



BEITRAG ZUR BIOCHEMISCHEN GRUNDLAGE DER ALKOHOL-SCHAEDIGUNG

Computer-unterstütztes Molecular Modelling am Enzym Leber-Alkohol-Dehydrogenase

Angeelo Vedani, Jürg Donatsch, Abraham Ambar und Hans Dütler
Laboratorium für Organische Chemie der ETH, Zurich

ZUSAMMENFASSUNG

Das Enzym Leber-Alkohol-Dehydrogenase (LADH) oxidiert neben Alkohol (Aethanol) insbesondere Histidinol zu Histidin und ist damit für die Bereitstellung dieser nicht-essentiellen Aminosäure für die Protein-Synthese und Histamin-Bildung bedeutend. Aethanol kann als kompetitive Spezies diesen Vorgang empfindlich stören (Hemmung der Histidinol-Oxidation, Bildung toxischer Zwischenprodukte). Im Rahmen von "Computer-unterstütztem Molecular Modelling" wird ein postulierter katalytischer Mechanismus der Histidinol-Oxidation durch LADH auf strukturelle und energetische Richtigkeit überprüft. Dieser sieht in der aktiven Stelle ein penta-koordiniertes Zink als "Steuerzentrum" vor, welches durch Veränderung seiner Ligandsphäre (Ligand Sphere Transition) in das Reaktionsgeschehen eingreift. Diese vorgeschlagene Penta-Koordination kann in den bisher untersuchten fünf Zwischenstufen dieses Mechanismus gestützt werden und ist in Uebereinstimmung mit strukturellen Daten anderer Zink-Enzyme.



1. EINLEITUNG

In der Schweiz wird die Zahl der Alkoholsüchtigen auf mindestens 150'000 (2.5% der Bevölkerung) geschätzt¹; die durch Alkohol verursachten Schäden belaufen sich jährlich auf 1.5 Mrd. sFr.². Besonders beunruhigend ist der Jugend-Alkoholismus: In der deutschen Schweiz konsumieren knapp 1% der 12- bis 16-jährigen Jugendlichen täglich Alkohol, im Welschland 2%, im Tessin gar 6.5%³. Als Folge des Alkoholmissbrauchs werden in der Bundesrepublik Deutschland jährlich mehr als 2000 Kinder mit teilweise schwersten Missbildungen geboren⁴. Massive Auswirkungen sind auch im Strassenverkehr zu beobachten: 18% aller tödlich verlaufenden Unfälle waren 1984 in der Schweiz auf Alkoholmissbrauch zurückzuführen. Die Zahl der Unfalltoten auf schweizerischen Strassen ist in den letzten zehn Jahren gesamthaft um 27% zurückgegangen, diejenige der alkoholbedingten jedoch um 16% angestiegen¹. Entsprechend dieser erschreckenden Entwicklung hat sich die Erforschung der schädlichen Wirkung des Alkohols auf den Organismus zu einem wichtigen Anliegen der Sozialmedizin und der öffentlichen Fürsorge entwickelt.

Erst in neuerer Zeit ist man dazu übergegangen, den biochemischen Grundlagen der Alkoholschädigung die nötige Aufmerksamkeit zu schenken. Die bisherigen Arbeiten zeigen, dass das für den Abbau von Alkohol im Organismus hauptsächlich verantwortliche Enzym Leberalkohol-Dehydrogenase (LADH) eine entscheidende Rolle einnimmt. Trotz weltweiter Anstrengungen hat die Forschung auf diesem Gebiet bisher noch kein biochemisches Konzept erkennen lassen, welches die verschiedenen Resultate erklärt. Möglicherweise spielen Effekte eine Rolle, die mit der bis anhin unbekannt gebliebenen physiologischen Funktion des Enzyms in Zusammenhang stehen. Die physiologische Funktion von LADH, die in der menschlichen Leber in grosser Menge vorhanden ist (ca. 1-2 g pro kg Leber), kann nicht der Abbau der nur geringen natürlichen Alkohol-Konzentrationen im Blut (0.15mg/100ml) sein. Es scheint sinnvoll, davon auszugehen, dass ein wesentlicher Teil der schädlichen Wirkung von Alkohol mit der Beeinträchtigung dieser physiologischen Funktion der LADH in Zusammenhang steht.



