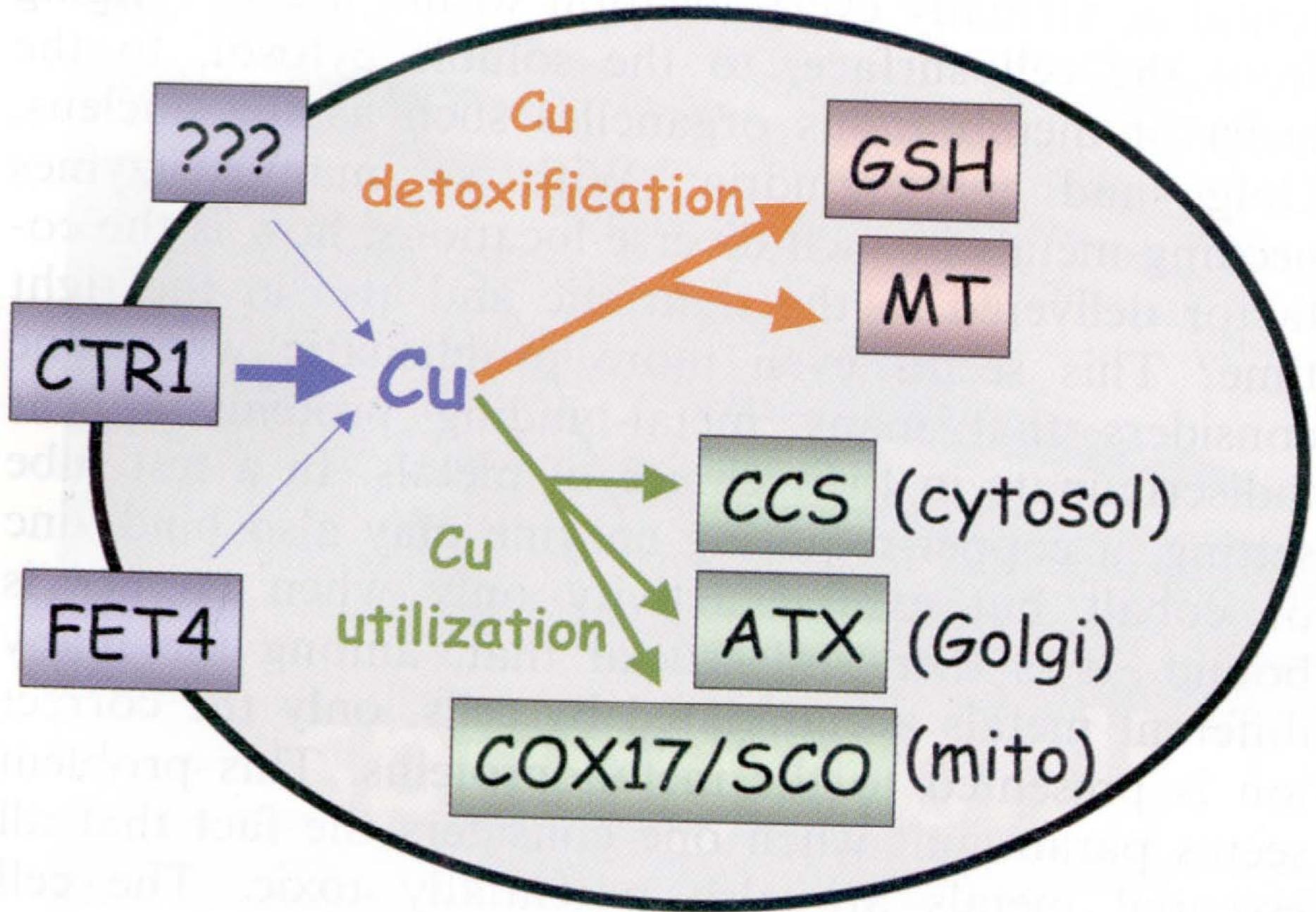
Wie wird nun Kupfer aus dem Blutplasma aufgenommen in die Zielzellen aufgenommen und innerhalb der Zellen weitersortiert?

Aufgrund umfangreicher molekularbiologischer Untersuchungen an *Saccharomyces cerevisiae* ist der intrazelluläre Kupfertransport in Hefe gut bekannt:

- 1. Aufnahme aus dem Medium** und Transport über die cytoplasmatische Membran über **hochaffine Transporter (CTRs)**.

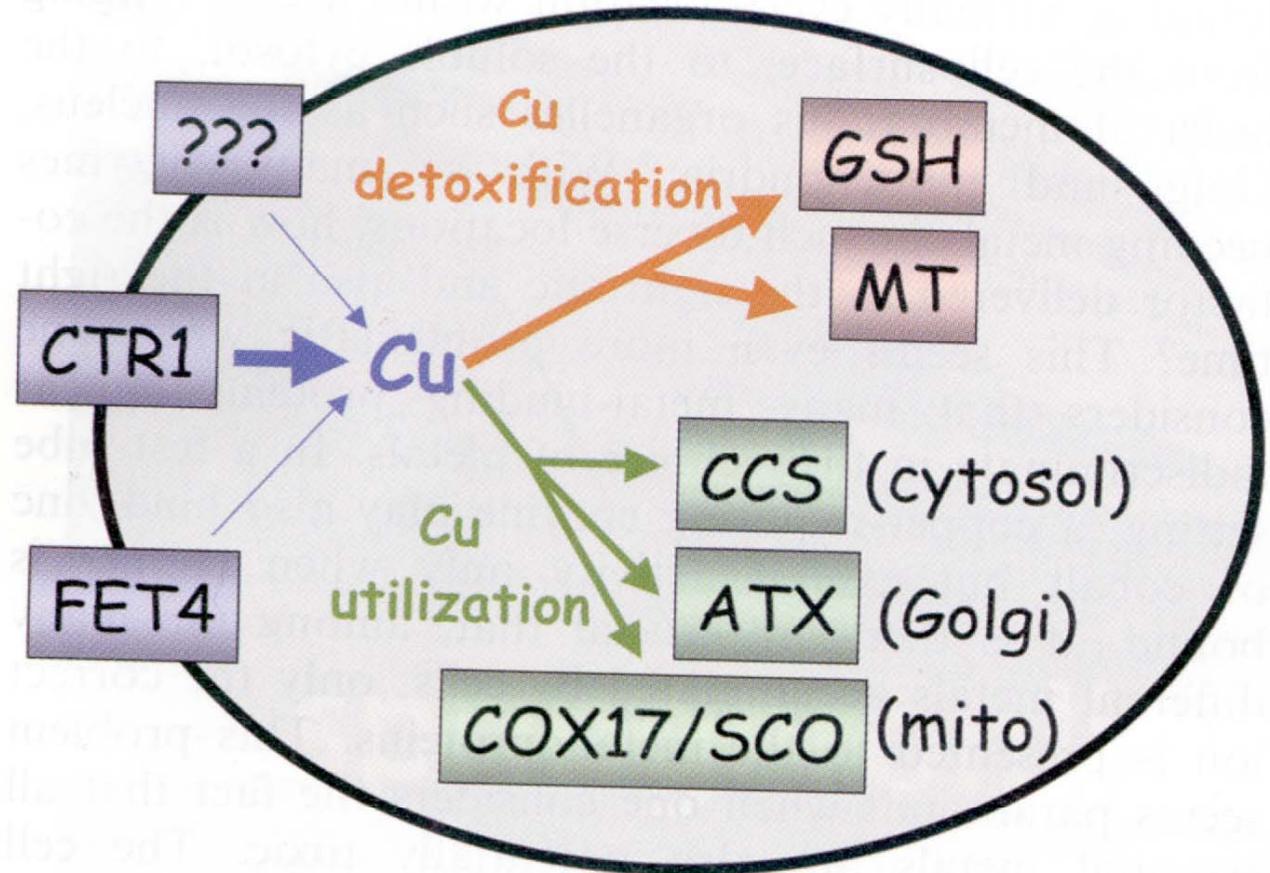
Daneben gibt es **Transporter niedrigerer Affinität** (die auch andere divalente Kationen transportieren). Sind aktiv, wenn im Nährmedium die Kupfer-Konzentration ansteigt: **FET4 Transporter**.

Aufnahme in reduzierter Form. Mechanismus unklar.



Intrazellulärer Kupfertransport
in *Saccharomyces cerevisiae*

2. Verteilung innerhalb der Zelle (zwei Möglichkeiten):



- A. Detoxifizierung** durch **Metallothioneine** bzw. **Glutathion**.
Dadurch wird die Akkumulierung von Kupfer in seiner freien toxischen Form unterbunden.
- B.** Ein Teil des Kupfers wird innerhalb der Zelle mit Hilfe von Chaperon-ähnlichen Molekülen an Zielkompartimente verteilt (**intracellular trafficking**)

Folgende
Kompartimente
müssen mit Kupfer
versorgt werden:

1. **Cytosol**

(CuZn-Superoxid-
dismutase)

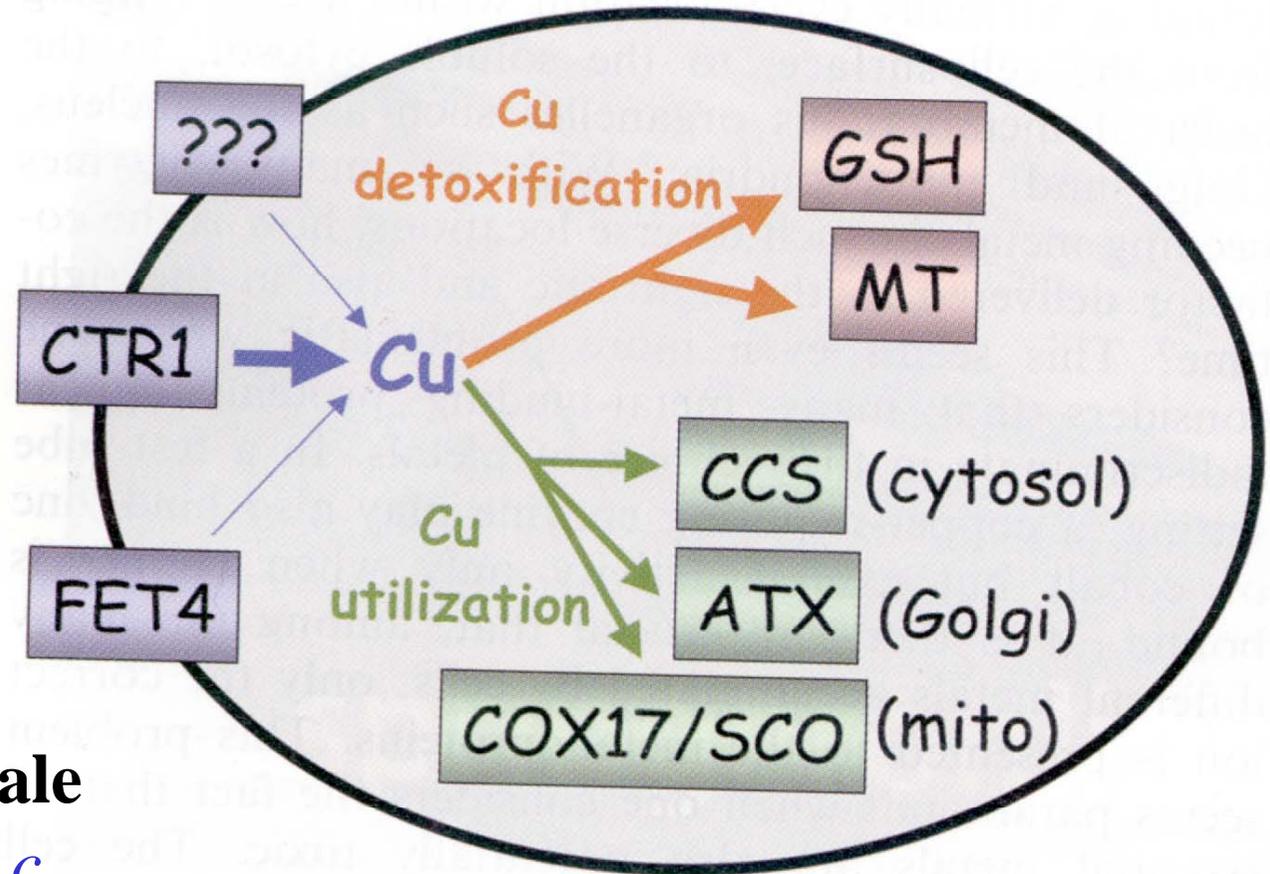
2. **Innere mitochondriale**

Membran: Cytochrom *c*

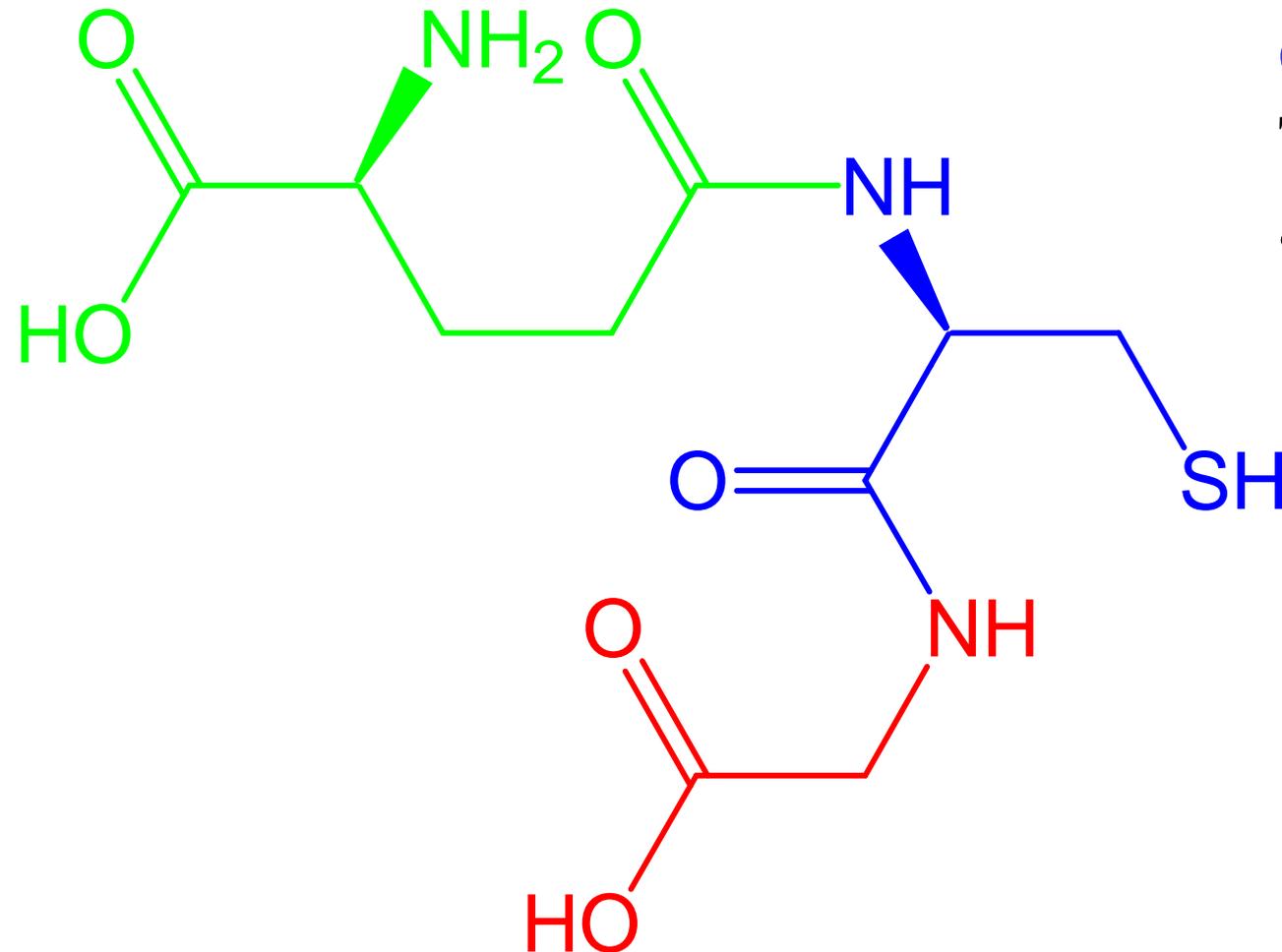
Oxidase

3. **Zelloberfläche bzw. extrazelluläres Milieu** (sekretorischer

Weg): z.B. **Amin-Oxidasen**



Detoxifizierung von Kupfer im Cytosol von Hefe durch
Glutathion bzw. Metallothionein (CuMT):



Glutathion ist ein
Tripeptid bestehend
aus Glu, Cys, Gly

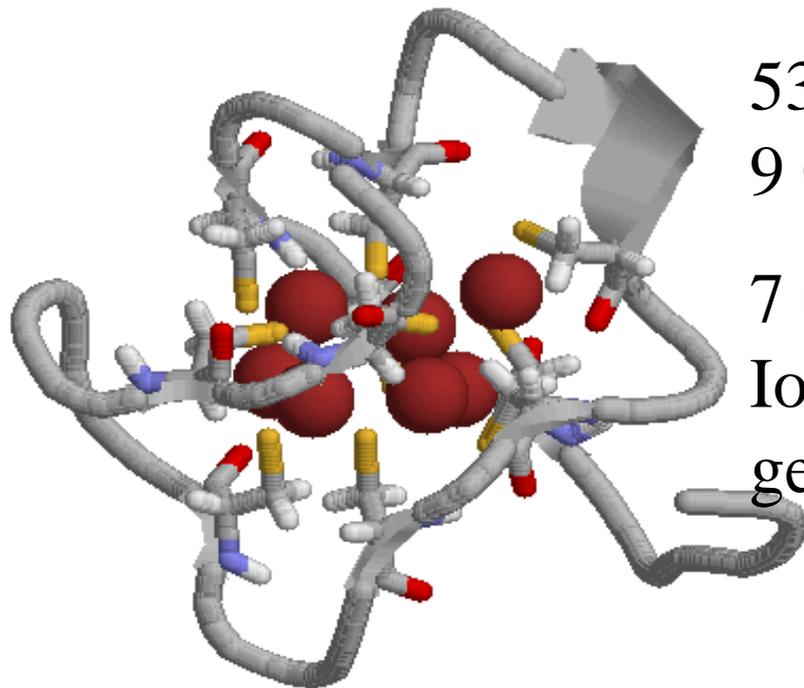
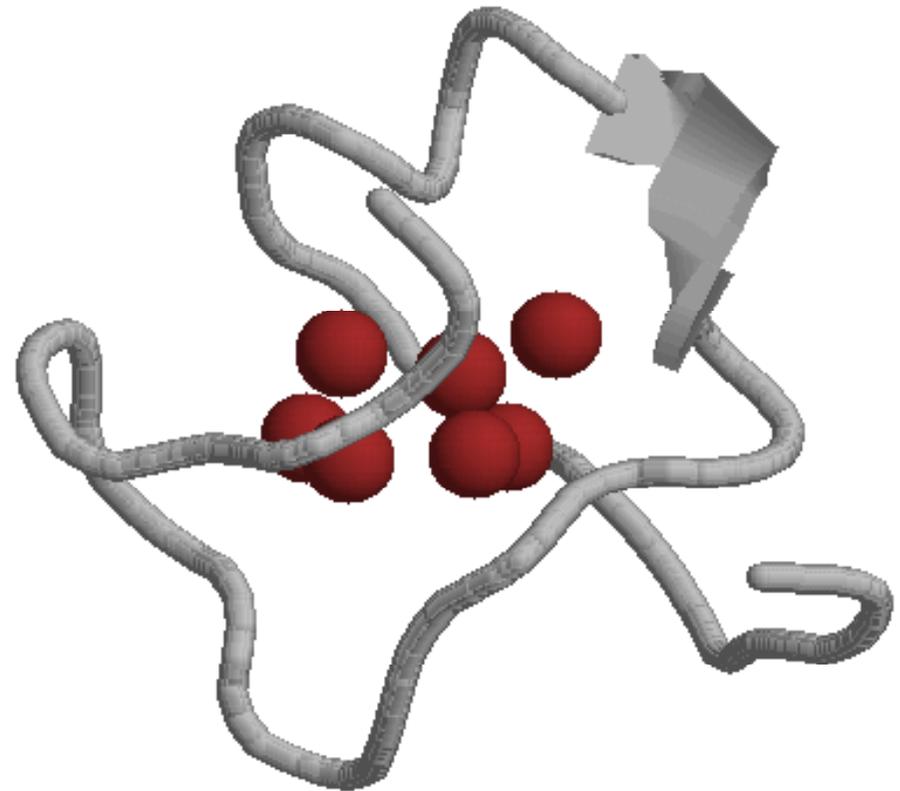
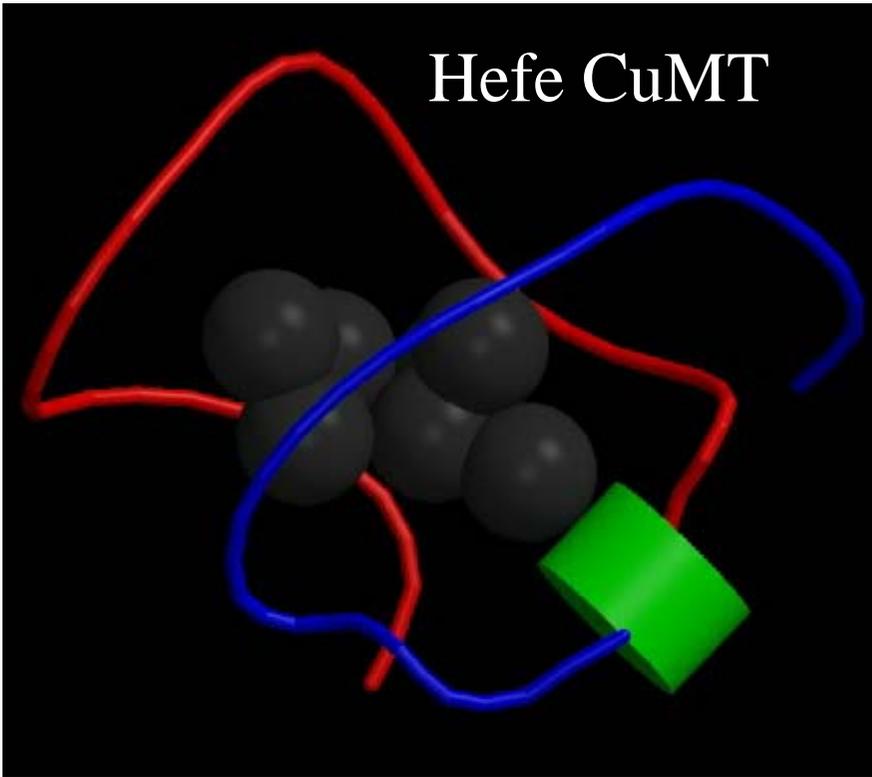
γ -Glutamylcysteinylglycin

Hefe Kupfer Metallothionein (CuMT) ist Teil der Metallothionein Superfamilie, die kleine (< 7 kDa), ubiquitäre und Cystein-reiche Proteine umfasst, die bei Transport, Speicherung und Detoxifikation von Metall-Ionen bedeutend sind.