Im Rahmen unserer Arbeiten sind wir auf zwei neue Funktionen der LADH gestossen, von denen wir glauben, dass sie für die Aufklärung der Alkoholwirkung von fundamentaler Bedeutung sind:

1. Oxidation von Histidinol zu Histidin⁵
2. Oxidative Decarboxilierung von Coproporphyrinogen⁷ zu Protoporphyrinogen⁶

Neben der Erkenntnis der physiologischen Funktion der LADH haben uns diese Arbeiten neue Einsicht in den Mechanismus dieses Enzyms geliefert, welche hauptsächlich die funktionelle Bedeutung des Zinks in der aktiven Stelle betrifft und von uns in Form eines völlig neuen mechanistischen Modells zusammengefasst wurde⁷.

Der vorliegende Bericht ist Teil eines grösseren Projektes, welches die Oxidation von Histidinol zu Histidin im Hinblick auf ein besseres Verständnis der Alkoholwirkung näher untersucht. Dabei soll die durch Alkohol (Aethanol) bedingte Störung der Histidinol-Oxidation (Nebenprodukte, Histidinol-Stauung, Verminderung der Histidin-Produktion) studiert werden. Das vorgeschlagene mechanistische Modell soll mit Hilfe von Computer-unterstütztem Molecular Modelling auf strukturelle und energetische Richtigkeit überprüft werden.

Computer-unterstütztes Molecular Modelling liefert detaillierte Information über Art und Stärke der Bindung eines Substrats (kleines Molekül, hier: Histidinol, Histidinal oder Histidin) an eine biologische Rezeptorstelle (Makromolekül, hier: LADH). Das Substrat wird dabei auf einen räumlichen Fit an die Rezeptorstelle untersucht. Hierzu werden Konformation von Substrat und Rezeptor (computergraphisch und rechnerisch) variiert und optimiert. Die resultierenden Konformationen und die entsprechenden Bindungsenergien sind ein Mass für die Stabilität (und damit Wahrscheinlichkeit) des untersuchten Substrat-Rezeptor-Komplexes.

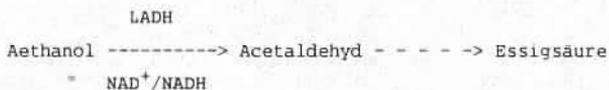
Substrat-Rezeptor-Wechselwirkungen lassen sich anhand struktureller Daten aus dem Cambridge Crystallographic Data File (CCDF)⁸ überprüfen, wo die experimentell ermittelten Kristall-Strukturen von über 40'000 organischen und metallorganischen Verbindungen gespeichert sind. Sogenannte Kraftfeld-Programme variieren mittels verschiedener mathematischer Verfahren die Konformation (räumliche Anordnung) von Substrat und Rezeptor so, dass diese in bestmögliche Übereinstimmung mit allen bekannten strukturellen Daten (CCDF) gelangen.



Das am Laboratorium für Organische Chemie entwickelte Kraftfeld-Programm 'YETI'^{9,10} führt im Rahmen von Computer-unterstütztem Molecular Modelling die vollautomatische Optimierung der Konformation von Substrat und Rezeptor aus. Sämtliche Substrat-Rezeptor-Wechselwirkungen (LADH: ca. 14'000) werden laufend an entsprechenden Daten aus dem CCDF überprüft. 'YETI' berücksichtigt als erstes Programm seiner Art die volle Direktionalität von Wasserstoff-Brücken⁹; es wurde zudem speziell auf die sterischen Erfordernisse von Metallzentren in Metallo-Proteinen zugeschnitten¹⁰.

2. AUSGANGSLAGE

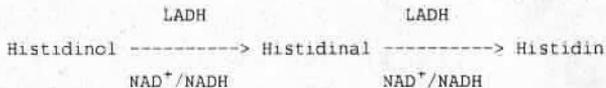
Die Resorption von oral eingenommenem Alkohol (Aethanol) ins Blut findet fast ausschliesslich im oberen Dünndarm statt. Die Hauptmenge Alkohol wird in der Leber abgebaut, lediglich 2-10% der aus dem Magen-Darm-Trakt aufgenommenen Menge wird ohne weitere chemische Umwandlung über Nieren oder Lungen ausgeschieden¹¹. Bei Inkubation von Leberzellen mit Aethanol (65mM) und anschliessender Zugabe des LADH-Hemmers Pyrazol (18mM) konnte die Aethanol-Oxidation zu 96% inhibiert werden¹², was zeigt, dass hauptsächlich LADH für den oxidativen Abbau von Aethanol in der Leber verantwortlich ist. Der dabei entstehende Acetaldehyd wird durch Aldehyd-Dehydrogenasen weiter zu Essigsäure oxidiert:



Das Zwischenprodukt Acetaldehyd ist für eine Reihe toxischer Wirkungen verantwortlich. Acetaldehyd stimuliert u.a. die Ausschüttung von Catecholaminen, was zur Aenderung des Blutdrucks, zur Mobilisierung von Glukose aus Glykogen und von Fettsäuren aus Depotfett führen kann. Ferner bewirkt Acetaldehyd Chromosomenschäden und hemmt die Phosphorylierung von Vitamin B₆ zum Coenzym Pyridoxalphosphat¹³. Da die Acetaldehyd-Konzentration im Blut konstant und im kritischen Bereich unabhängig von der Aethanol-Konzentration ist¹³, kann die gefundene Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit von Alkohol und die Art der Schädigung nur schwer an Hand einer Acetaldehyd-Reaktion allein erklärt werden. Viel wahrscheinlicher ist eine direkt von Aethanol ausgehende Wirkung, z.B. in Form der Hemmung einer physiologisch wichtigen Funktion.



Histidinol wird mit reiner LADH unter Verbrauch von 2 Mol NAD^+ zu Histidin oxidiert. Die optimalen Bedingungen für diese Reaktion wurden bei Histidinol-Konzentrationen $< 0.1\text{mM}$ gefunden. Histidinal tritt dabei als Zwischenprodukt auf:

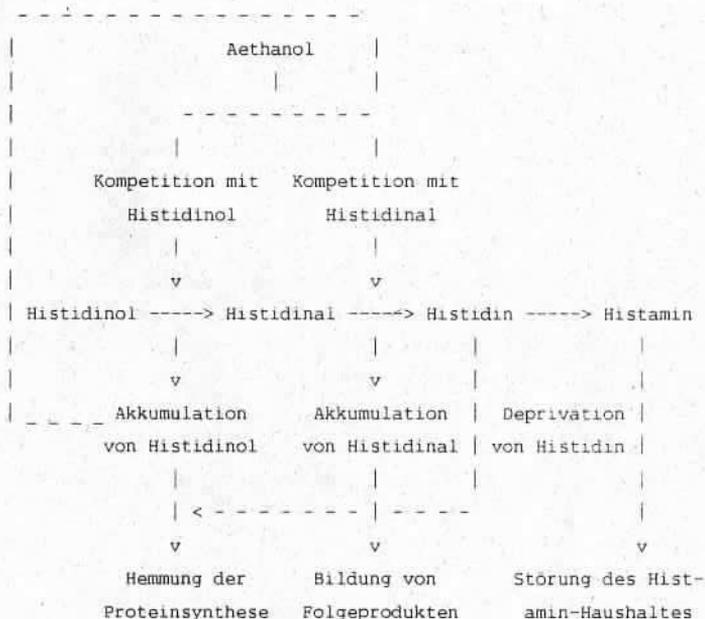


Vorversuche deuten darauf hin, dass Aethanol die Histidinol-Oxidation zu hemmen vermag (kompetitive Hemmung). Die Wechselwirkung zwischen Histidinol und Aethanol äusserte sich darin, dass die Oxidationsgeschwindigkeit eines Aethanol/Histidinol-Gemisches signifikant geringer war als die Summe der Oxidationsgeschwindigkeiten der einzelnen Substrate.

Ueber andere Enzyme, welche die Oxidation von Histidinol zu Histidin katalysieren, ist sehr wenig bekannt. Histidinol-Dehydrogenase wurde von Adams bereits 1954 aus *E.coli* und Hefe isoliert¹⁴. Inzwischen wurde dieses Enzym aus weiteren Mikroorganismen wie *Neurospora crassa*¹⁵ und *Salmonella Typhimurium*¹⁴ erhalten. Histidinol-Dehydrogenase aus *Salmonella Typhimurium* ist, ähnlich wie LADH, ein dimeres Enzym mit zwei gleichen Untereinheiten von ca. 42 ± 2 kDal Molekulargewicht. In höheren Organismen war lange nichts über das Vorhandensein von Histidinol-Dehydrogenasen bekannt. Erst kürzlich gelang der Nachweis, dass Histidin für den menschlichen Organismus eine nichtessentielle Aminosäure darstellt und damit, dass eine Histidinol-Dehydrogenase vorhanden sein muss¹⁶.