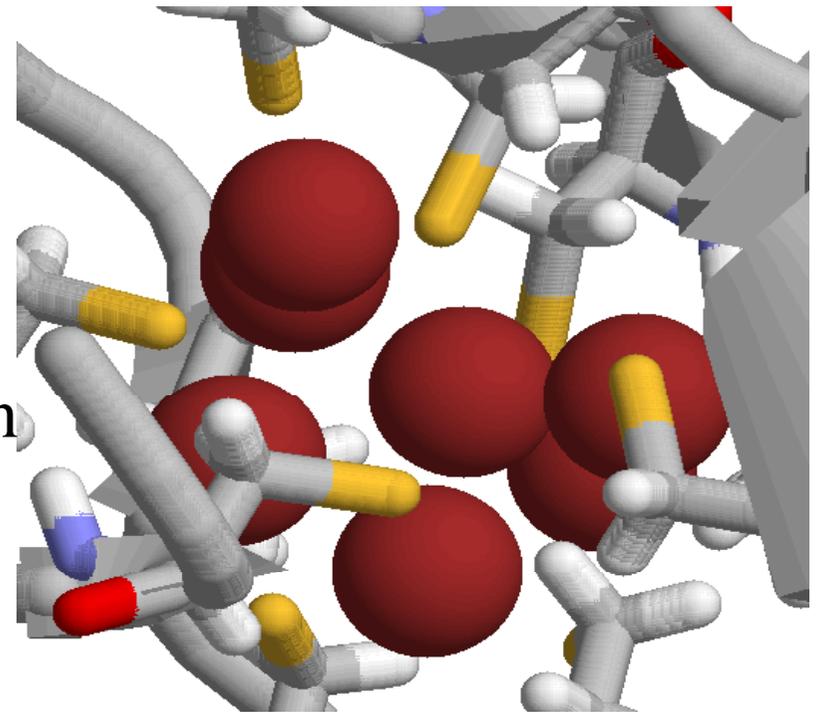
CuMT der Hefe wird vom Locus CUP1 codiert und ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die erste Röntgenstruktur eines **CuMT** stammt vom Hefeprotein (PDB code 1AQR und 1AQS):

 1AQR	   Deposited: 31-Jul-1997 Exp. Method: NMR, Minimized Average Structure	{ EXPLORE }
<i>Title</i>	Cu-Metallothionein From Saccharomyces Cerevisiae, NMR, Minimized Average Structure	
<i>Classification</i>	Metallothionein	
<i>Compound</i>	Mol_Id: 1 ; Molecule: Cu-Metallothionein ; Chain: Null ; Synonym: Cu-Mt ; Biological_Unit: Monomer	
 1AQS	   Deposited: 31-Jul-1997 Exp. Method: NMR, 10 Structures	{ EXPLORE }
<i>Title</i>	Cu-Metallothionein From Saccharomyces Cerevisiae, NMR, 10 Structures	
<i>Classification</i>	Metallothionein	
<i>Compound</i>	Mol_Id: 1 ; Molecule: Cu-Metallothionein ; Chain: Null ; Synonym: Cu-Mt ; Biological_Unit: Monomer	

Hefe CuMT

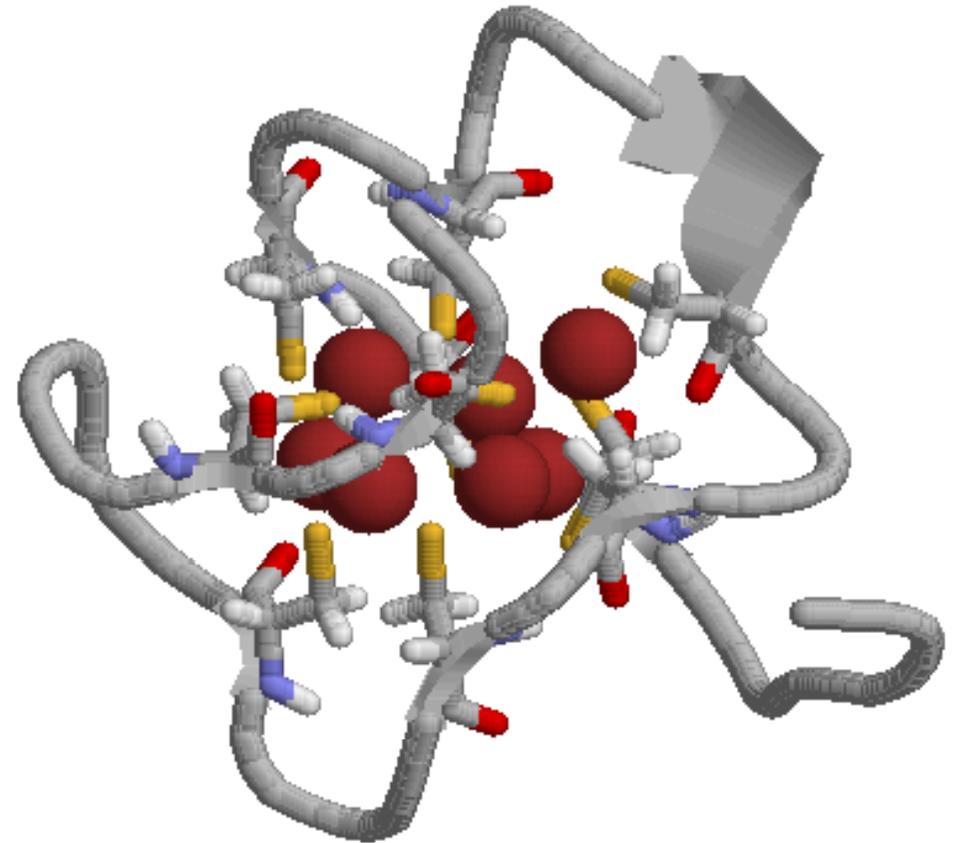


53 As davon
9 Cys
7 Cu- (Ag-)
Ionen werden
gebunden



Auch beim Menschen gibt es kupferbindende Metallothioneine (**CuMT-1 & 2**).

Die Homologie zum Hefepeptid ist groß, die Cysteine sind großteils konserviert.



Typische Cu-Bindungsmotive:
Cys-X-Cys bzw. Cys-X-X-Cys

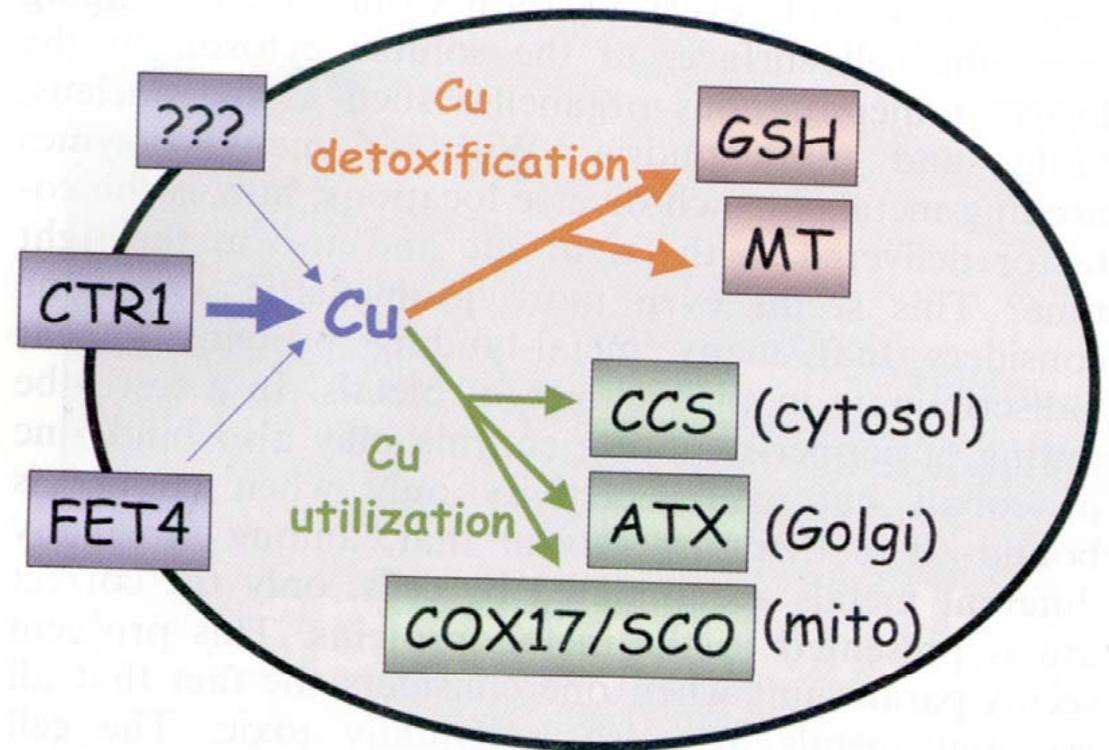
Metallothionein-Superfamilie (**CuMT** gehört zur Familie 12).

Ähnlich wie in Hefe spielt **Glutathion** bei Menschen wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle in der Detoxifizierung von Kupfer-Ionen.

Wie wird nun Kupfer innerhalb der Hefezelle verteilt?

Alle Kupfer-hältigen Proteine, die den **sekretorischen Weg** beschreiten, werden in einem speziellen Kompartiment des

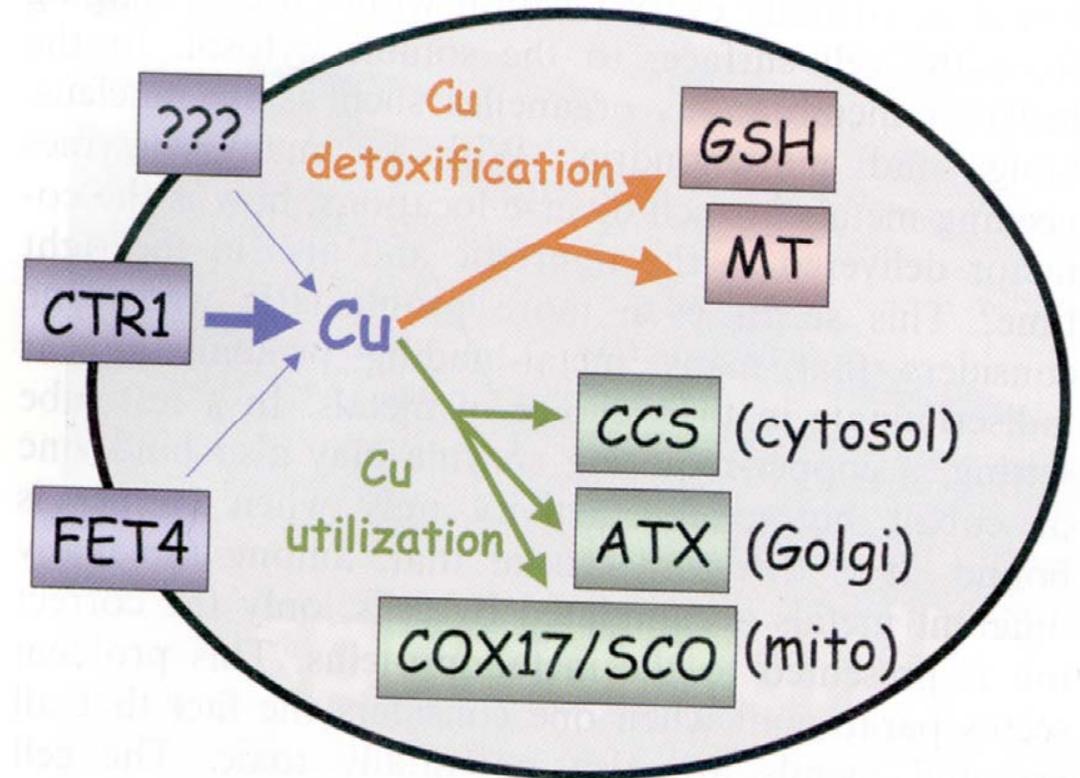
Golgi-Apparates fertiggestellt. Mit Hilfe eine **ATPase** vom P-Typ (**ATP7A** und **ATP7B**, Hefe: **CCC1&2**) wird dieses Kompartiment vom Cytosol mit Kupfer-Ionen versorgt (beim Menschen sind diese **ATPasen** auch als **Wilson** und **Menke'sche Krankheitsproteine** bekannt; Mutationen in entsprechenden Genen stören den Kupferstoffwechsel). Das Kupfer wird auf cytosolischer Seite mit Hilfe eines kleinen Kupfer-bindenden **Chaperons** angeliefert (**ATX** in Hefe, **HAH** beim Mensch).



Wie gelangt Kupfer in die **Mitochondrien (Cytochrom *c* Oxidase)**?

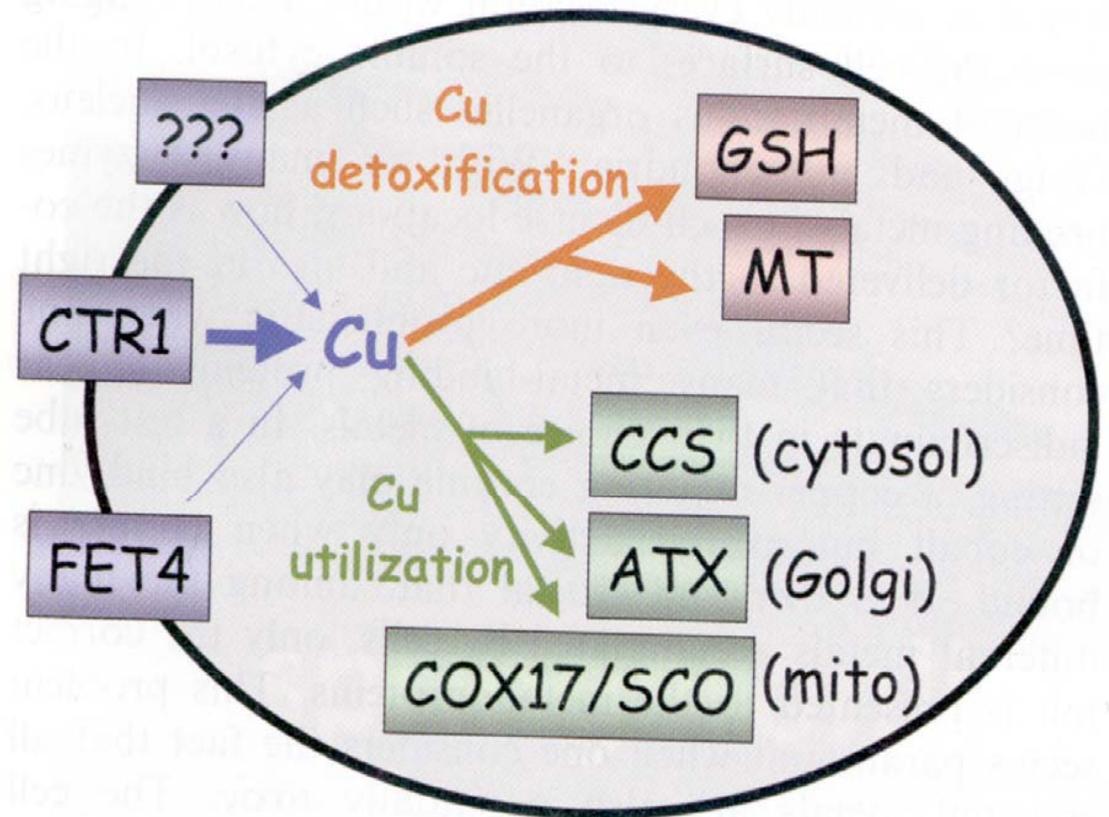
In der Hefe werden zumindest zwei Faktoren für den Transport benötigt, nämlich **COX17** (kleines Kupfer-bindendes Protein, das im Cytoplasma und Intermembranraum gefunden wird) und **SCO1 & 2** (Lokalisation in der Inneren mitochondrialen Membran). Mutationen in den entsprechenden humanen Proteinen sind letal. Wie COX17 und SCO1&2 zusammenwirken ist unklar.

COX11?



Wann verbleibt Kupfer im **Cytosol** (z.B. **CuZnSOD**)?

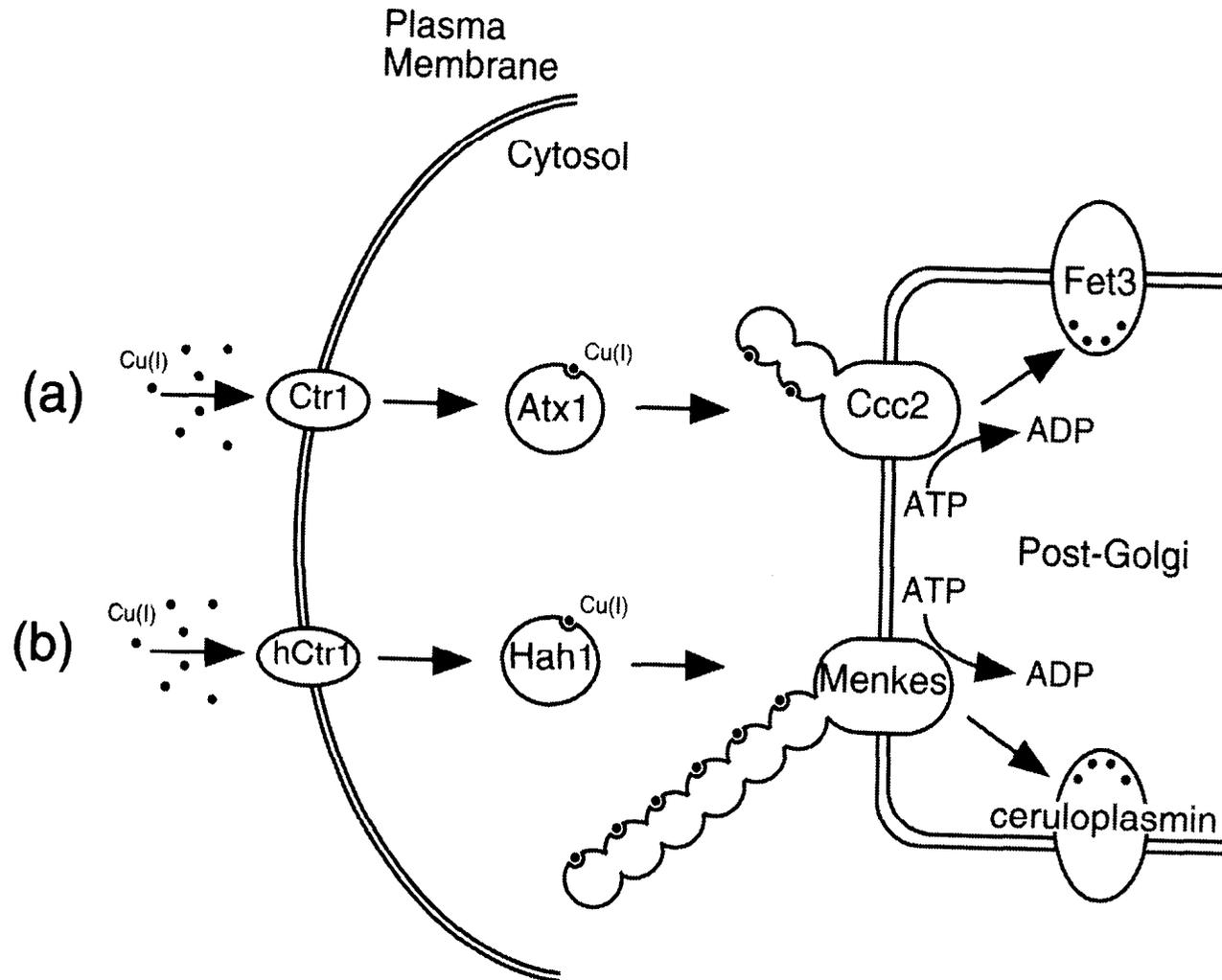
Für den Kupfereinbau in Superoxiddismutase (**SOD**) kennt man das Chaperon **CCS** (copper chaperone for SOD). Zinkeinbau in **SOD** noch völlig unklar.



Zusammenfassung:

- Die Wirkungsweise von Kupfer-Chaperonen ist spezifisch. Jedes Chaperon interagiert mit nur einem Targetmolekül.
- Im Gegensatz zu den Membrantransportern (Transporter mit hoher und niedriger Affinität) gibt es für Kupfer-Chaperone kein ausgeprägtes “*backup*”-System. Ohne **CCS** bleibt **SOD** in der apo-Form.

Vergleich Hefe-Mensch:



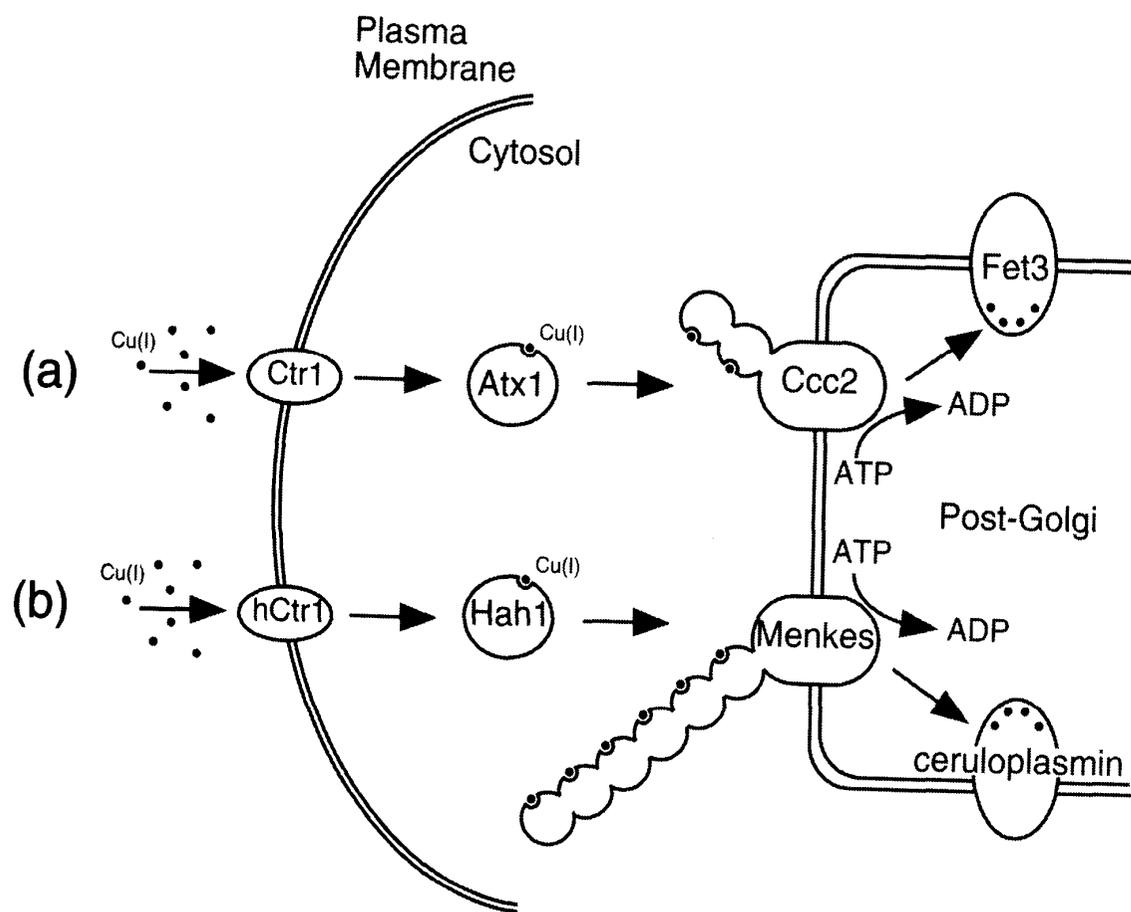
Proposed path for intracellular copper trafficking in (a) yeast and (b) humans.