Alle bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese letzte Stufe der Histidin-Biosynthese von der LADH ausgeführt wird. So weist z.B. der menschliche Organismus in den frühen Wachstumsphasen einen höheren Histidin-Bedarf auf; während dieser Zeit sind Alkoholschäden weit gefährlicher als bei Erwachsenen.

Die komplexen Vorgänge des Histidinal-gekoppelten Teils der Aethanol-Schädigung sind in Schema 1 zusammengefasst:



Aethanol, das nach Alkoholgenuss in 10^3 - bis 10^4 -mal höherer Konzentration als Histidinol im Organismus vorhanden ist, kann sowohl die Oxidation von Histidinol zu Histidinal (1. Stufe) als auch von Histidinal zu Histidin (2. Stufe) beeinflussen. Die Beeinflussung der ersten Stufe beruht auf einer kompetitiven Hemmung und führt zur Akkumulation von Histidinol. Erreicht die Histidinol-Konzentration den physiologisch toxischen Wert von ca. 100 mM^{17} , wird einerseits die Proteinsynthese inhibiert (Hemmung der HistidinyI-tRNA-Synthetase) und andererseits Histidinal aus dem Enzym-Komplex verdrängt. Dieser Verdrängungsvorgang hat zwei Konsequenzen: 1. Verminderung der Histidin-Bildung, wodurch die Proteinsynthese eine zusätzliche Hemmung erfährt und die von Histidin ausgehende Histamin-Bildung unterdrückt wird. 2. Freisetzung von Histidinal und damit Bildung von Histidinal-Folgeprodukten, die als Schadstoffe oder psychotrope Substanzen wirken. Die Beeinflussung der zweiten Stufe durch Aethanol beruht auf einer Verdrängung des Histidinals aus dem Enzymkomplex analog dem Verdrängungsvorgang durch Histidinol und weist entsprechend dieselben beiden Konsequenzen auf.