Hefe: Aufnahme von Cu(I) mittels **CTR** (copper transport protein)

Mensch: Aufnahme von Cu(I) mit **hCTR** (homolog zu **CTR**)

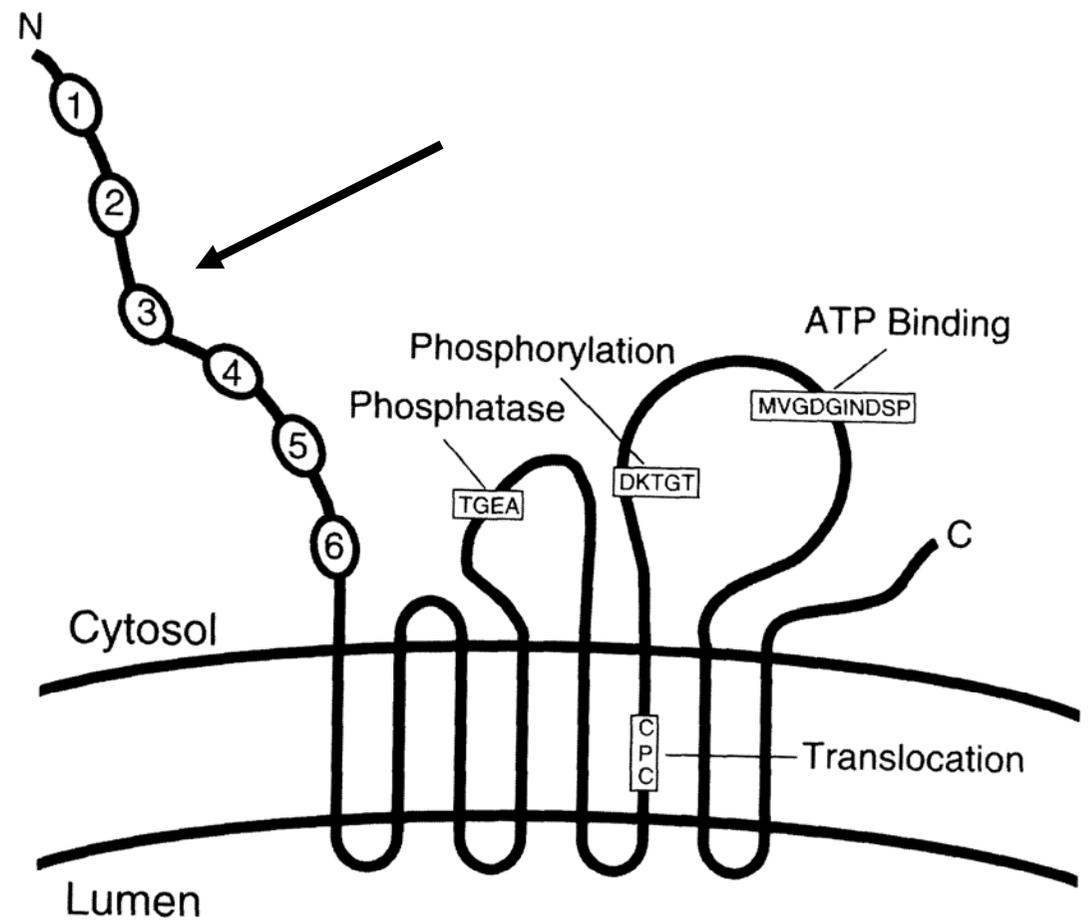
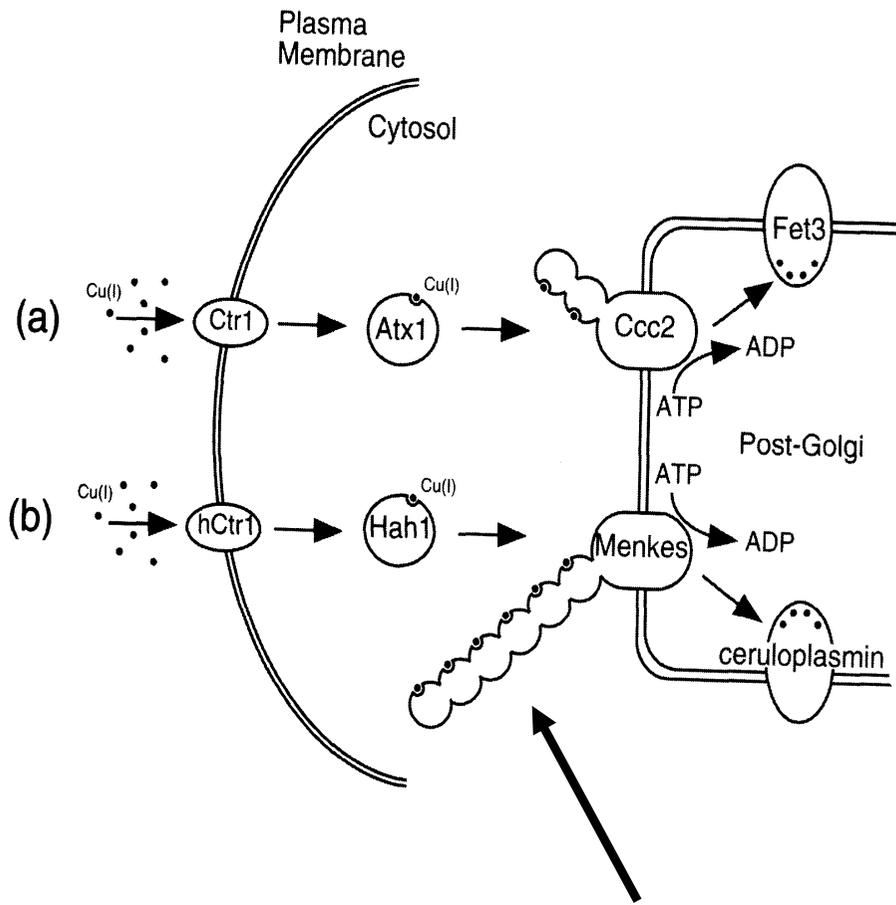
Hefe: Für Golgi bestimmtes Cu an Chaperon **ATX** weitergegeben.

Mensch: Für Golgi bestimmtes Cu an Chaperon **HAH** (**ATX** Homolog) weitergegeben.



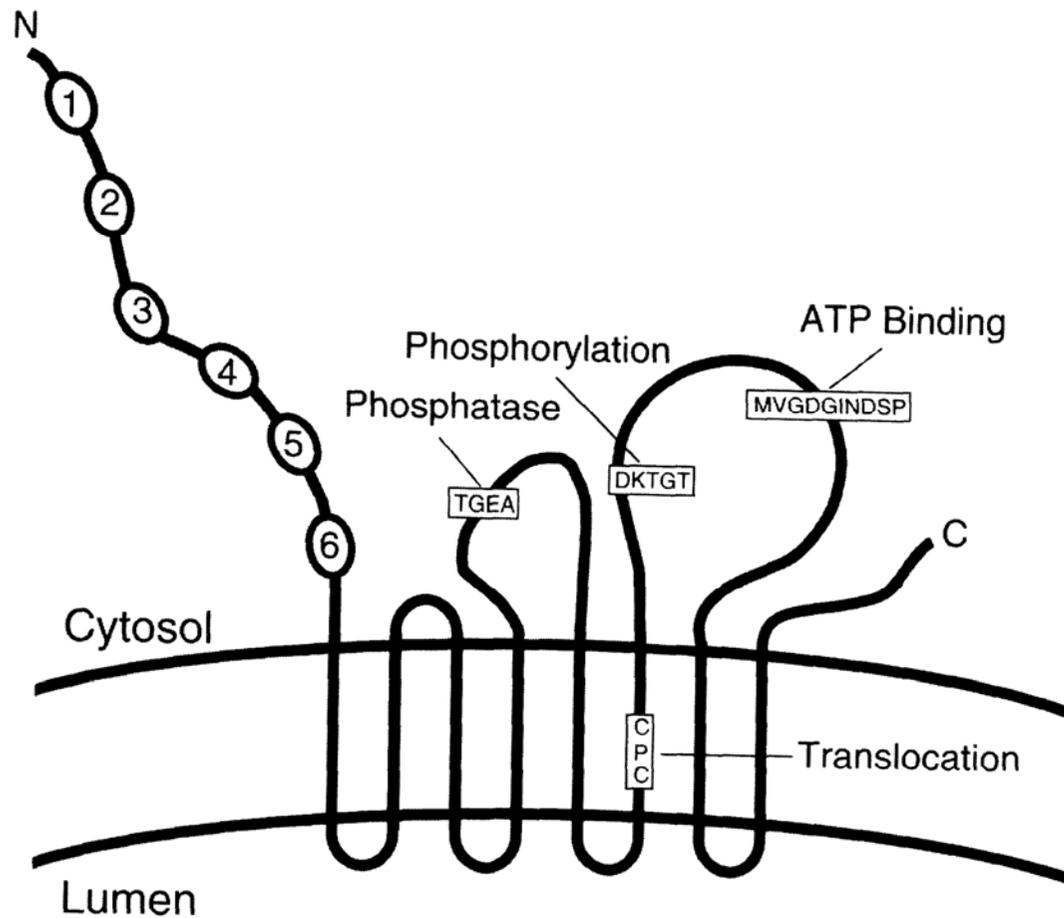
Hefe: Interaktion zwischen **ATX** und **ATP7A** oder **ATP7B** (ATPase vom P₁-Typ). Letztere transportieren Cu in das Lumen des Trans-Golgi Netzwerks. Dort wird es in die **Ferrooxidase Fet3**, ein Multikupfer-Protein, eingebaut (Transporter hoher Affinität für Eisen)

Mensch: Intrazellulär liefert HAH Cu(I) an das **Menkes** oder **Wilson'sche Krankheitsprotein** (entsprechen **CCC1&2** in Hefe) ab. Es handelt sich um eine typische Kation-transportierende ATPase vom P-Typ (Kation-Transport unter ATP Hydrolyse). Schließlich wird Cu an **Caeruloplasmin**, einem Multikupferprotein (**Fet3**-Analogon) abgegeben.



Das Menkes-Protein ist ein integrales Membranprotein mit sechs cytoplasmatischen Metall-bindenden Domänen, die wahrscheinlich mit dem Chaperon **HAH** interagieren.

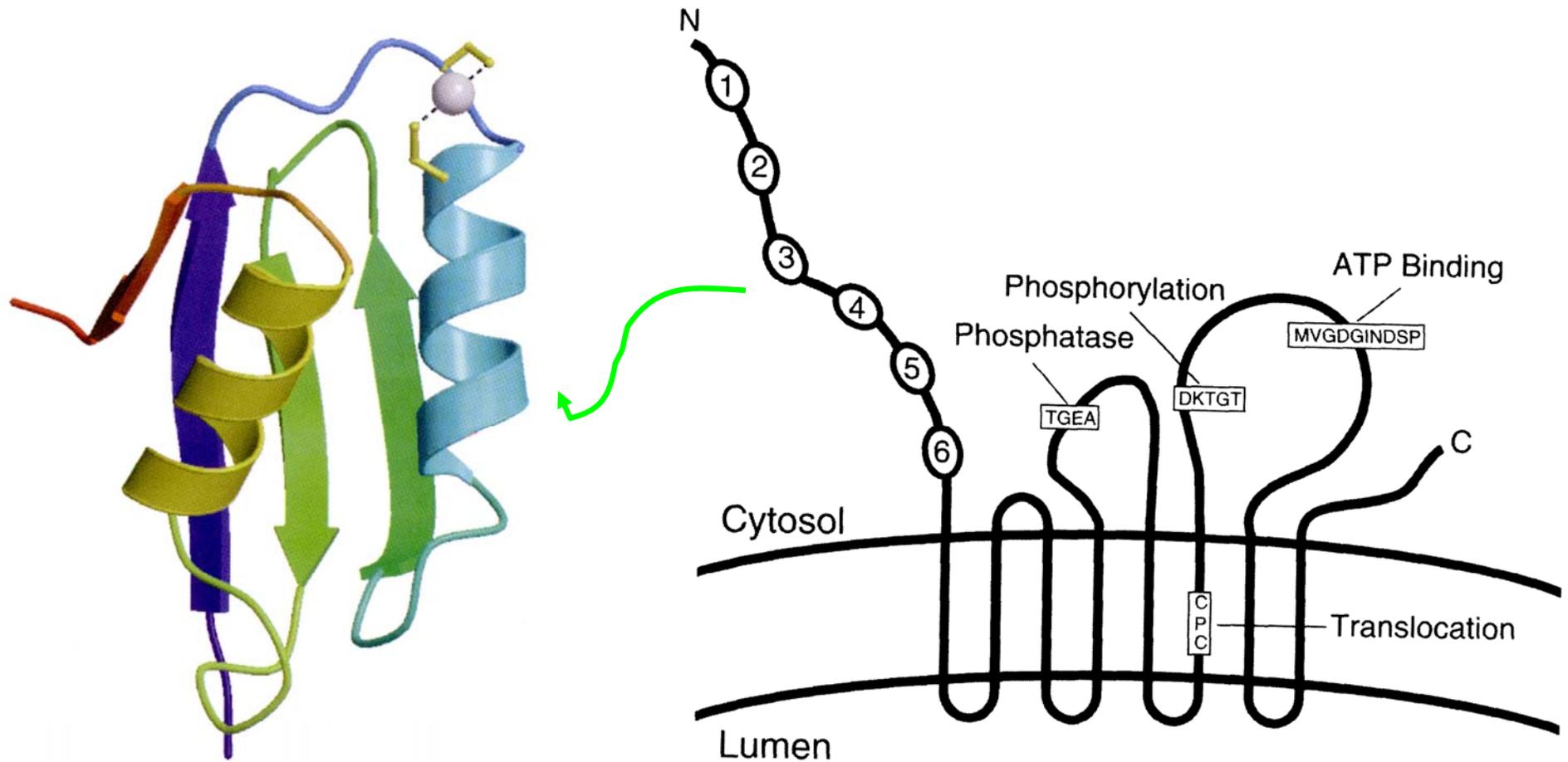
Mutationen im Gen stören den Import-Export von Cu in das Lumen des Golgi und führen zur Kupferakkumulierung in den Zellen.



Typisch für eine Kationen-
translozierende **ATPase**
vom Typ P:

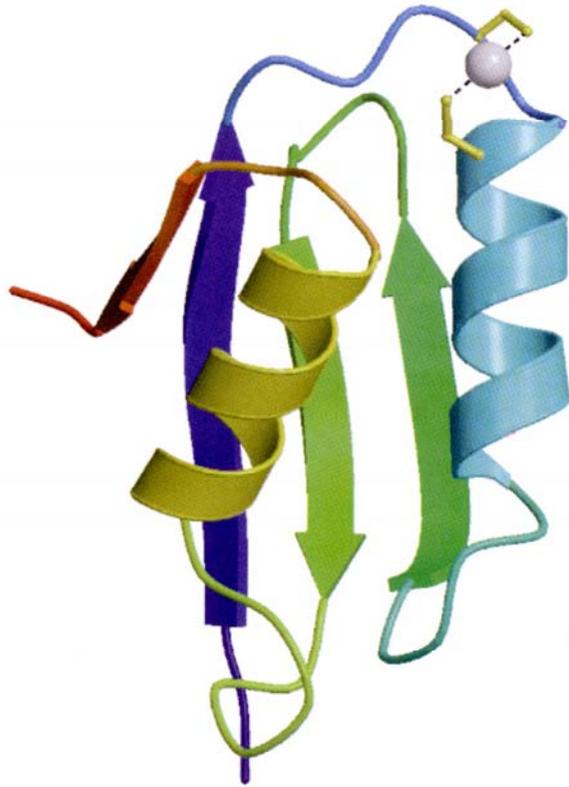
- a) Cytoplasmatische **Phosphorylierungsstelle** und **ATP-bindende Domäne**
- b) Prolin-hältige **Translokationsdomäne** (Transport durch Konformationsänderung)

c) **N-terminale, cytoplasmatische Metall-bindende Region**, im Falle des humanen Enzyms aus 6 Domänen, im Falle des Hefeenzym aus zwei Domänen bestehend.

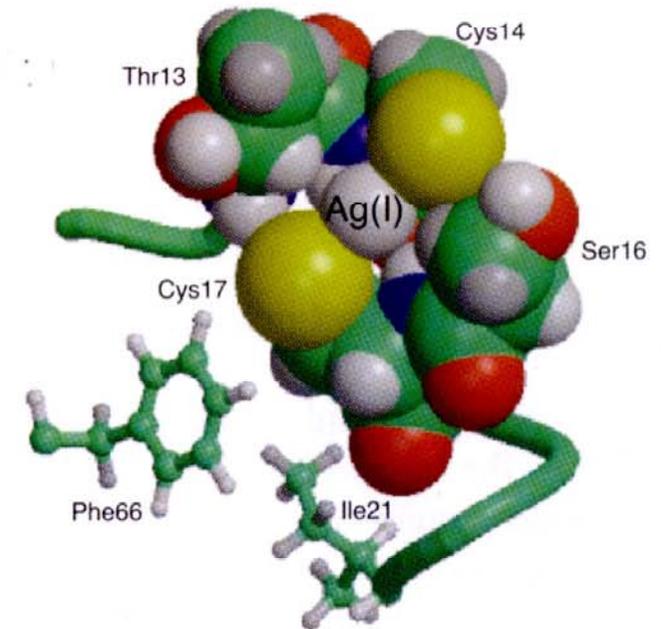
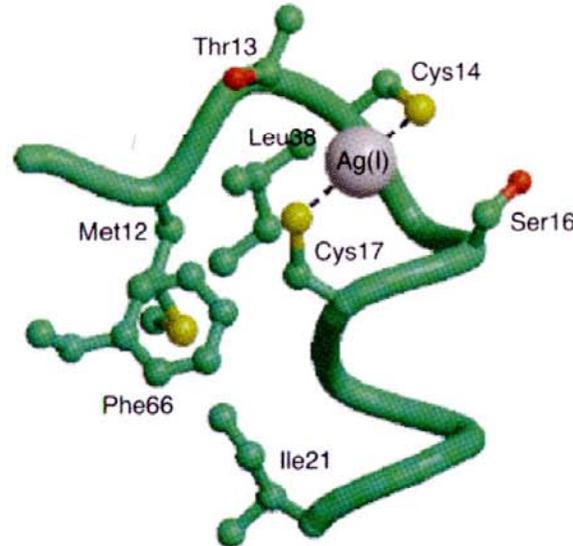
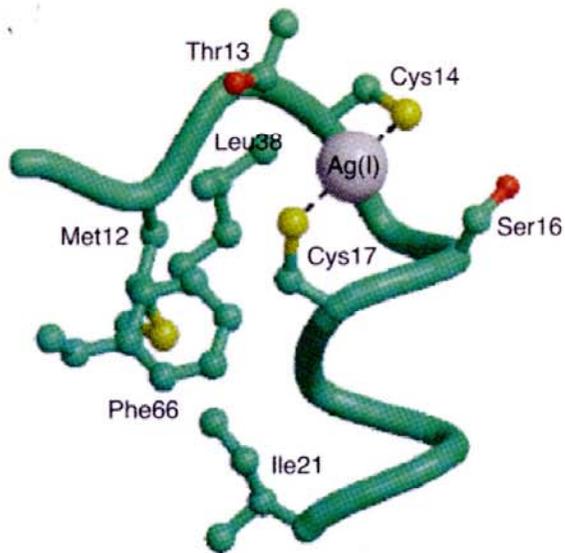


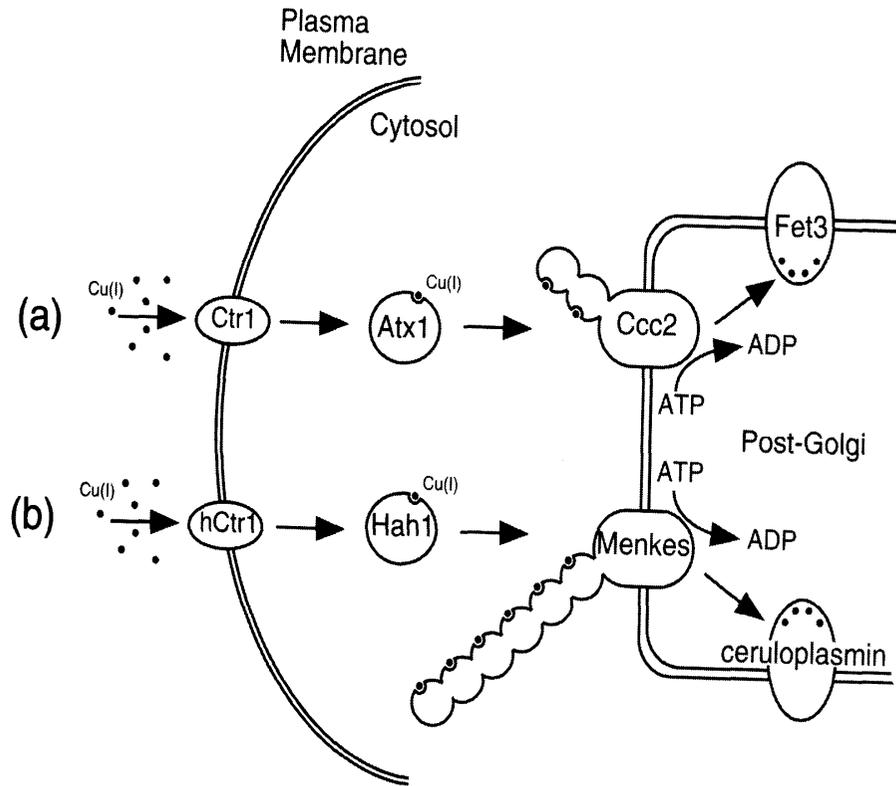
Typisches Motiv: GMG**CXXC** pro Domäne.

Warum 6 Domänen notwendig sind ist unklar. Speicherung?
 Mutationsanalysen (Austausch der Cysteine) zeigen, dass nicht alle sechs Domänen für den Eintransport (= Weitergabe von Cu(I) an die Translokationseinheit) notwendig sind.



Cu(I) bzw. Ag(I)-Bindungsloop in einer Domäne des **Menke'schen Proteins**: Neben 2 Cys-Resten wird das Ion von zwei weiteren As (Leu, Ser, Thr, His) flankiert (unterschiedlich in den einzelnen Domänen!).





Menke'sches Protein und Wilson'sches Protein sind in der Membran des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN) lokalisiert.

Menke'sches Protein (ATP7A):
Expression in Herz, Gehirn, Lunge, Niere, Pankreas, Skelletmuskel.

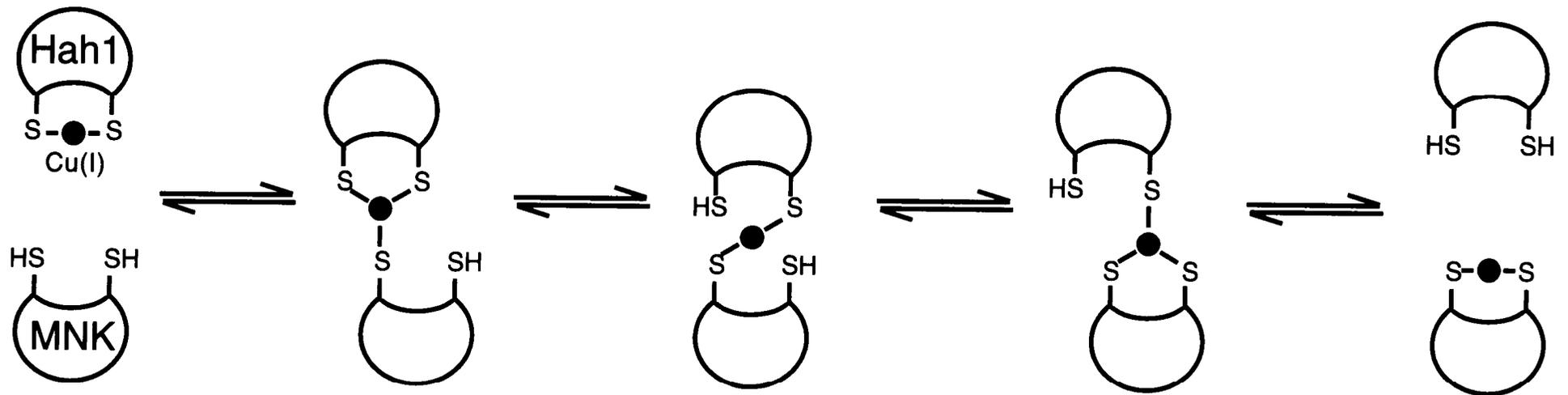
Wilson'sches Protein (ATP7B):
Expression hauptsächlich in Leber.

In der cytoplasmatischen Membran sitzt beim Menschen **hCTR1** (high affinity Cu transport protein): 3 transmembranale Domänen und eine hydrophile aminoternale kupferbindende Domäne (reich an Met; Motiv **Met-X-Met-X-X-Met**).

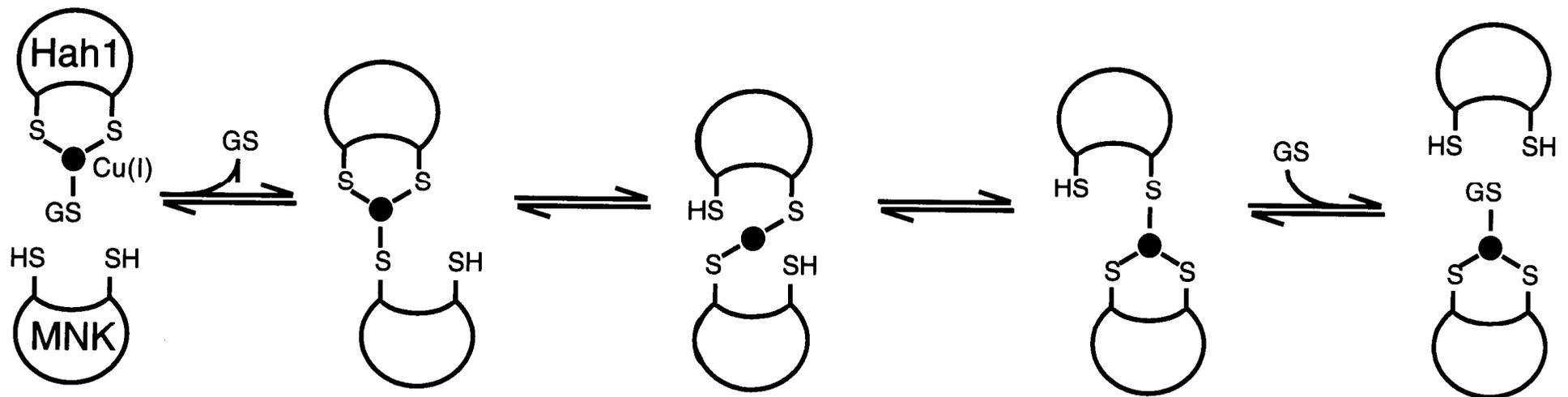
K_M in μM Bereich.

Defektes Gen führt bei Mäusen zu nicht-lebensfähigen Embryos.

Wie wird nun Cu ohne Freisetzung innerhalb der Zelle von Transportmolekülen an Chaperone und umgekehrt abgegeben?

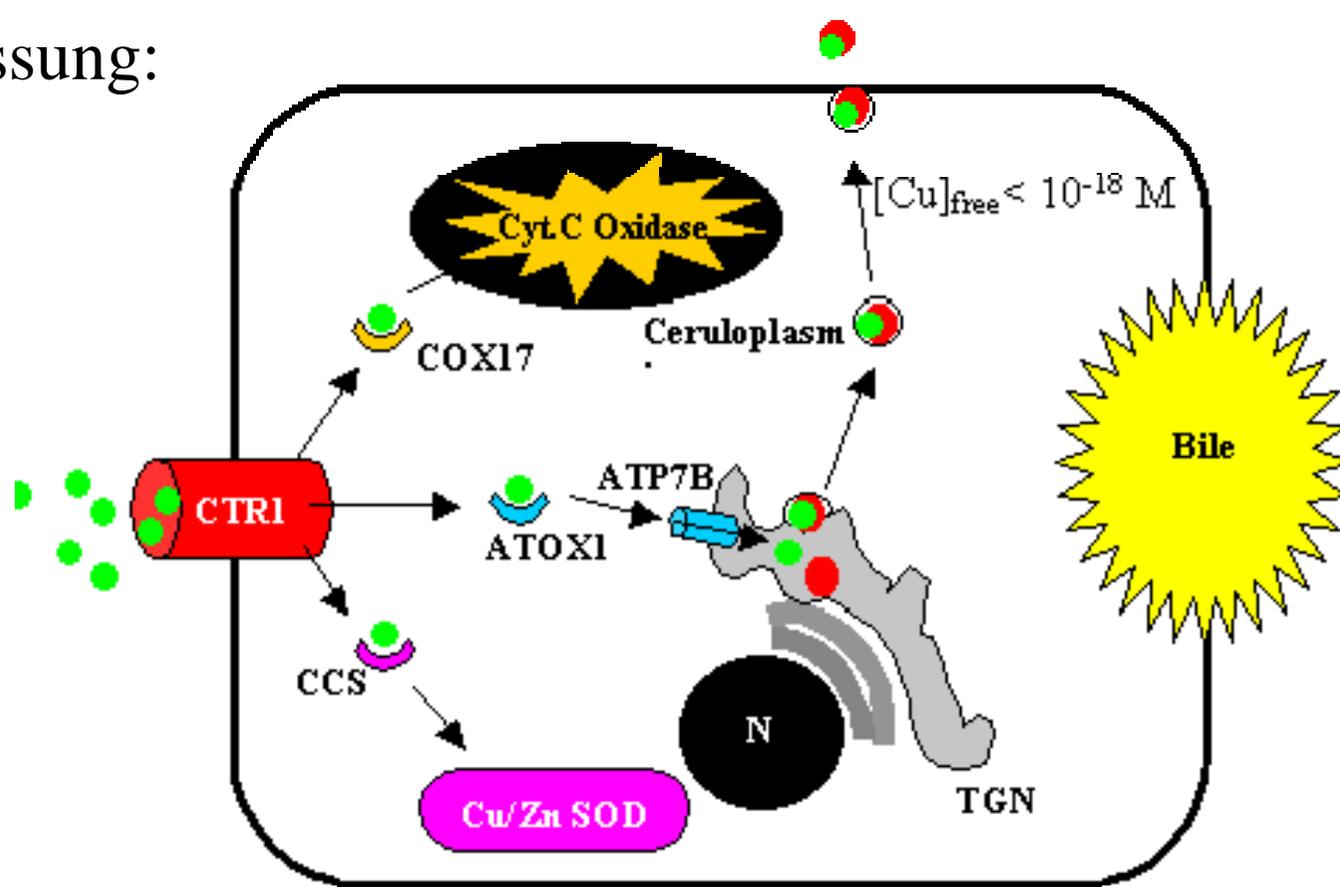


Ist Glutathion beteiligt?



Mögliche Wechselwirkung zwischen dem cytosolischen Chaperon **HAH** und dem Membran-gebundenen Transporter (**Menke-Protein**).

Zusammenfassung:



Über den Kupfer-Transporter (**CTR1**) wird Kupfer in die Leberzelle aufgenommen und spezifisch zielgerichtet über Chaperone der Zelle weitertransportiert: **COX17** für **Cytochrom c Oxidase**, **CCS** CuZn-Superoxid-Dismutase, **ATX (ATOX1)** für Transport zum Wilson-Protein. Das Wilson-Protein ist eine Membran-ständige, Kupfer-transportierende ATPase (**ATP7B**) des trans-Golgi-Netzwerk (**TGN**). Im TGN erfolgt der Einbau von Kupfer in **Caeruloplasmin**, das über Exozytose ins Blut ausgeschleust wird.

Spurenelement Kupfer

1. Chemie des Kupfers
2. Aufnahme, Transport und Speicherung
3. Typen von Kupferproteinen

4 Typen von Kupfer-Zentren

Einteilung aufgrund struktureller- und spektroskopischer Daten

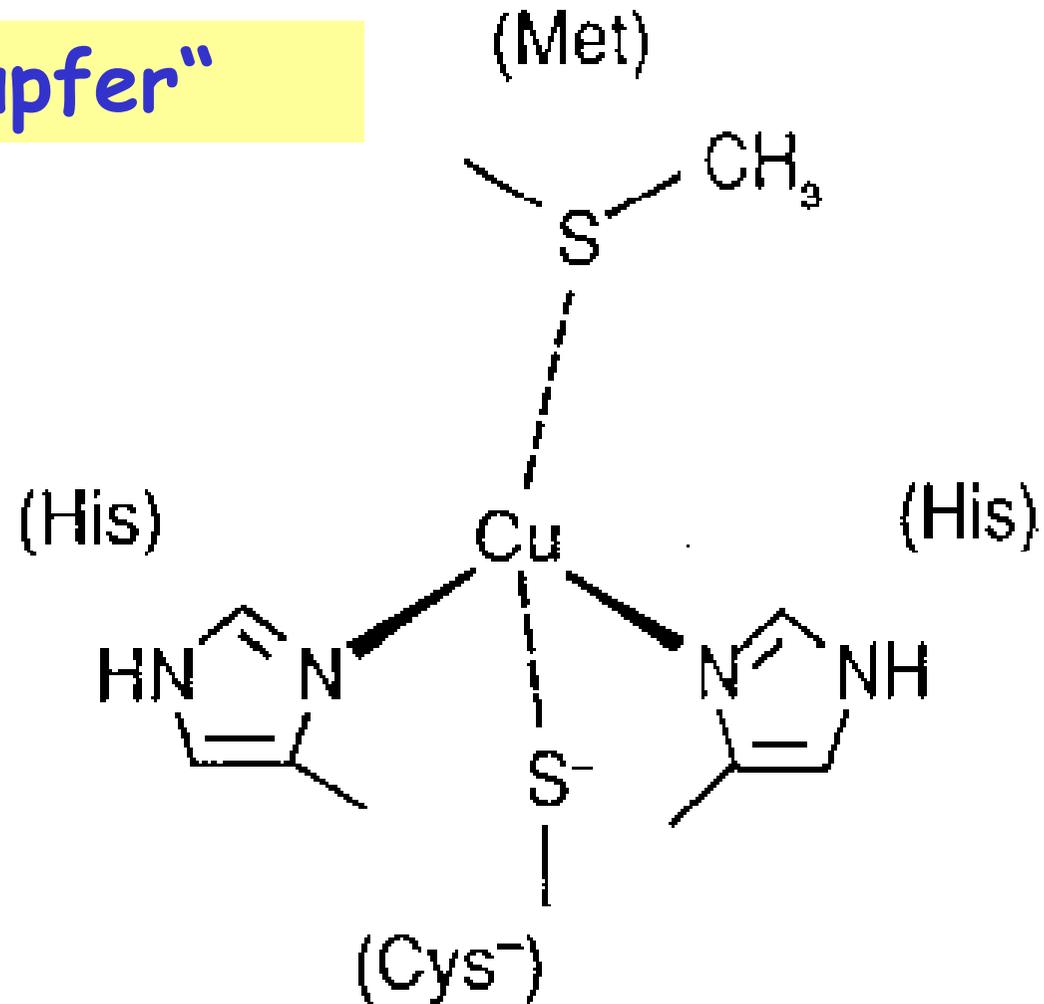
- Typ 1:** “Blaues” Kupfer
Funktion: reversibler Elektronentransfer
Struktur: stark verzerrter Polyeder
(3+ 1)-Koordination
- Typ 2:** normales, “nicht-blaues” Kupfer
Funktion: Sauerstoffaktivierung
Struktur: weitgehend planar
- Typ 3:** Kupfer-Dimere
Funktion: O₂-Aufnahme und -Abgabe
Struktur: (verbrücktes) Dimer
- Typ 4:** Cu_A in Cytochrom-Oxidase

Realität: Kombination verschiedener Typen (**Mischtypen**)

Typ 1 „Blaues Kupfer“

Funktion:

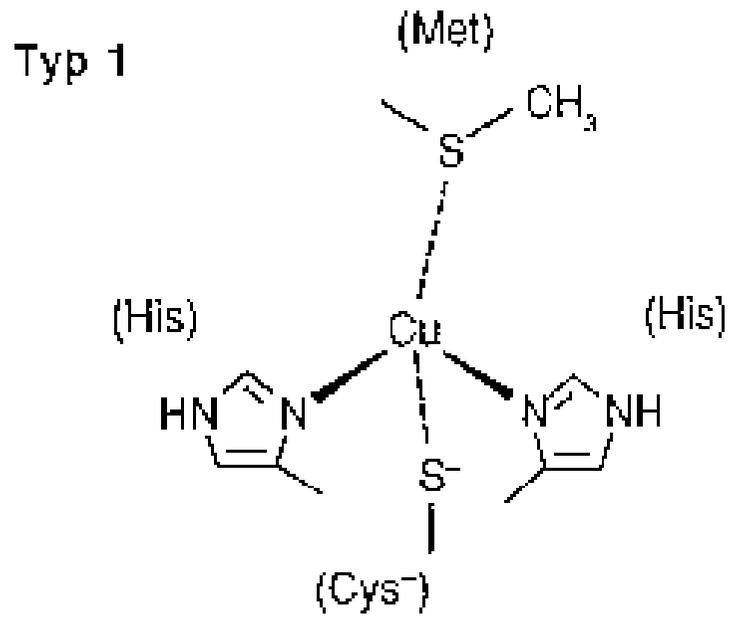
**reversibler
Elektronentransfer**



Farbe: blau, Absorption der oxidierten Cu(II)-Form um 600 nm, $\epsilon > 2000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

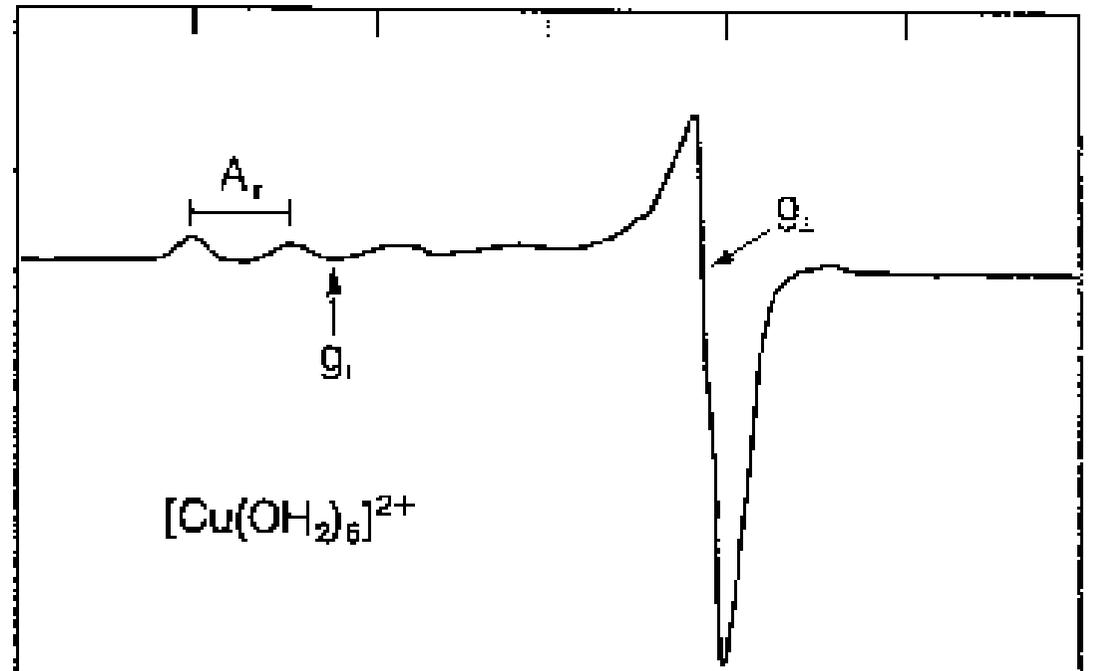
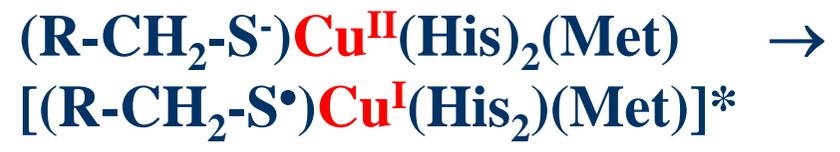
Ursache: LMCT-Übergang $\text{S}^-(\text{Cys}^-) \rightarrow \text{Cu(II)}$

Typ 1: „Blaues“ Kupfer

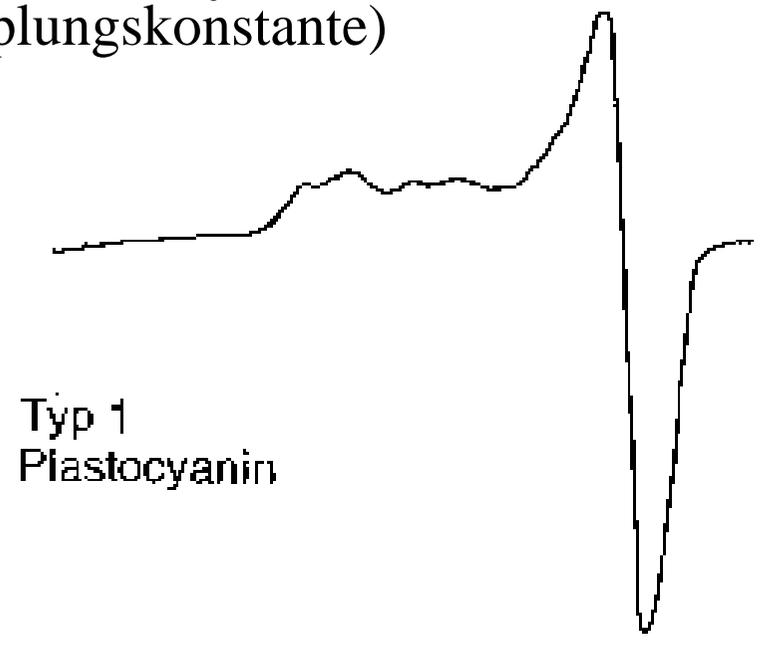


LMCT = Ligand-Metall-Charge-Transfer: Übergang von Elektronenladung von π - und σ -Orbitalen der elektronenreichen Thiolat-Liganden zum elektronenarmen (oxidierten) Metallzentrum

$h\nu$
LMCT



EPR-Spektroskopie zeigt die Delokalisierung von Ladung vom Liganden zum Metallzentrum bzw. des Spins vom Metall zum Cysteinatschwefel (kleine Kopplungskonstante)



Cu(I) (d^{10}) bevorzugt tetraedische Anordnung und weiche S-Liganden

Cu(II) (d^9) bevorzugt quadratisch-planare oder quadratisch-pyramidale Geometrie und N-Liganden

Typ 1 Cu-Zentren: (je 2 N und 2 S-Liganden)
Kompromiß (entatischer Zustand), d.h. die verzerrte Anordnung am Metall entspricht einem Kompromiß zwischen der tetraedischen und der planaren Vorzugs- (=Energienminimums) Konfiguration der beiden Oxidationszustände

⇒ **ERHÖHUNG DER ELEKTRONENÜBERTRAGUNGSGESCHWINDIGKEIT DURCH “ZWISCHEN-GEOMETRIEN”**

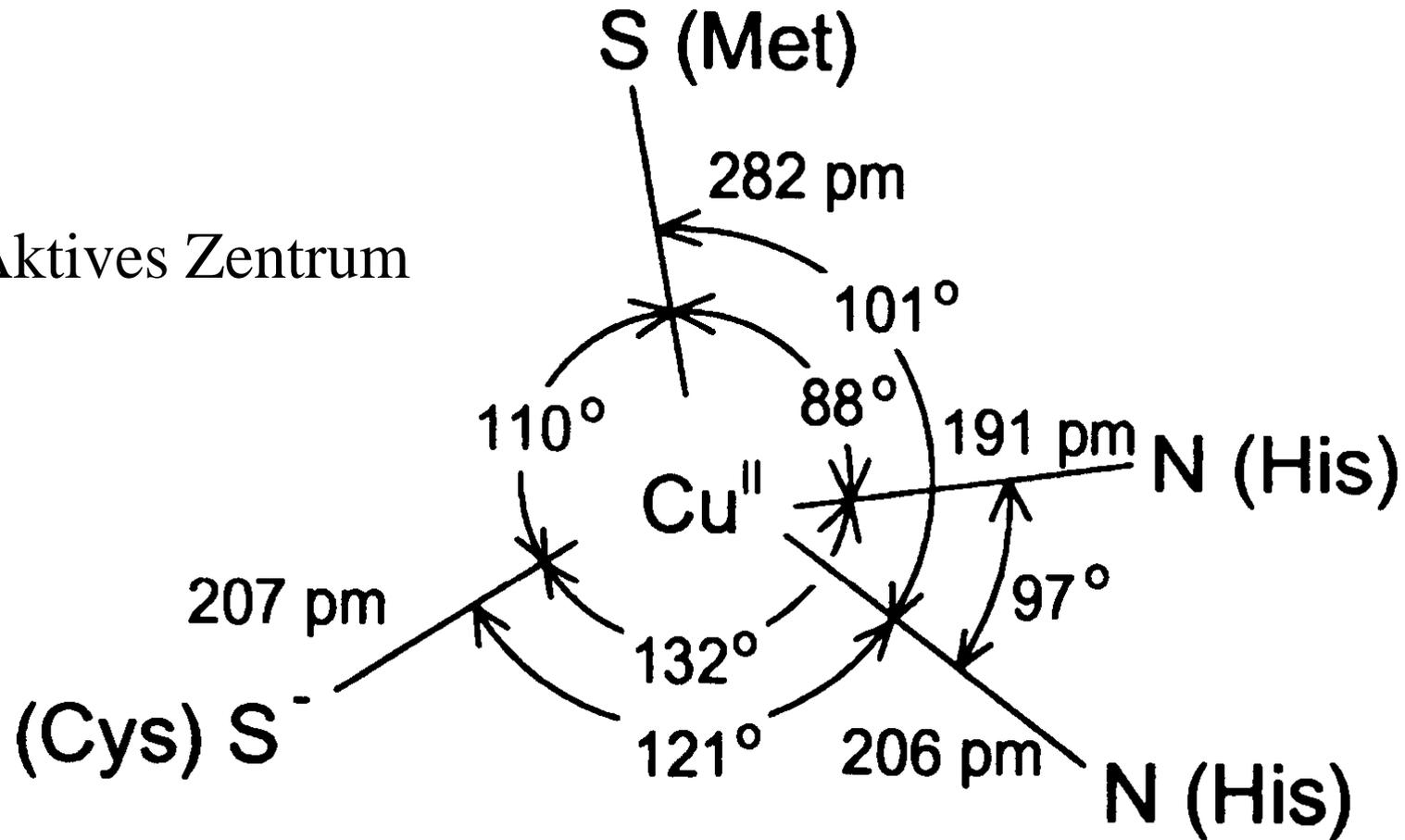
Vgl. Cytochrome und Eisen-Schwefelproteine in Elektronentransportsystemen

Hochkonservierte

Aminosäuresequenz:

His-X-Cys-XX-His-XXXX-Met

Azurin: Aktives Zentrum



Struktur:

stark verzerrter Polyeder (3+1)-Koordination

Fest koordiniert: 2 His, Cysteinat

Schwach koordiniert: Met

(und event. Peptid-C=O)

Koordinationsumgebung
des Kupfers in **Azurin**

aus *Alcaligenes*

denitrificans

(α -C-Zentren).