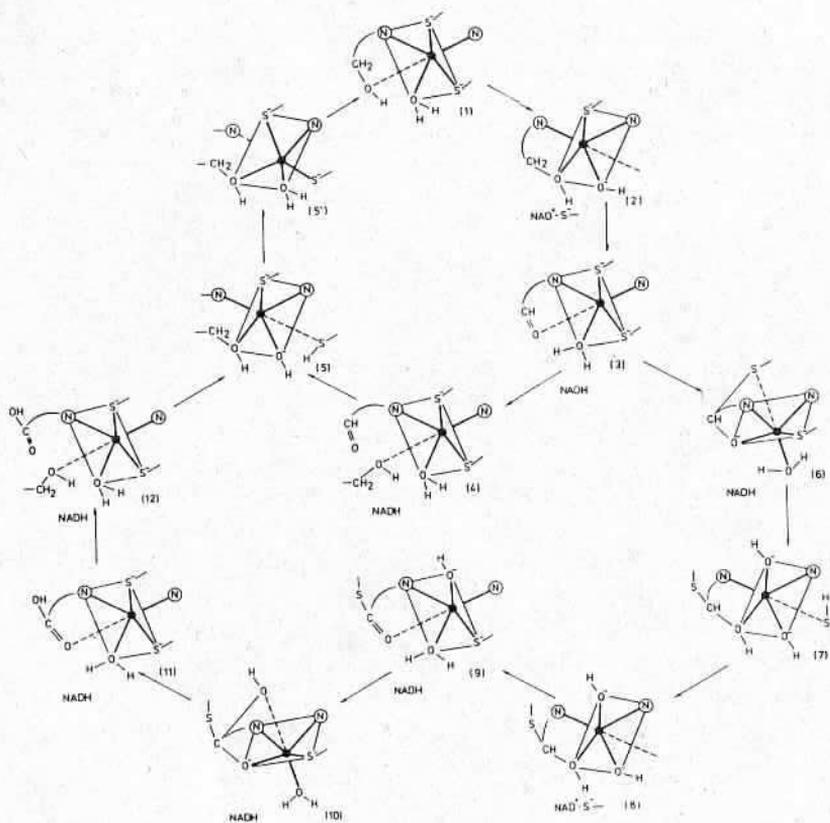


3. KATALYTISCHER MECHANISMUS^{5,7}

Im neuen Konzept wird vorgeschlagen, dass das Zink in der aktiven Stelle der LADH während des katalytischen Prozesses penta-koordiniert ist, wobei fünf proximale Liganden eine quadratische Pyramide oder eine trigonale Bipyramide bilden. Ein weiterer, sechster Ligand, "bindet" distal ans Metall. Für die proximalen Liganden sind (aus Kristallstrukturen des CCDF) Abstände von $Zn \bullet \bullet O = 2.05 \text{ \AA}$, $Zn \bullet \bullet N = 2.10 \text{ \AA}$ und $Zn \bullet \bullet S = 2.45 \text{ \AA}$ zu erwarten. Bei der Histidinol-Oxidation stammen drei der sechs Liganden von Seitenketten des Enzyms (S-Atom von Cys 46, Imidazol-N-Atom von His 67, S-Atom von Cys 174), zwei Liganden vom Substrat (Imidazol-N-Atom, Hydroxyl- oder Carbonyl-O-Atom), dazu kommt noch ein koordiniertes H_2O oder OH^- Molekül. Die fünf proximalen Liganden sind relativ starr, der distale flexibel. Die Wechsel proximal \leftrightarrow distal treten während der katalytischen Reaktion immer paarweise auf; gesamthaft betrachtet wird deshalb jeder Reaktionsschritt von einer Änderung der Lage des Koordinationspolyeders am Zink begleitet. Dieser Vorgang wurde als "Ligand Sphere Transition" bezeichnet. Da drei der Liganden dem Protein angehören, führt die Ligandenänderung zu einer entsprechenden Änderung der Protein-Konformation, womit ein Weg angedeutet ist, wie die Protein-Konformation bzw. deren Änderung reaktionsbestimmend wirken kann.

Die Fähigkeit des Zinks sowohl tetra- als auch penta-koordinierte Komplexe zu bilden ist in der biologischen und strukturellen Chemie gut dokumentiert¹⁸. So spielt diese Multivalenz auch für den katalytischen Mechanismus der Carboanhydrase eine entscheidende Rolle: Hier ist das Enzym im nativen Zustand tetrakordiniert. Drei Histidin-N-Atome und das O-Atom einer Wassermolekel vervollständigen eine tetraedrische Ligandenanordnung am Metallzentrum. Wird nun im katalytischen Prozess CO_2 reversibel in HCO_3^- umgewandelt, wechselt die Koordination am Zink von vier nach fünf (quadratische Pyramide oder trigonale Bipyramide): HCO_3^- einerseits bindet als bidentater Ligand über zwei O-Atome ans Zink; CO_2 und eine H_2O -Molekel andererseits je monodentat über ein O-Atom^{9,10,19}.

Das vorgeschlagene mechanistische Modell⁷ ist (am Beispiel der quadratischen Pyramide) in Schema 2 zusammengefasst:





1. Stufe: Oxidation von Histidinol zu Histidinal

Struktur 1 : Das Substrat Histidinol bindet monodentat mit dem Imidazol-N-Atom ans Zink. Als weitere proximale Liganden treten die S-Atome von Cys 46 und Cys 174, das Imidazol-N-Atom von His 67 sowie das O-Atom einer Wasser-Molekel auf. Das Hydroxyl-O-Atom des Substrats besetzt eine distale Position 0.5 bis 1.0 Å weiter vom Metall entfernt.

Struktur 2 : Das Substrat Histidinol bindet bidentat mit dem Imidazol-N-Atom und dem Hydroxyl-O-Atom ans Zink. Das S-Atom von Cys 46 wird in eine distale Position verdrängt. Anstelle der Wassermolekel tritt ein OH^- Ion als Ligand auf.

Struktur 3 : Nach Übertragung eines H^- -Ions vom Histidinol auf das Coenzym NAD^+ und eines Protons ans OH^- -Ion bindet das nun zur Stufe des Aldehyds (Histidinal) oxidierte Substrat wieder monodentat ans Zink, das Carbonyl-O-Atom besetzt eine distale Position.

Struktur 4 : Bindung eines zweiten Substrat-Moleküls (Histidinol) ans Metall: Das auf der Aldehyd-Stufe aus dem katalytischen Prozess ausscheidende erste Substrat-Molekül (Histidinal) bindet noch mit dem Imidazol-N-Atom ans Zink. Das zweite Substrat-Molekül besetzt mit dem Hydroxyl-O-Atom eine distale Position.