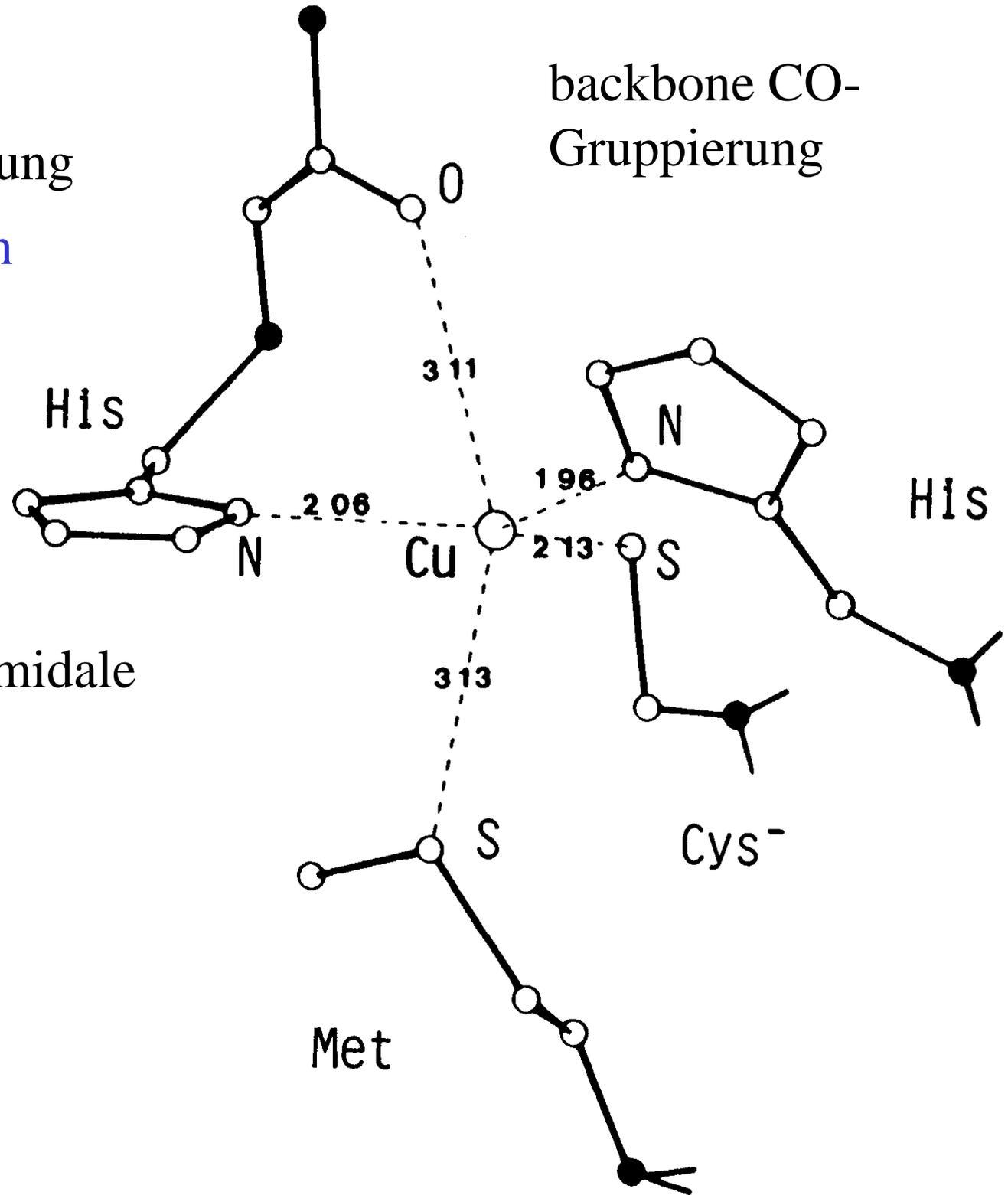
Trigonal-pyramidal

bzw. Trigonal-bipyramidale

Anordnung (je nach

Einschätzung der

Bindungsstärken)



Typ 1 Cu-Proteine

Elektronen-Überträger



A. “Reine” Typ 1 Cu-Proteine

(Elektronencarrier: Plastocyanin, Azurin)

Plastocyanin (MW 10.5 kDa, 1 Typ 1, $E^{\circ\prime} = 0,3 - 0,4 \text{ V}$)

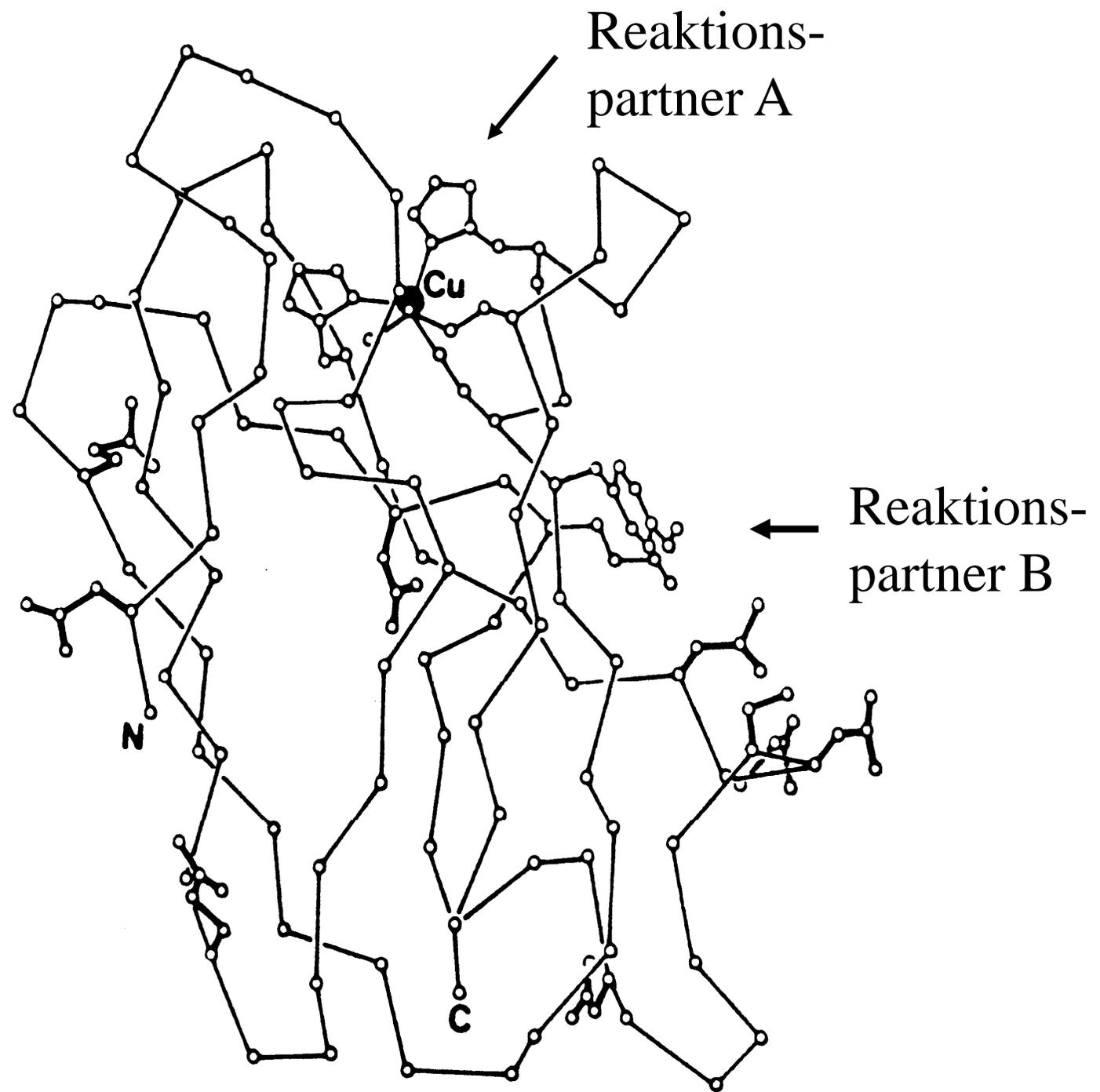
Beteiligung an pflanzlicher und cyanobakterieller (oxygener) Photosynthese

Azurin (MW 16 kDa, 1 Typ 1, $E^{\circ\prime} = 0,2 - 0,4 \text{ V}$)

Beteiligung an bakterieller (anoxygener) Photosynthese

B. Typ 1 Cu in Multienzymkomplexen (**Laccase**, **Ascorbat Oxidase**). Funktion: Elektronenübertragung vom Substrat ins eigentliche „aktive“ Zentrum.

Das aktive
Zentrum von
Plastocyanin



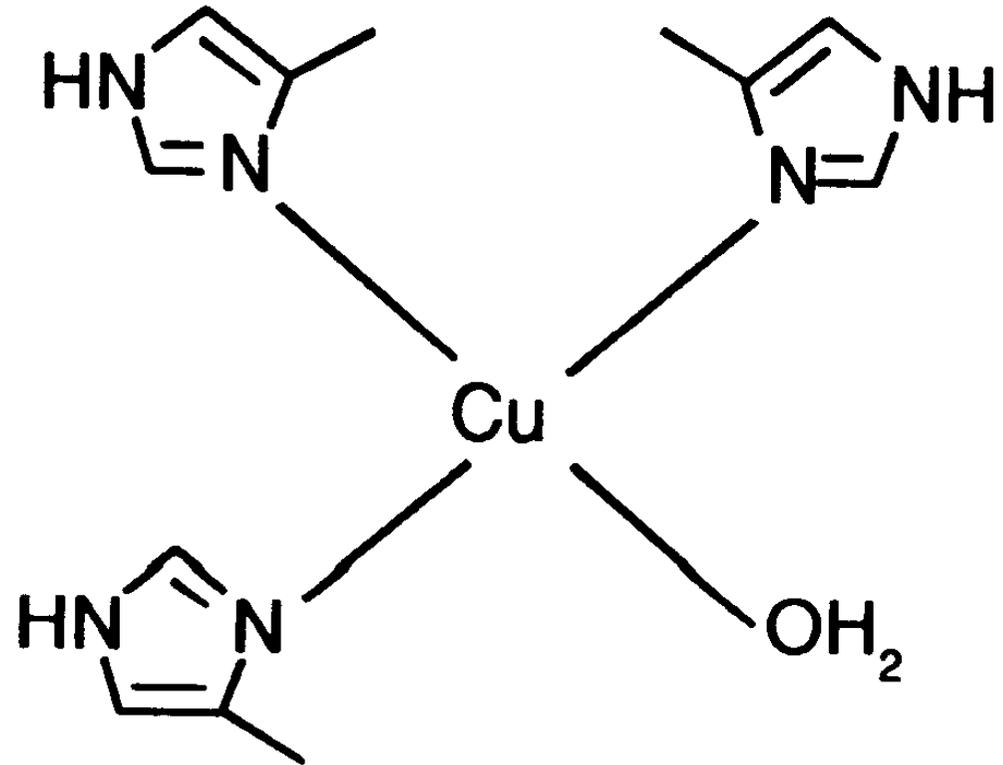
Typ 2 Cu-Proteine

Typ 2

Normales,
“nicht-blaues” Kupfer

Typisch schwache Absorptionen
von Cu(II),
 $\epsilon < 1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
($d \rightarrow d$ Ligandenfeldübergänge)

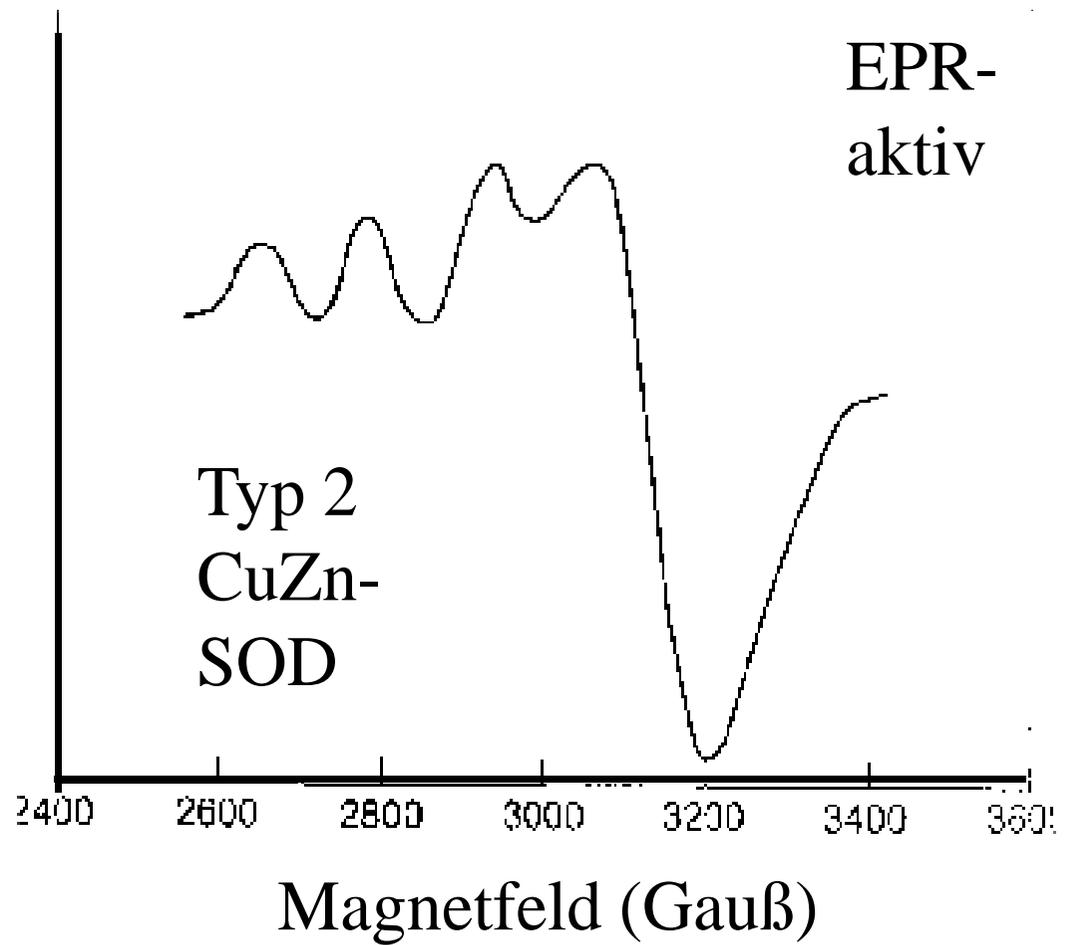
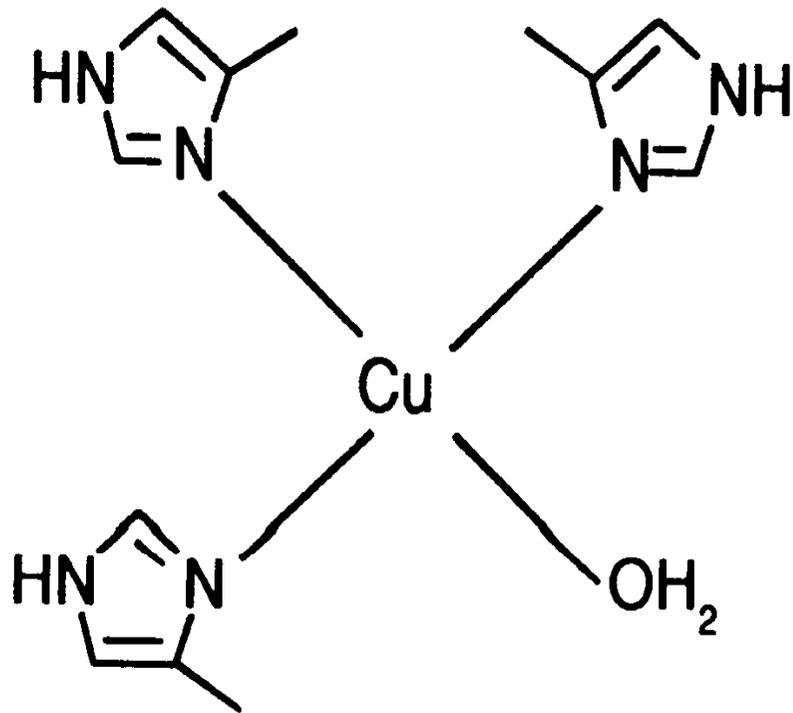
Normales Cu(II)-ESR



Struktur: weitgehend planar mit schwacher zusätzlicher Koordination (Jahn-Teller-Effekt: Verzerrung aufgrund der WW zwischen Liganden und d -Elektronen des Zentralatoms)

Typisches „normales“ Cu(II)-ESR-Spektrum

Typ 2



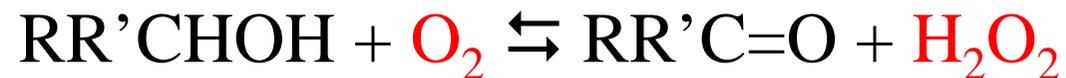
Reine'' Typ 2 - Enzyme

Typ 2-Kupfer OXIDASEN

(Zwei-

Elektronen-Reduktion des molekularen Sauerstoffs zu
Wasserstoffperoxid: $O_2 \rightarrow H_2O_2$)

Galactose-Oxidase: MW = 68 kDa, 1 Typ 2,
Funktion: Alkohol-Oxidation in Pilzen

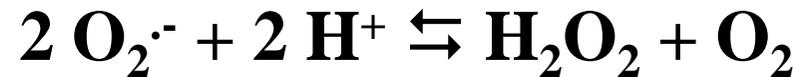


Amin-Oxidasen: MW = 70 kDa, 1 Typ 2,
Funktion: Abbau von Aminen zu
Carbonylverbindungen



Reine'' Typ 2 - Enzyme

Cu-Zn-Superoxid-Dismutase



Monooxygenasen



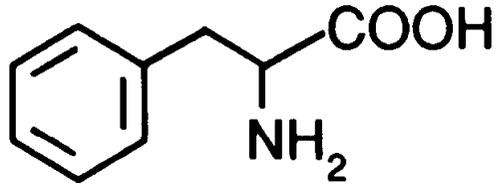
Dopamin- β -Monooxygenase:

MW 290, 2 Typ 2

Funktion: Umwandlung von Dopamin durch Seitenkettenoxidation zu Noradrenalin in der Nebennierenrinde

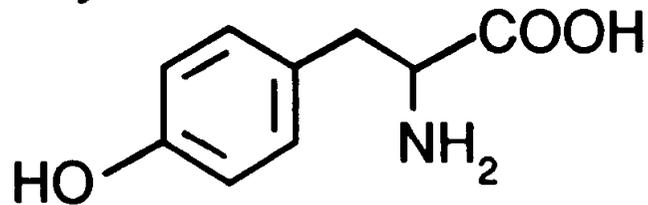
Phenylalanin-4-Monooxygenase
und Dopamin- β -Monooxygenase:
Biosynthese von Adrenalin

L-Phenylalanin



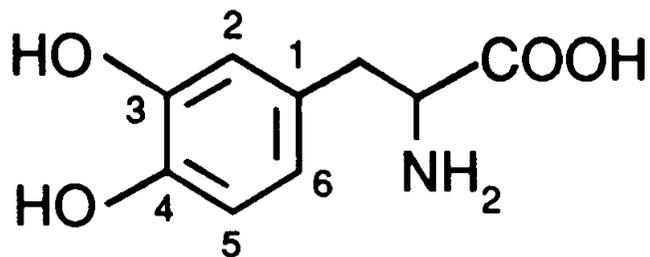
Phenylalanin-4-Monooxygenase
(Fe/Pterin oder Cu/
Pterin)

L-Tyrosin



Tyrosin-3-Monooxygenase (Cu)

L-Dopa

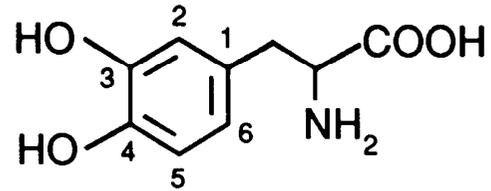


Typ 2-Kupferprotein

Beteiligung von
Kupferproteinen an der
Biosynthese von Dopa,
Dopamin und Adrenalin

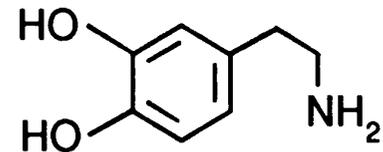
Typ 3-Kupferprotein

L-Dopa



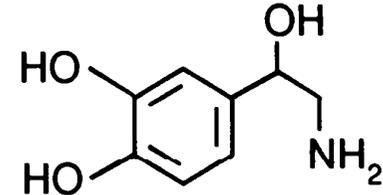
Dopa-Decarboxylase

Dopamin



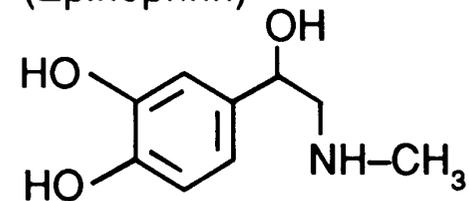
Dopamin-β-Monooxygenase (Cu)

L-Noradrenalin



Noradrenalin-N-Methyltransferase

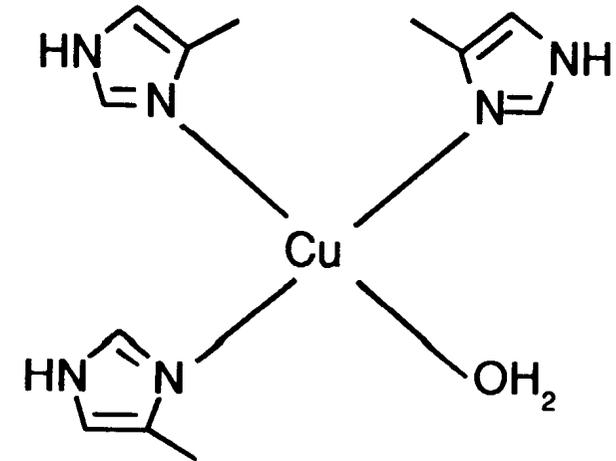
L-Adrenalin
(Epinephrin)



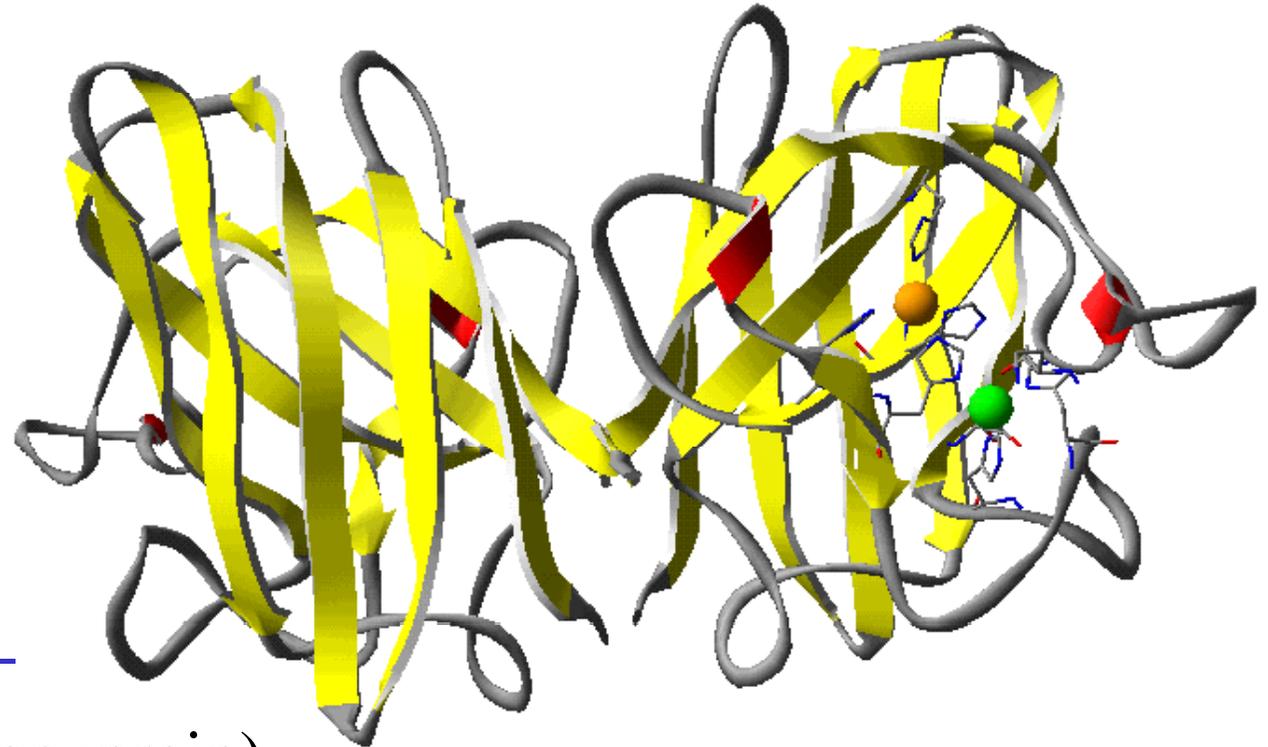
Dopamin-
monooxygenase



Typ 2



CuZn- Superoxiddismutase



Humane CuZn-Superoxid-
Dismutase (früher: Erythrocytein)

- Typ 2-Kupfer-Protein
- 2 identische Untereinheiten (2×16 kDa), die durch hydrophobe WW zusammengehalten werden
- Jede Untereinheit besteht aus einer Fass(barrel)-ähnlichen Struktur mit 8 β -Faltblättern, und 3 externen Loops

Tetrakoordinierte Metallzentren

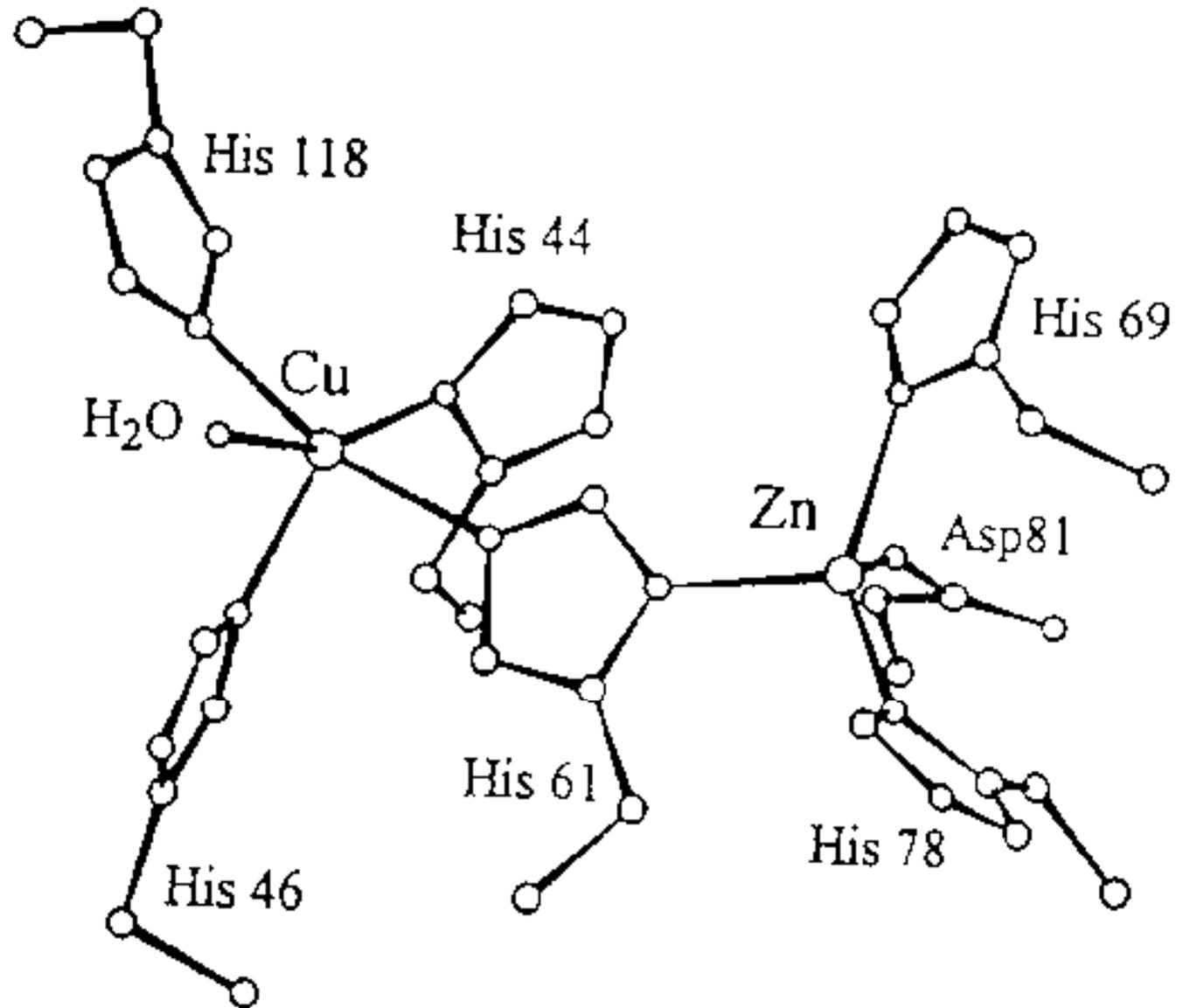
Cu 3 His

Zn..... 2 His, 1 Asp

Cu und Zn über
deprotonierten
Imidazolol-Ring
eines Histidin-
Restes verbrückt !

Abstand

Cu-Zn 6 Å



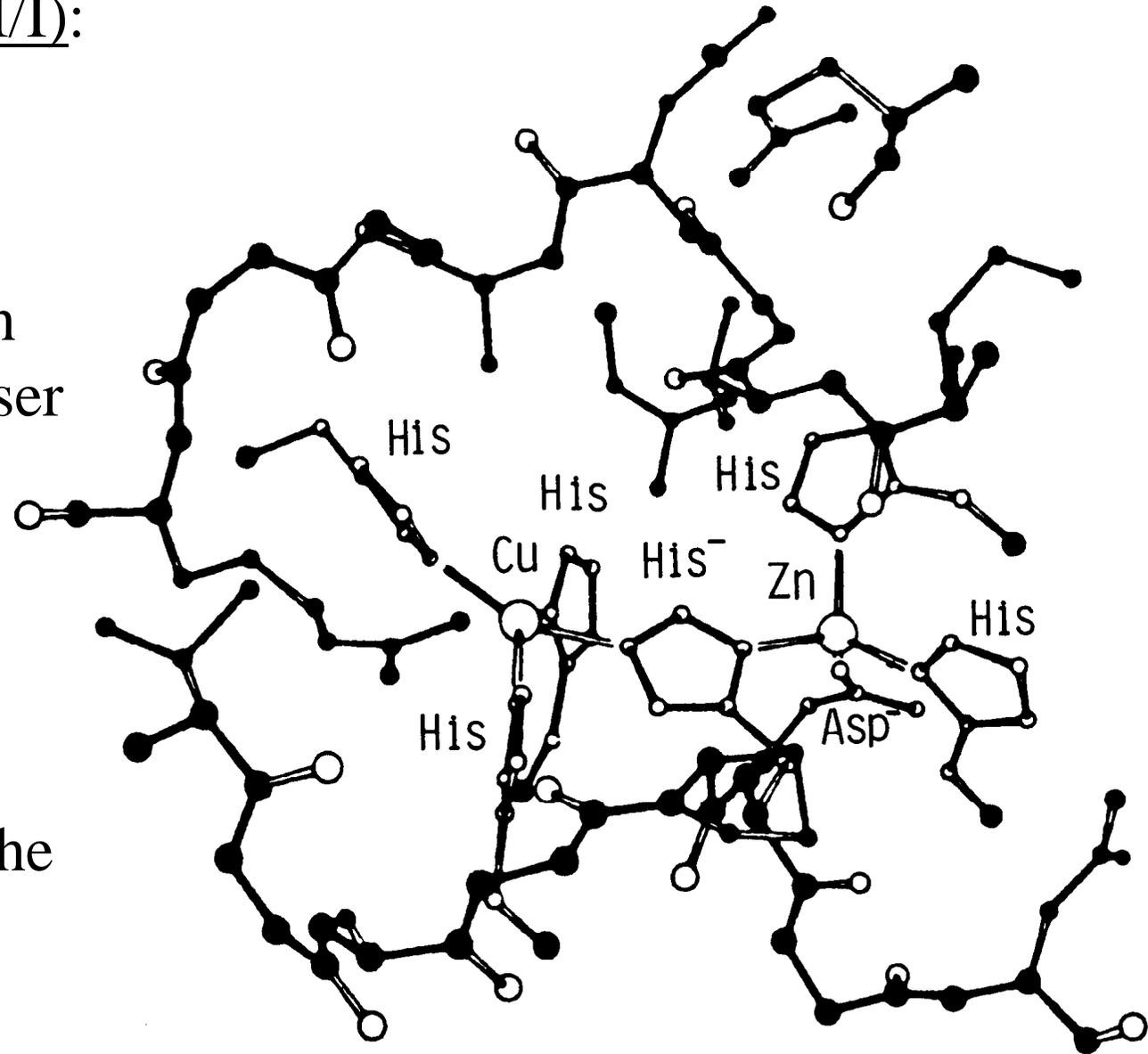
Redoxaktives Cu(II/I):

4 His und ein H₂O-
Molekül

Anordnung: Stark
verzerrt quadratisch
pyramidal mit Wasser
in der apikalen
Position

Zn:

3 His, Asp; stark
verzerrte tetraedische
Anordnung

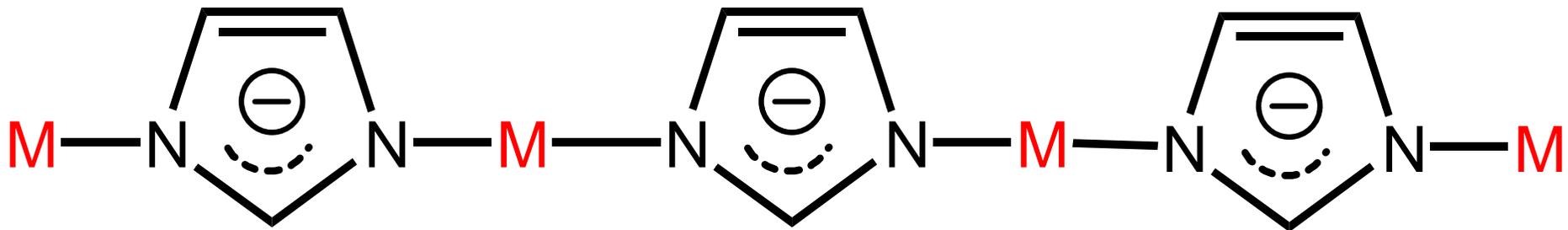


Cu und Zn - verbrückender Ligand: IMIDAZOLAT

Typisch für anorganische Imidazol-Komplexe von Metallionen

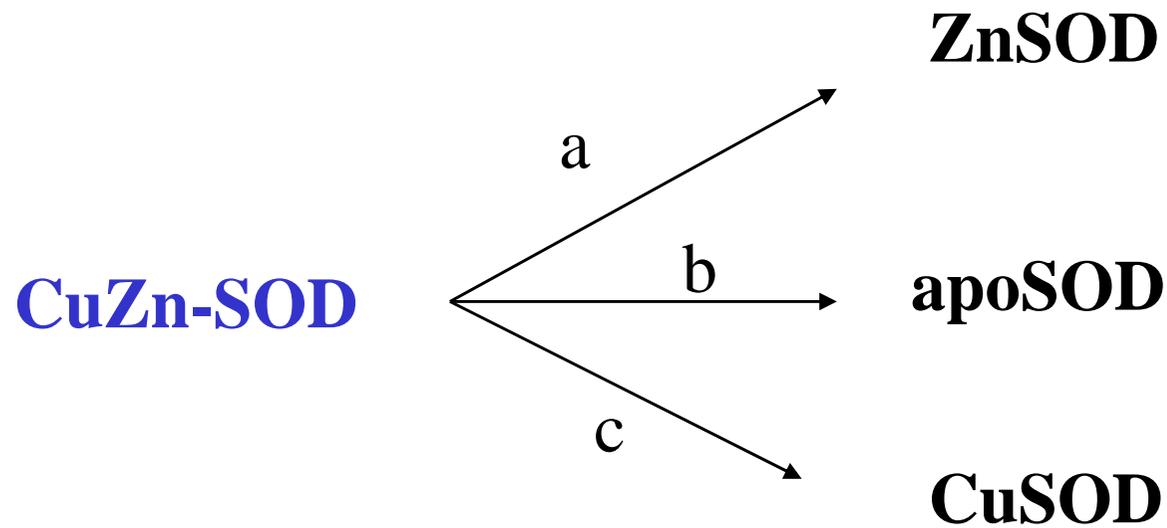
→ Bildung großer polymerer Imidazolat-verbrückter Strukturen.

Jedoch bisher in der Biologie nur bei der CuZn-SOD gefunden:



Rolle des Zn ?

- Entfernung nur bedingte Verringerung der Aktivität, jedoch
 - Erniedrigung der thermischen Stabilität
 - ZnSOD und apoSOD inaktiv
- Strukturelle Funktion

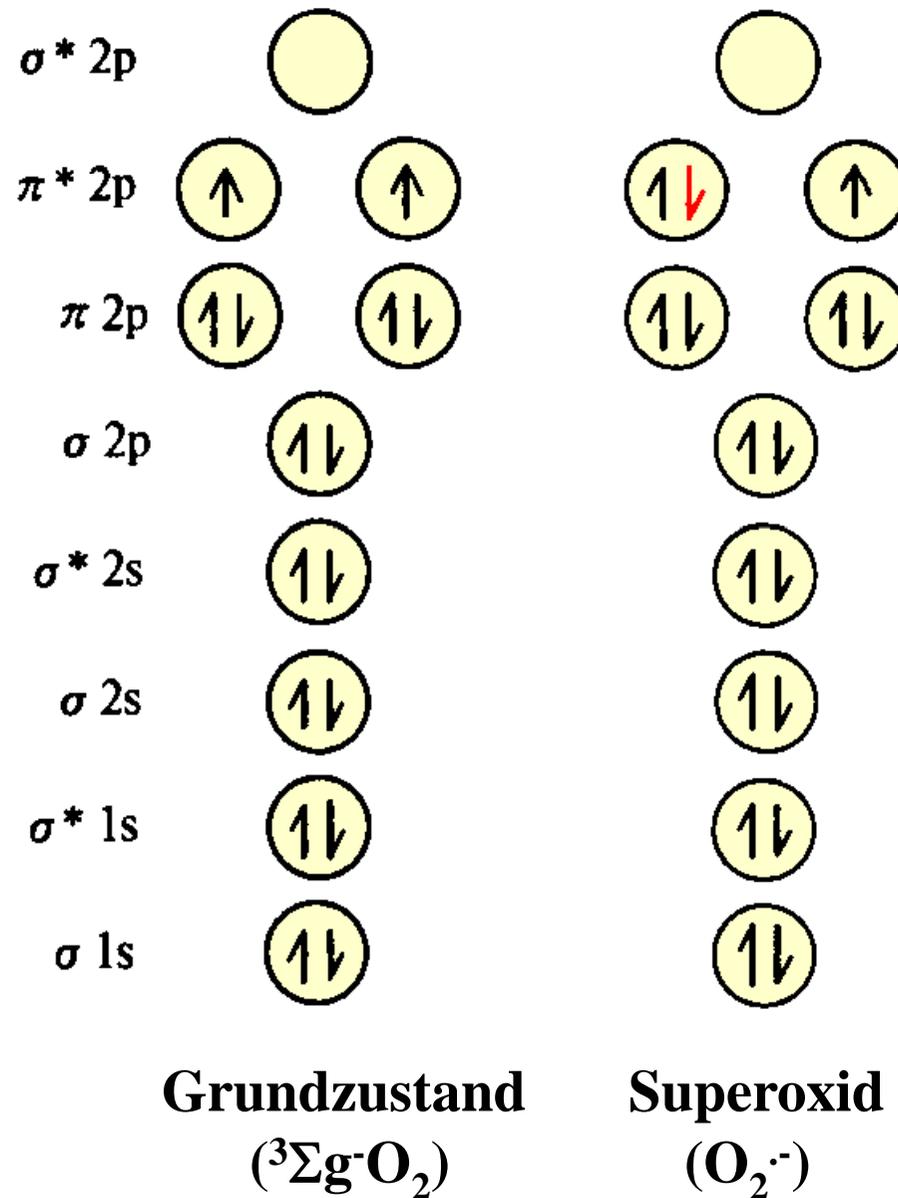


- a) Reduktion bei pH 6 und Dialyse gegen Cyanid
(Bildung von stabilem $[\text{Cu}(\text{CN})_2^-]$)
- b) Dialyse gegen EDTA bei pH 3,8
- c) Dialyse bei pH 3,8

Chemie der Superoxid-Radikale



Elektron besetzt antibindendes Orbital $\pi^* 2p \rightarrow$
Schwächung der O-O-Bindung
(Bindungsordnung von 2 auf 1,5 reduziert)



Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) reagiert in wässrigen Lösungen sehr langsam mit nicht-radikalischen (=diamagnetischen) Stoffen (Spinverbot!). Der pH-Wert bzw. der Protonierungsgrad beeinflusst wesentlich die Reaktivität:

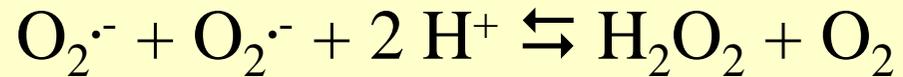


d.h. $[\text{O}_2^{\cdot-}]/[\text{HO}_2^{\cdot}]$ ist 100/1 (bei pH 6,8) und 1000/1 (bei pH 7,8)

HO_2^{\cdot} (Hydroperoxyl-Radikal; $E^{\circ\prime} = -0,46 \text{ V}$) ist ein stärkeres Reduktionsmittel als $\text{O}_2^{\cdot-}$ ($E^{\circ\prime} = -0,33 \text{ V}$). Außerdem kann HO_2^{\cdot} Membranen besser queren, da es ungeladen ist.

Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) reagiert schnell mit Metallzentren in Enzymen/Proteinen, Radikalen wie NO und Aminosäure- (z.B. Phenoxyl) Radikalen, die im Zuge von Enzymreaktionen entstehen. Es muss rasch und effizient eliminiert werden: **SODs**.

Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) dismutiert in wässrigen Lösungen relativ rasch:



1. Teilreaktion: $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HO}_2^{\cdot}$ ($\text{p}K_a = 4,8$)

2. Teilreaktion: $\text{HO}_2^{\cdot} + \text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$

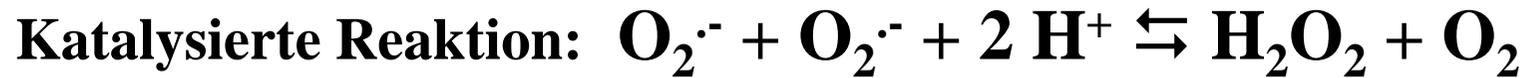
$k = 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (bei pH 11)

$k = 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (bei pH 7), d.h. Protonierung entscheidend.

Superoxidismutasen beschleunigen diese Dismutationsreaktion um ein Vielfaches. Es gibt Cu-, Mn-, Fe- und Ni-hältige SODs.

Mensch: **CuZn-SOD** und **Mn-SOD**.

Superoxid-Dismutasen (Superoxid:Superoxid-Oxidoreductase)

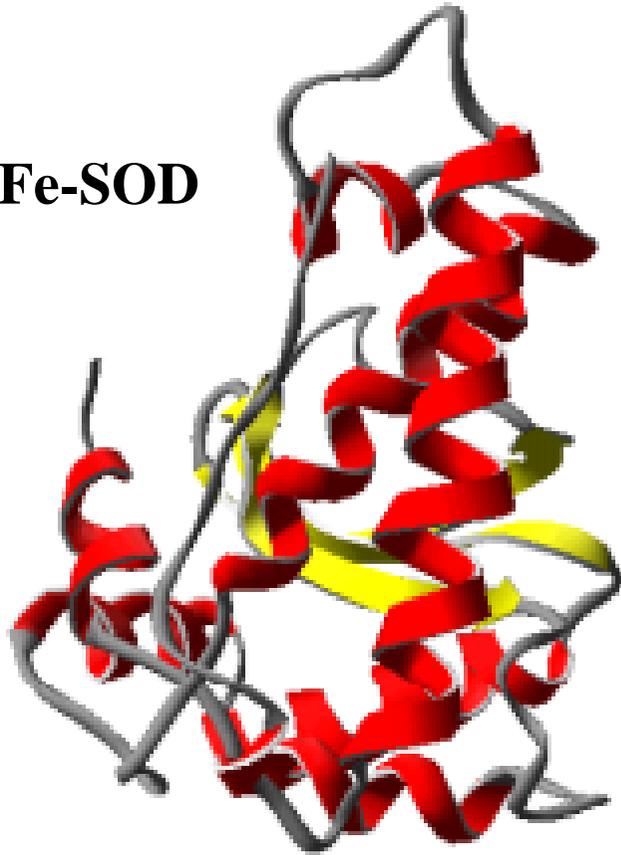


	CuZnSOD	MnSOD	FeSOD
MW	32 kDa	42 oder 85 kDa	42 oder 85 kDa
Subunits	α_2 (16 kDa)	α_2, α_4 (21 kDa)	α_2, α_4 (21 kDa)
Metall	1 Cu, 1 Zn	1 Mn	1 Fe
λ_{max}	258, 680 nm	280, 470 nm	280, 350 nm
Sp. Akt.	3800 U/mg	3000 U/mg	3000 U/mg
$k(\text{O}_2^{\cdot-})$	$2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$K_M(\text{O}_2^{\cdot-})$	0,35 mM	0,2 mM	0,08 mM
$k_{\text{cat}}(\text{O}_2^{\cdot-})$	$\sim 10^6 \text{ s}^{-1}$	$\sim 10^6 \text{ s}^{-1}$	$\sim 10^6 \text{ s}^{-1}$
Inhibit.	CN^- , N_3^- , Hal $^-$,	N_3^-	F^- , N_3^-
Inaktivie.	H_2O_2		H_2O_2

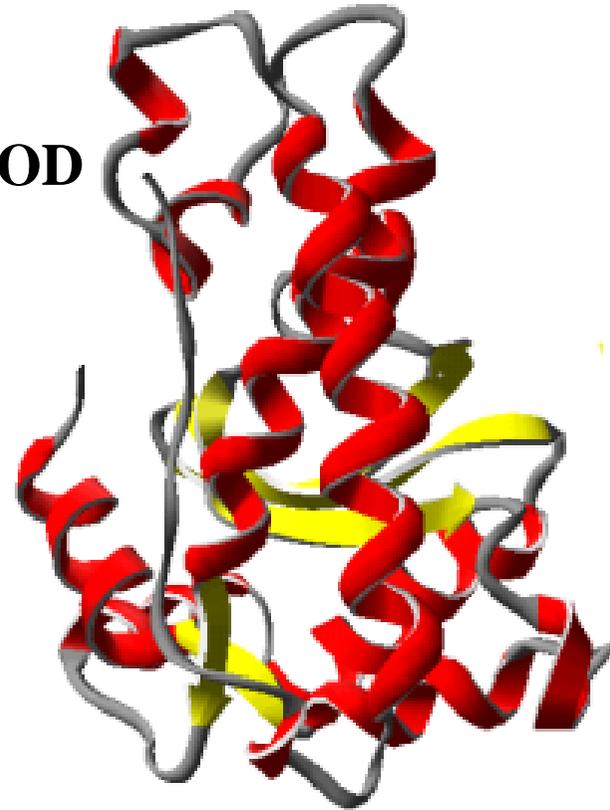
Zusätzlich: **NiSOD** in Bakterien

Superoxid-Dismutasen

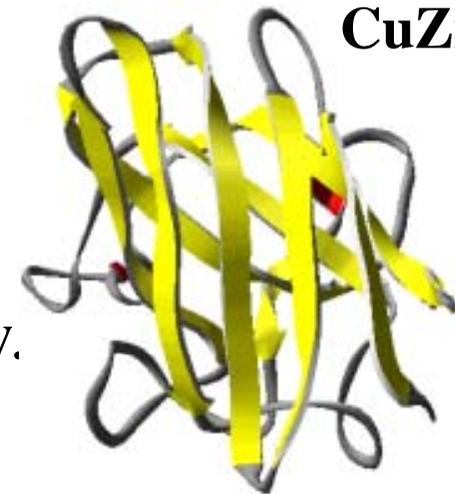
Fe-SOD



Mn-SOD



CuZn-SOD



Hohe **Homologie** von MnSOD und FeSOD:
gemeinsames Vorläufergen wahrscheinlich.

CuZnSOD besitzt keine Homologie zu Mn- bzw.
FeSOD (eigene Entwicklung).

CuZnSOD

Schistosoma ma.	-----MKAVCVMTGTAGV-KGVVKFTQETDNGPV
Homo sapiens	-----MATKAVCVLKGDPV-QGIINFEQKESNGPV
Papaya	-----MVKAVAVLSSSEGV-SGTIFFTQAAD-GPT
Escherichia coli	MKRFSLAILALVVATGAQAASEKVMNLVTSQGVGQSIGSVTITETDKGL
Salmonella ty.	MKRLSLAMVTLACAGAQAASEKVMNLVTAQGVGQSIGTVVIDETEGGL

* . : * .. .

H,H,H

Cu-Liganden

H

Cu,Zn-Ligand

Schistosoma ma.	HVHAEFSGLKAGKHGFHVHEFG----DTTNG----CTSAGAHFNP-TKQE
Homo sapiens	KVWGSIKGLTEGLHGFHVHEFG----DNTAG----CTSAGPHFNP-LSRK
Papaya	TVTGEISGLKPGHHGFHVHALG----DTTNG----CMSTGPHFNP-AGKE
Escherichia coli	EFSPDLKALPPGEHGFHIHAKGSCQPATKDGKASAAESAGGHLDQPNTGK
Salmonella ty.	KFTPHLKALPPGEHGFHIHANGSCQPAIKDGKAVAAEAAGGHLDQPNTGK

. :..* * ****:* * . * . ::* *::* :

H,H,D

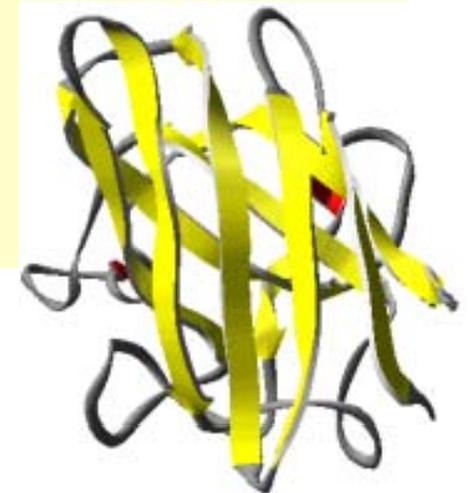
Zn-Liganden

Schistosoma ma.	HGAPEDSIRHVGDLGNVAGADGNAVYNATDKLISLNGSHSIIGRSMVIH
Homo sapiens	HGGPKDEERHVGDLGNVTADKDGADVSIEDSVISLSGDHCIIGRTLVVH
Papaya	HGAPEDDIRHAGDLGNVNVGDDGKVSFSIIDSQIPLTGPNIVGRAVVVH
Escherichia coli	HEGPEGAG-HLGDLPALVVNNDGKATDAVIAPRLKSLD--EIKDKALMVH
Salmonella ty.	HEGPEGQG-HLGDLPVLVNNDGIASEPVTAPRLKSLD--EVKDKALMIH

* .*:.. * *** : .. ** . : . : .:~::~*

Schistosoma ma.	ENEDDLGRGGHELKVTGNAGGRLACGVVGLAAE
Homo sapiens	EKADDLGKGGNEESTKTGNAGSRLACGVIGIAQ-
Papaya	ADPDDLKGGHELKTTGNAGGRVACGVIGLQG-
Escherichia coli	VGGDNMS----DQPKPLGGGGERYACGVIK----
Salmonella ty.	VGGDNMS----DQPKPLGGGGMRYACGVIK----

*::: : .. *..* * ****:



Konservierung der Aminosäuren

Säuger-Säuger **80%**

Säuger-Hefe **50%**

Säuger-Bakterien **30%**

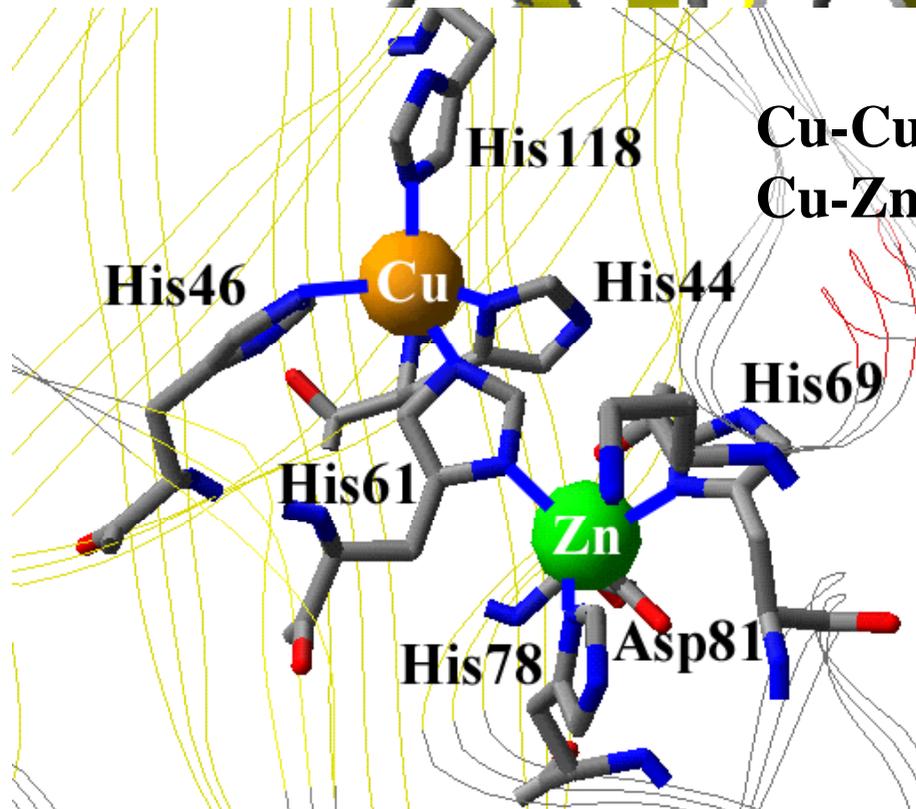
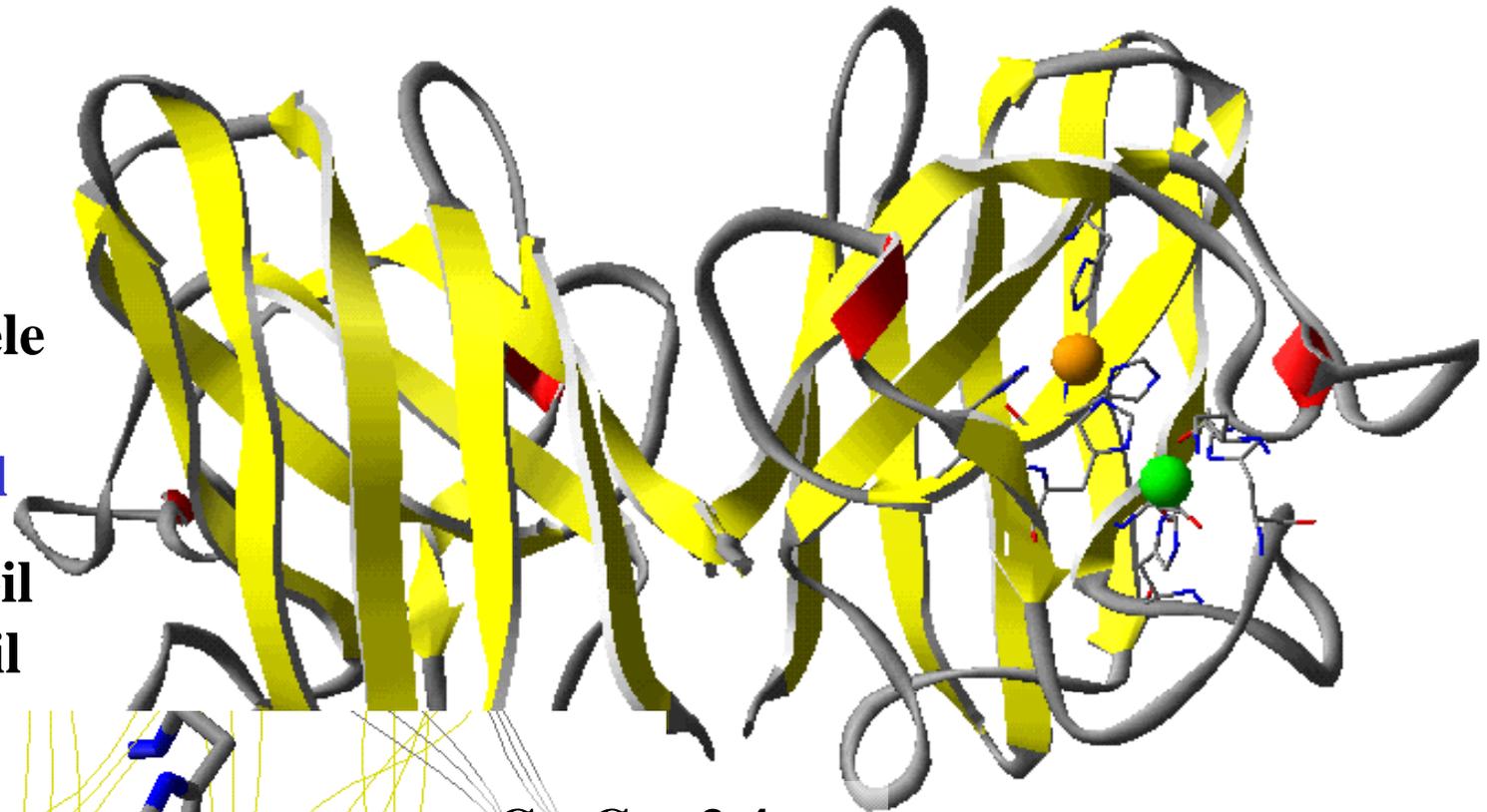
CuZnSOD kommt im Cytosol aller eukaryotischen Zellen (Tiere, Pflanzen, Pilze) vor. Außerdem in manchen pflanzlichen Chloroplasten. Möglicherweise in Lysosomen, Nucleus, mitochondrialem Intermembranraum, Peroxisomen mancher tierischer Zellen. Auch Bakterien können CuZnSOD exprimieren (z.B. *Photobacterium leiognathi*, *Salmonella typhimurium*, *Haemophilus*-Species, *Legionella pneumophila*; Periplasma von *E. coli* und *Caulobacter crescentus*).

Jede menschliche Zelle enthält im Cytosol **CuZnSOD**. Eine hohe Konzentration findet man auch in den Erythrocyten (permanente Freisetzung von Superoxid aus Oxyhämoglobin unter Bildung von Methämoglobin). Der Mensch hat auch mitochondriale **MnSOD**.

CuZnSOD

8 antiparallele
 β -Sheets
 \Rightarrow β -Barrel

50% β -Anteil
5% α -Anteil



Cu-Cu: 3,4 nm
Cu-Zn: 0,6 nm

Aktives Zentrum der
CuZnSOD aus Rind

Cu-Koordination: verzerrt,
zw. tetraedr./quadrat. planar

Zn-Koordination: fast
tetraedrisch

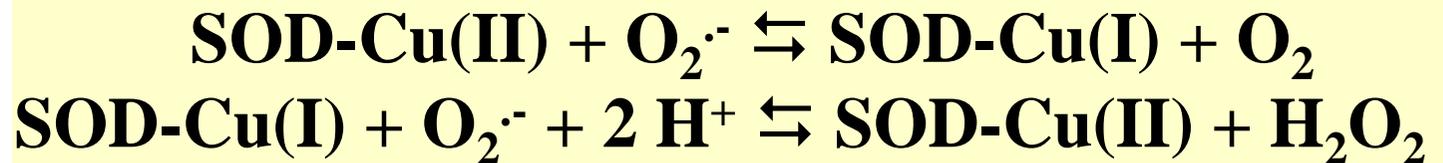
Mechanismus der CuZnSOD

Cu ist das Redox-aktive Metallion.

Zn nimmt nicht an der Reaktion teil, hat strukturelle Funktion

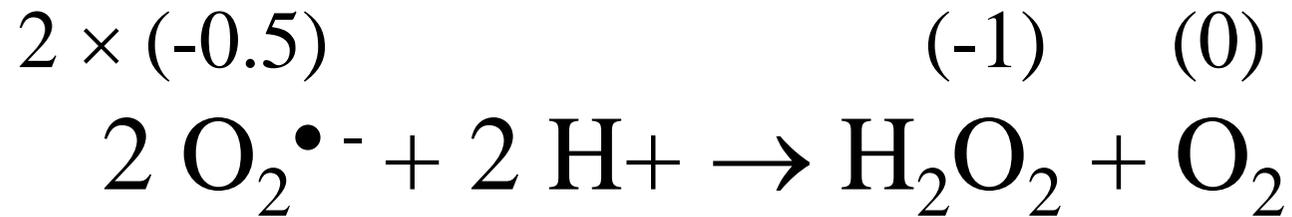
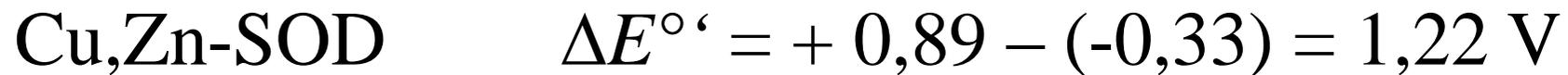
Geschwindigkeitskonstante $k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{cat}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$,
d.h. es ist eine **Diffusions-kontrollierte Reaktion**

1. Schritt: Oxidation von $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu O_2
2. Schritt: Reduktion von $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2



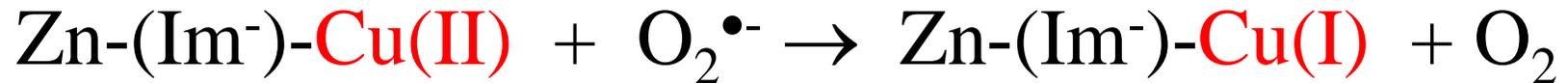
Katalytische Funktion:

Dismutation von $\text{O}_2^{\bullet -}$, d.h. Oxidation von $\text{O}_2^{\bullet -}$ und Reduktion von $\text{O}_2^{\bullet -}$!!!

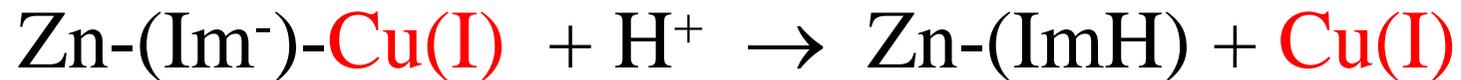


Mögliche Reaktionsschritte:

1. Oxidation von $\text{O}_2^{\bullet-}$ zu O_2 unter Bildung von Cu(I)



2. Protonierung des verbrückenden Imidazolatrestes unter Bildung eines normalen relaxierten Zink-Imidazolkomplexes



3. Cu(I) (koordinativ ungesättigt) wird durch H-Brückenkoordiniertes $\text{O}_2^{\bullet-}$ oxidiert unter Bildung eines basischen (Hydro-)Peroxids.

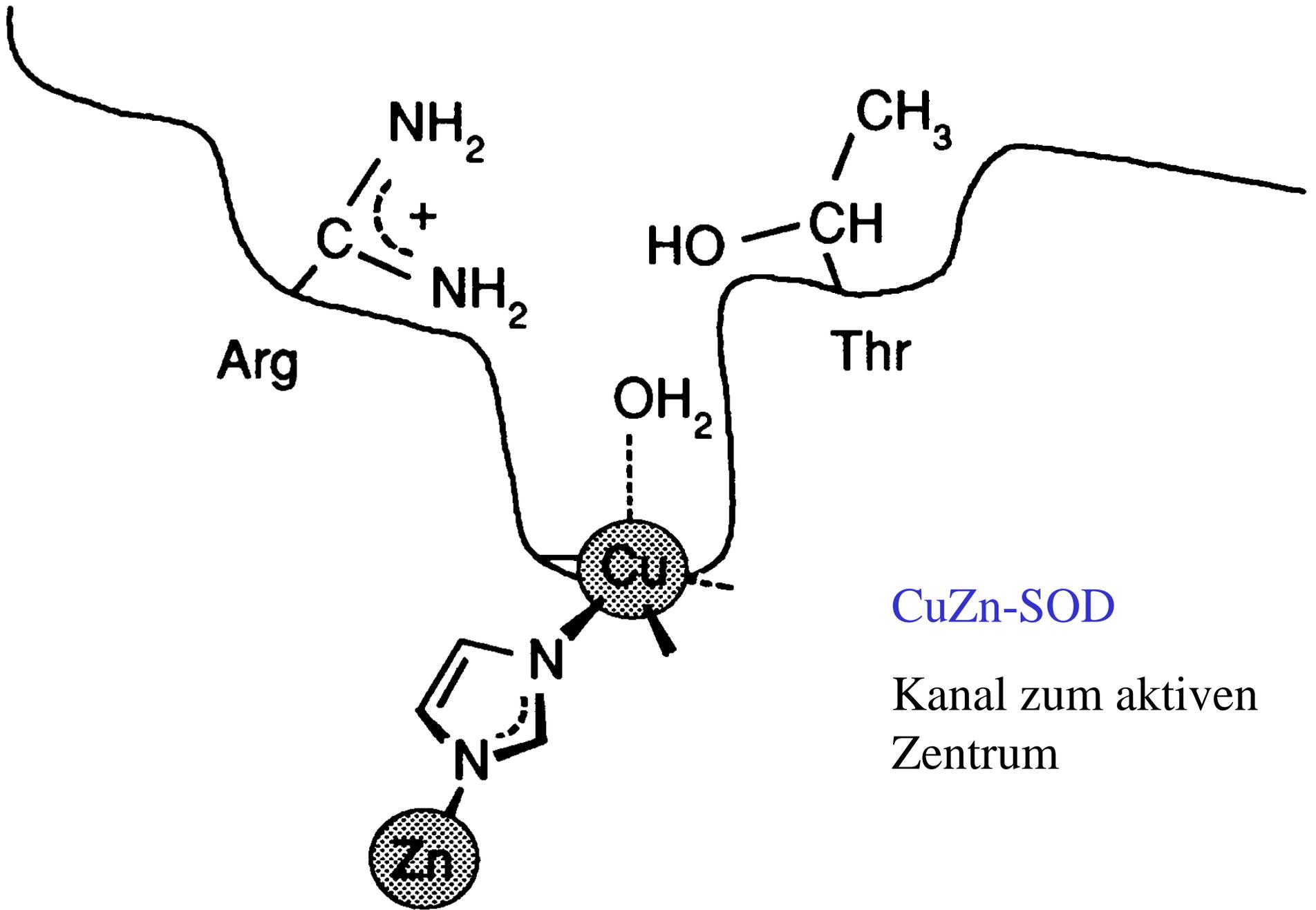


4. Protonierung des basischen (Hydro-)Peroxids



Nahezu diffusionskontrollierte Dismutation von $\text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow$ Jede Begegnung zwischen den Reaktanden führt zur Reaktion \rightarrow ca. $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} !!$

Ursache (u.a.): Optimaler Bau des Substratkanals



CuZn-SOD

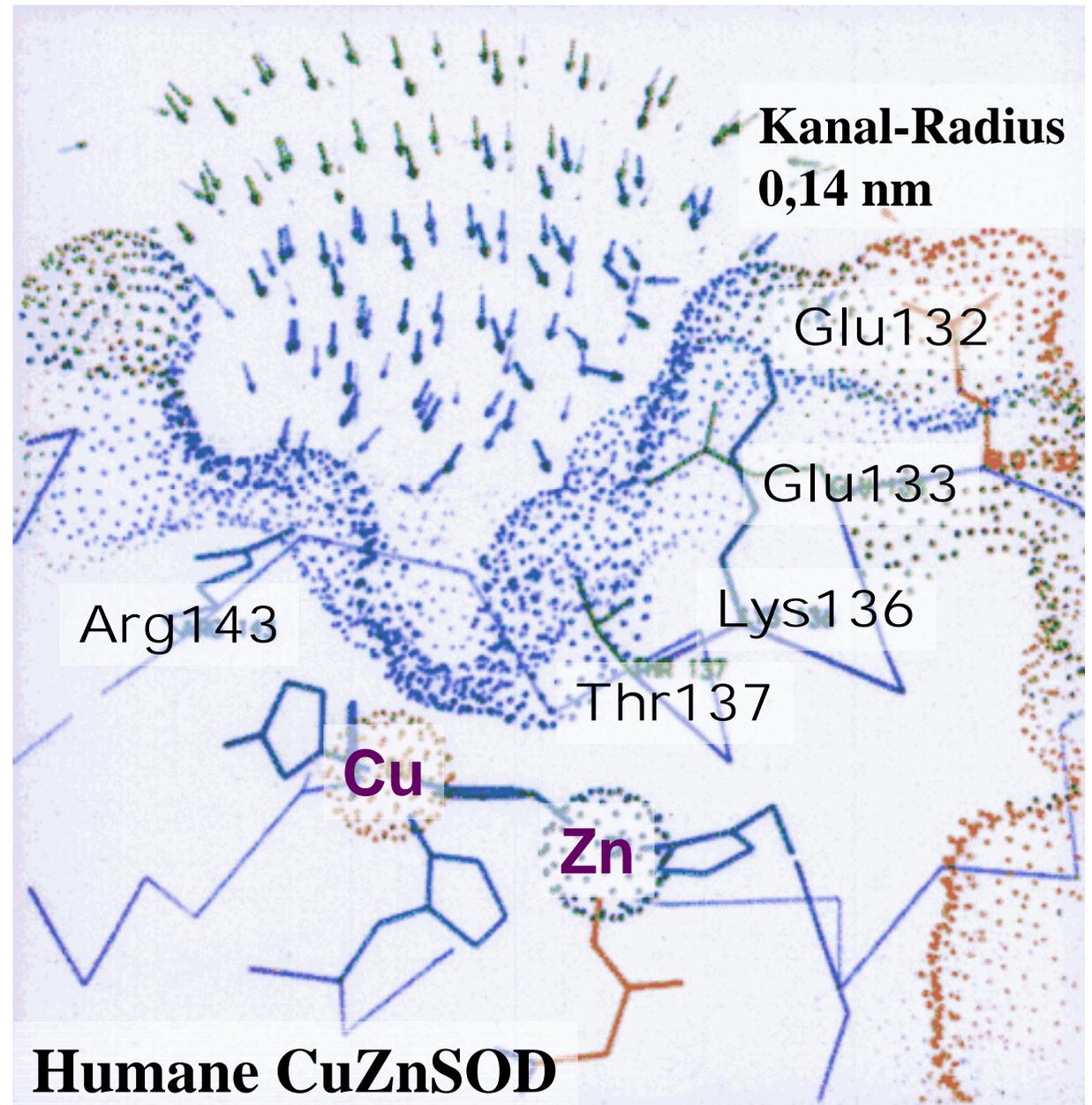
Kanal zum aktiven
Zentrum

CuZnSOD (Kanal zum aktiven Zentrum)

Oberfläche großteils negativ geladen bis auf den Pfad zum aktiven Zentrum \rightarrow $O_2^{\cdot-}$ wird ins aktive Zentrum 'geführt' durch konservierte basische Aminosäuren, vor allem Arg143

Pfeile zeigen die Richtung der elektrostatischen Kraft auf die negative Ladung von $O_2^{\cdot-}$ an.

Blaue Punkte: positive Ladungen
Rote Punkte: negative Ladungen



Amin-Oxidasen

Substrate: Primäre Amine, sekundäre Amine und Polyamine
(z.B. Benzylamin, Methylamin, Histamin,
Dopamin usw.)

Enzymatische Aktivität wird im Blutplasma,
Niere, Fettgewebe, Plazenta usw. gemessen.

Enzyme sind intra- und extrazellulär lokalisiert
(entsprechend Funktion)



Amin-Oxidasen

Intrazellulär: **Oxidation von Polyaminen** (wichtige Moleküle bei DNA-Replikation und Verpackung von DNA).

Polyamine sind zelluläre Kationen, die für Wachstum und Differenzierung unentbehrlich sind. Beispiele:

Spermidin, $[\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3]^{3+}$, und **Spermin**, $[(\text{CH}_2)_4(\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_3)_2]^{4+}$, binden hauptsächlich an die Phosphate der DNA. Polyamin-getriebene DNA-Kondensation ist nicht spezifisch und rein elektrostatischer Natur. Durch das Binden bleibt die native Struktur der B-DNA erhalten, auch scheint die DNA-Sequenz keine wichtige Rolle zu spielen.

Funktion der **Amin-Oxidase**: Abbau der Polyamine (z.B. für DNA-Replikation)

Extrazellulär:

Plasma: **Entfernung biogener Amine**
(Hormone!)

Vascular adhesion protein 1 (= Amin-Oxidase) Funktion als **Adhäsionsprotein**
(Bindung von Lymphozyten an Zelloberflächen?)

Funktion(en) in Diskussion.

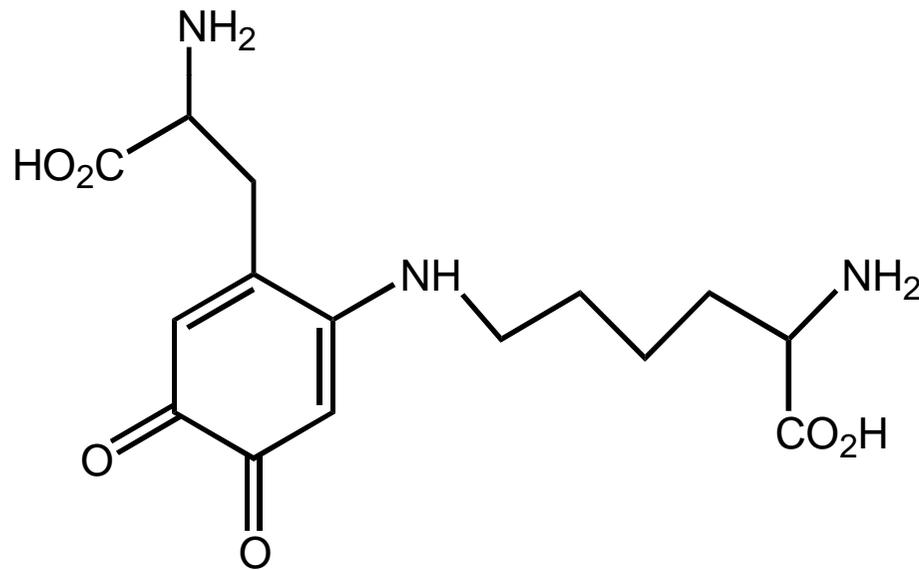
Lysyl-Oxidase:

Funktion bei der Verflechtung von Elastin und Kollagen. Einfluß auf die Elastizität von Knochen, Sehnen, Bändern, Knorpel, Bindegewebe und Gefäßen. Vernetzende Polykondensationsreaktionen zwischen Aminen und Carbonylverbindungen.

Lysyl-Oxidase:

Oxidation von Lysin-Seitenketten in Strukturproteinen wie z.B. **Kollagen** und **Elastin**. Struktur (2009) noch unbekannt.

32 kDa Protein mit einem **Typ-2 Kupferzentrum** und einem redoxaktiven **Cofaktor: LTQ** (lysine tyrosyl quinone)

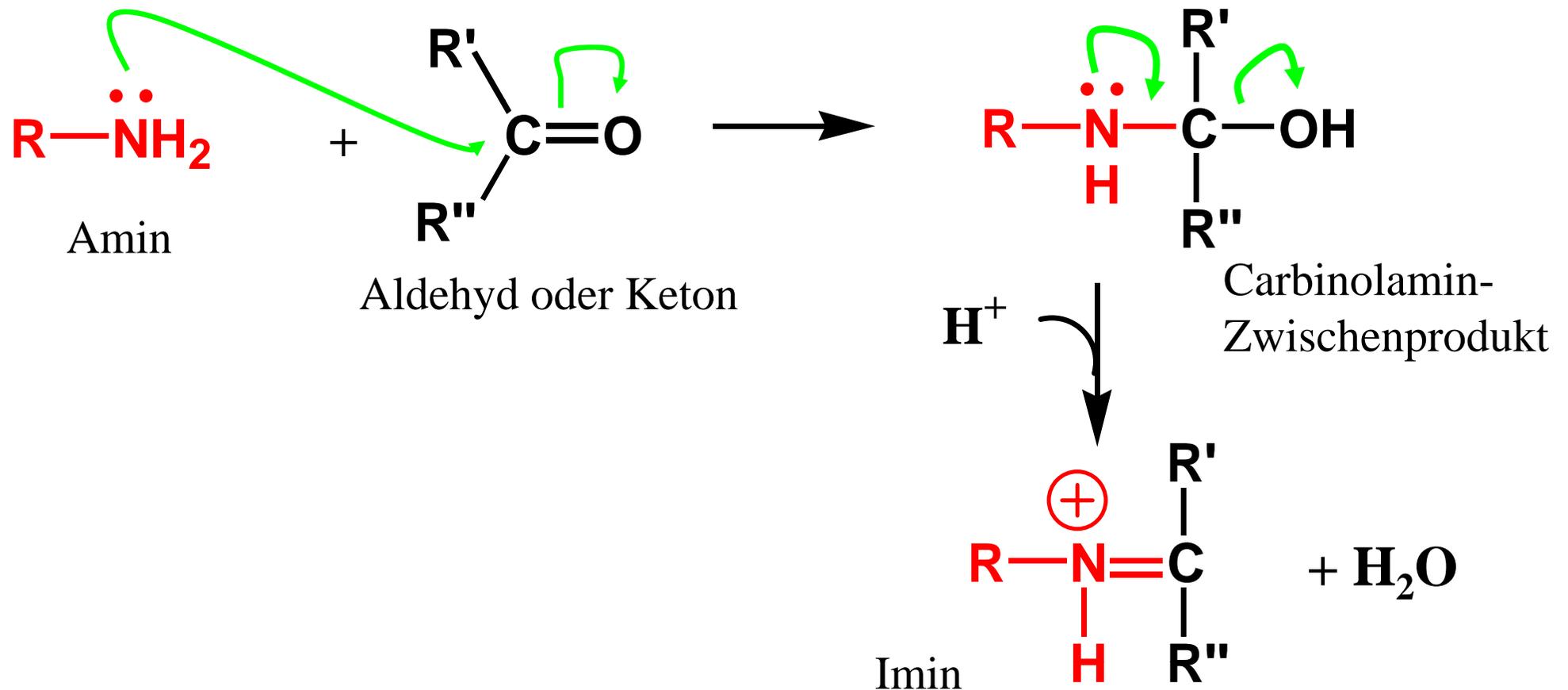


LTQ (post-translationale Bildung aus Lysin und modifiziertem Tyrosin)

Lysyl-Oxidase katalysiert die Bildung von Aldehyden aus Lysinresten von Kollagen- und Elastinvorstufen:

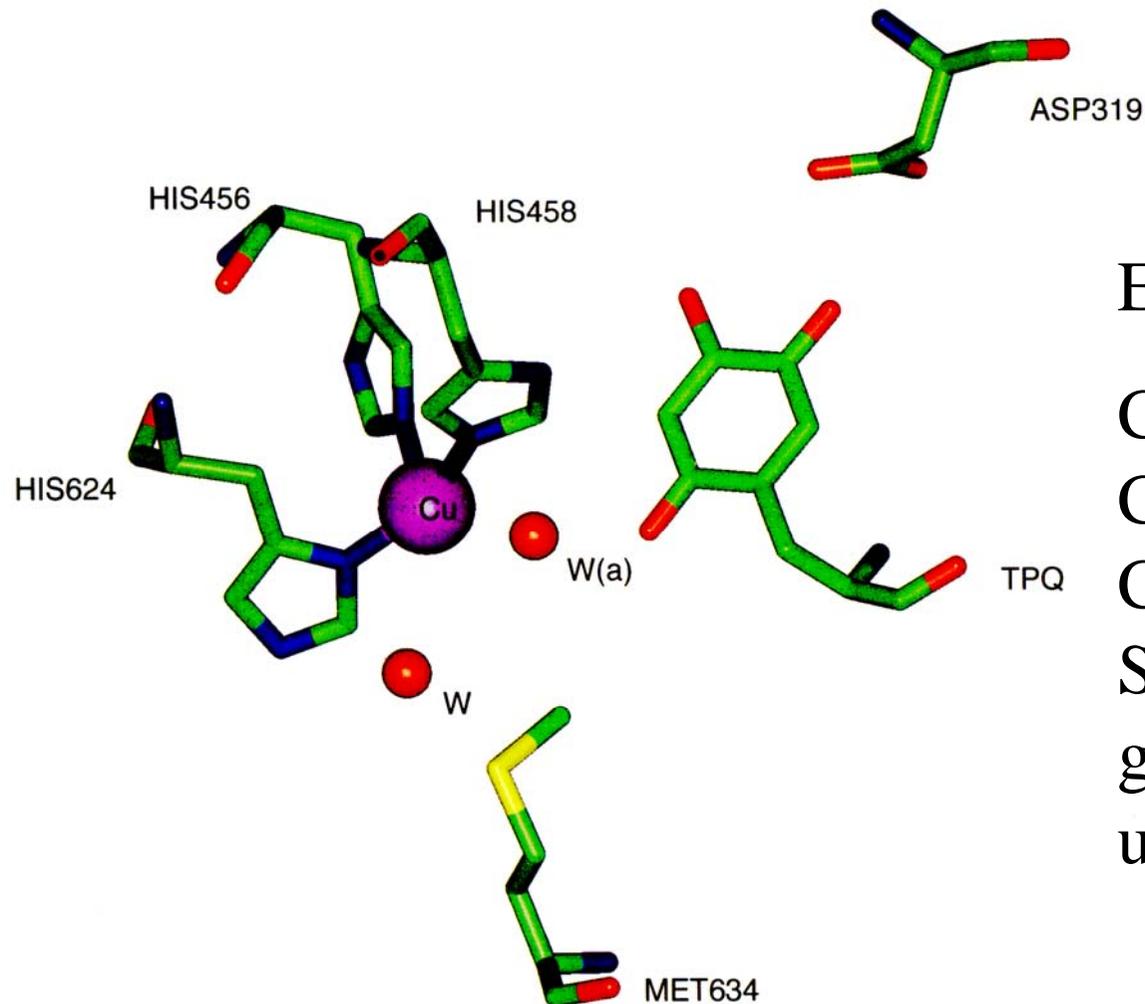


Die gebildeten Aldehyde sind sehr reaktiv und reagieren spontan mit anderen Aldehyden oder Lysinen. Resultat: Quervernetzung von Kollagen und Elastin zwecks Stabilisierung der Kollagenfasern und Aufrechterhaltung der Integrität und Elastizität von Elastin.



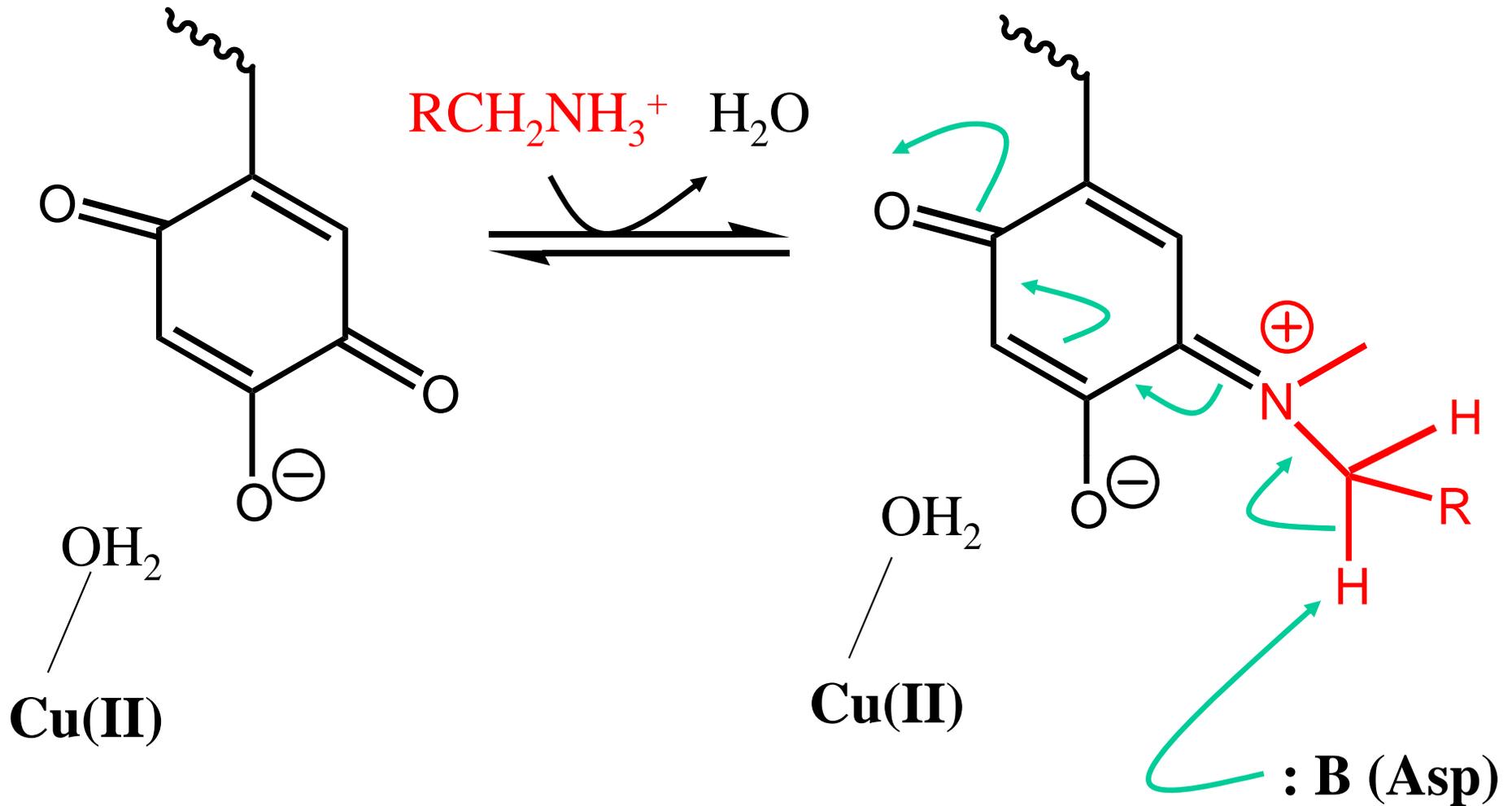
Kupferhaltige **Amin-Oxidasen** enthalten immer zwei Redoxzentren:
Typ 2 – Kupferzentrum plus organischer Redox-Cofaktor.
Funktion?

Beispiel extrazelluläre **Amin-Oxidase** mit bekannter Struktur und
Cofaktor TPQ (*o,p*-chinoides 6-Hydroxydopachinon)



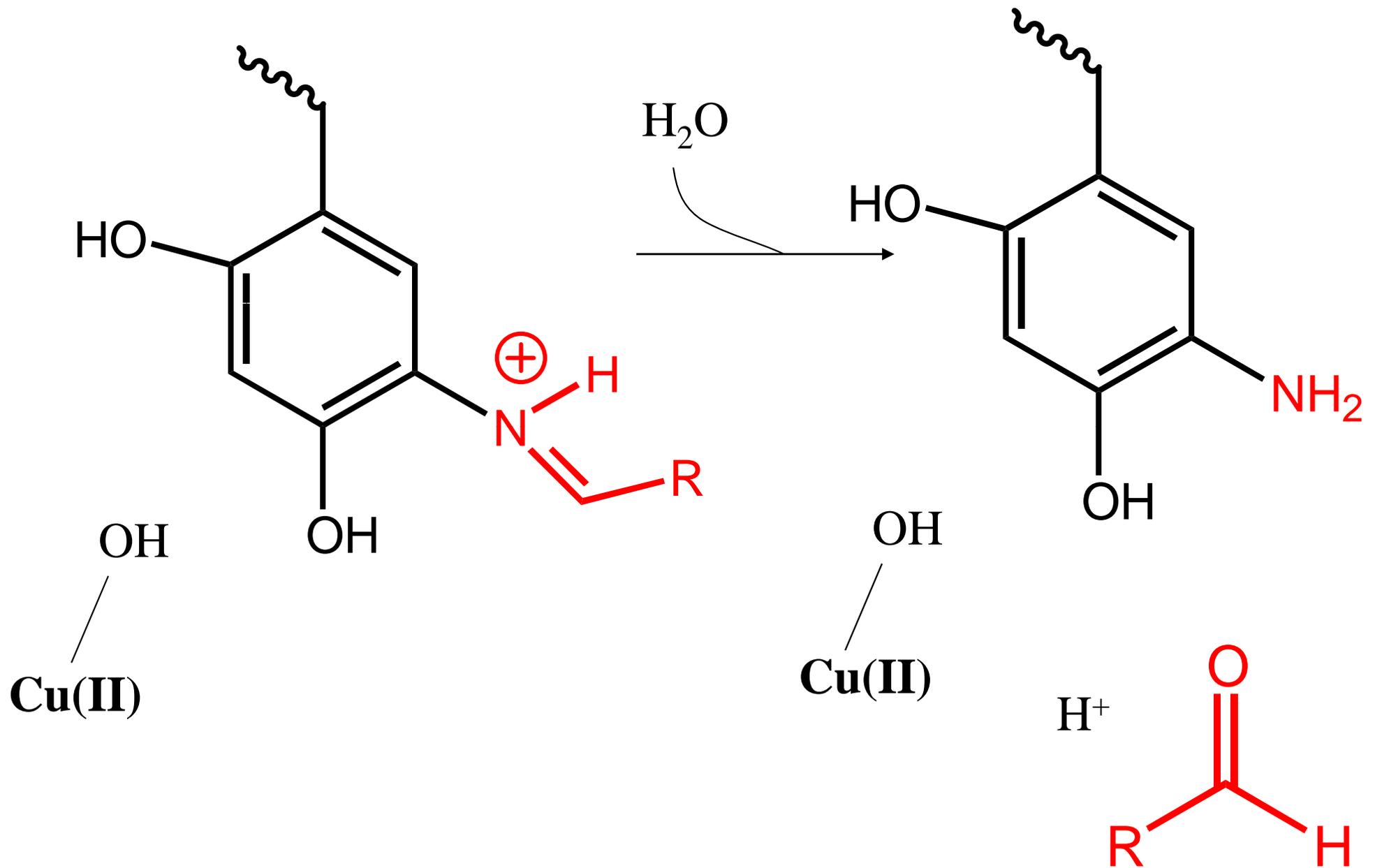
Elektronentransfer?

Cu(II)/Coenzym-
Catechololol →
Cu(I)/Coenzym-
Semichinon; nicht
gesichert (siehe
unten)



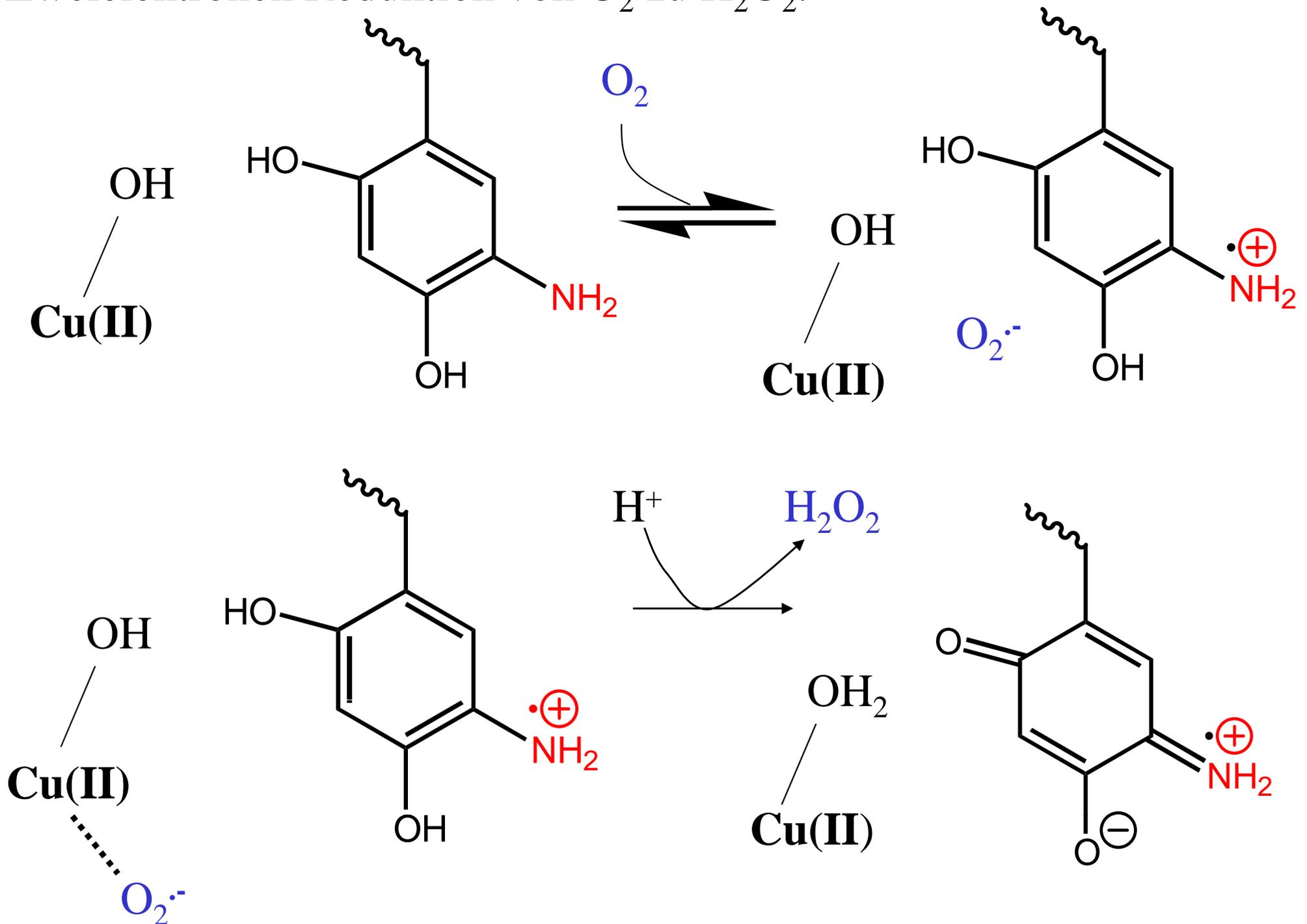
Binden des Amins an den Cofaktor TPQ (Schiff'sche Base).

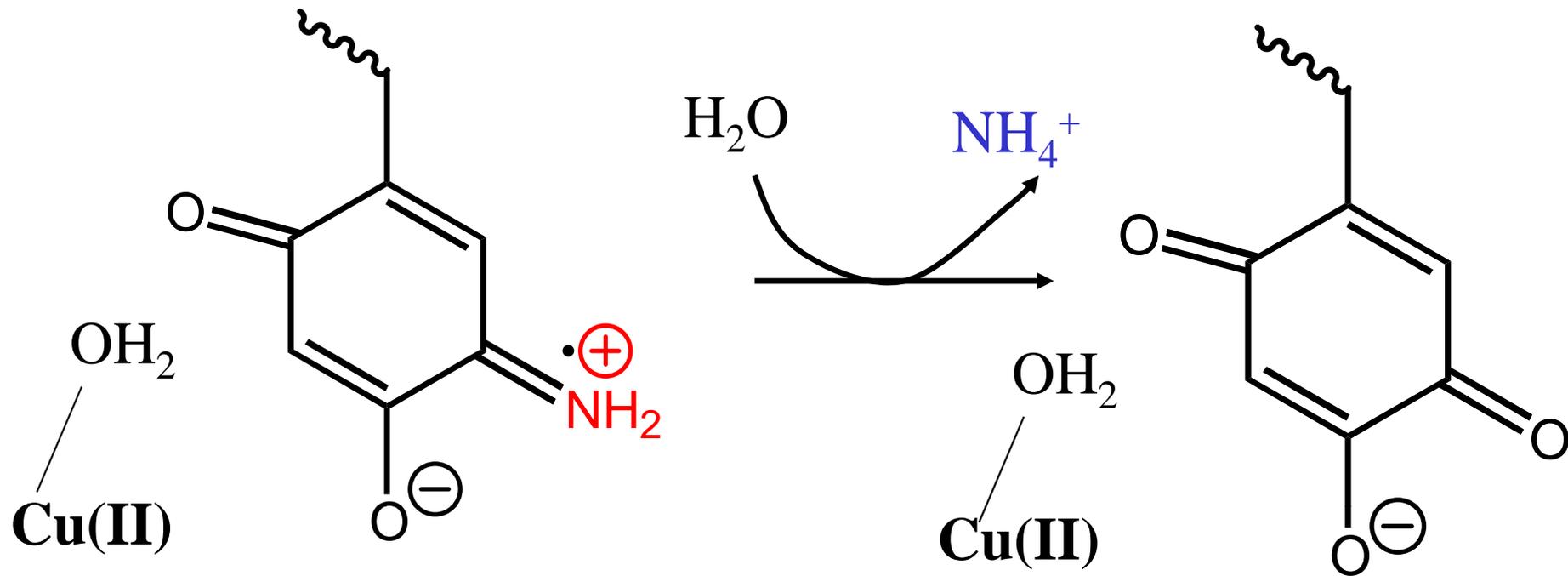
Reduktive Halbreaktion: Die Aminogruppe des primären Amins wird auf den TPQ Cofaktor übertragen. Die entstehende Schiff'sche Base wird anschließend am C_α deprotoniert (Asp).



Das Intermediat wird hydrolysiert und der Aldehyd freigesetzt. Der Cofaktor (nun ein Aminoquinol) bleibt reduziert zurück.

Oxidative Halbreaktion: Oxidation des Aminoquinols und Zweielektronen Reduktion von O_2 zu H_2O_2 .





Regeneration des Cofaktors
(chinoide Form)

Bei diesem vorgeschlagenen Mechanismus hat Kupfer also nur die Funktion der Superoxid-Bindung. Nur der organische Cofaktor unterliegt einer Redoxreaktion.