Struktur 5 : Eintretendes und abgehendes Substrat-Molekül binden je monodentat in proximalen Positionen.

Struktur 5' : Ablösung des ausscheidenden Histidinals (Imidazol-N-Atom in distaler Position). Eintretendes Histidinol-Molekül mit Hydroxyl-O-Atom in proximaler Position.



2. Stufe: Oxidation von Histidinal zu Histidin

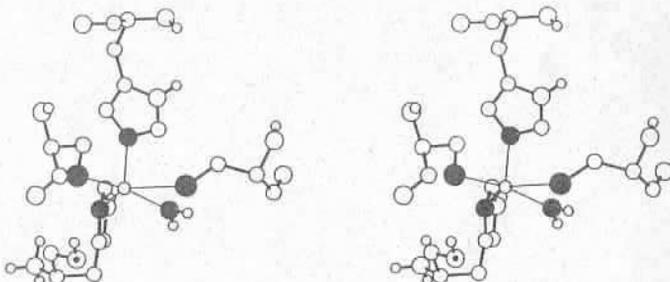
- Struktur 6 : Nukleophiler Angriff des Schwefels von Cys 174 am Carbonyl-C-Atom des Substrats. Dieser Reaktionsschritt verlangt eine grössere Veränderung der Protein-Hauptkette, was jedoch mit strukturellen Daten des freien Enzyms (Erhöhte Mobilität der Hauptkette in diesem Bereich) vereinbar ist.
- Struktur 7 : Bildung eines Thiohemiacetals, welches bidentat bindet. S-Atom von Cys 46 als protonierter distaler Ligand.
- Struktur 8 : Ein neues NAD^+ -Molekül tritt in den Reaktionsablauf ein. S-Atom von Cys 46 als deprotonierter distaler Ligand.
- Struktur 9 : Übertragung eines H^- -Ions vom Thiohemiacetal auf NAD^+ und eines Protons auf das OH^- -Ion. Der entstandene Thioester bindet monodentat. Das S-Atom von Cys 46 bindet wieder in einer proximalen Position.
- Struktur 10: Angriff eines OH^- -Ions am Carbonyl-C-Atom des Thioesters: Hydrolyse des Esters führt zum Histidin.
- Struktur 11: Das Endprodukt Histidin bindet monodentat: Imidazol-N-Atom in proximaler, Carboxyl-O-Atom in distaler Position.
- Struktur 12: Ablösung des Endprodukts Histidin, Bindung eines neuen Substratmoleküls (Histidinol).

4. RESULTATE

Bisher haben wir im Rahmen von Computer unterstütztem Molecular Modelling die Strukturen 1,2,3,6' (Vorstufe zu 6) und 11 analysiert. Sämtliche dabei verwendeten strukturellen Parameter wurden aus entsprechenden Kristallstrukturen kleiner Moleküle im CCDF⁸ bezogen (siehe Referenz¹⁰). Die vollständige Kristallstruktur des Rezeptors LADH wurde von Brändén und Eklund bestimmt²⁰; LADH tritt in einer "offenen" und einer "geschlossenen" Konformation auf. Für die Kraftfeldrechnungen verwendeten wir die "offene" Konformation als Ausgangslage (vgl. Referenz²¹, S. 5770). Die in den Rechnungen berücksichtigte aktive Stelle umfasste jeweils 331 Atome von Rezeptor und Substrat. Sämtliche Rechnungen wurden mit dem Kraftfeldprogramm 'YETI'^{9,10} auf einem DEC 10/99 Computer des Zentrums für interaktives Rechnen (ZIR) der ETH Zürich ausgeführt.

4.1. Struktur 1: Histidinol - monodentat

Nachdem das Substrat Histidinol an die aktive Stelle der LADH gelangt ist, bindet es mit dem Imidazol-N-Atom monodentat (d.h. mit nur einem Atom) ans Zink. Die quadratische Pyramide am Metall wird durch die beiden S-Atome von Cys 46 und Cys 174, dem Imidazol-N-Atom von His 67 sowie dem O-Atom einer Wassermolekel gebildet. Die Spitze der Pyramide wird vom Stickstoff-Atom des His 67 eingenommen, die anderen vier proximalen Liganden besetzen deren Basis. Das Hydroxyl-O-Atom des Histidinols ist in einer distalen Position unterhalb der Pyramiden-Basis lokalisiert:



(In dieser und den folgenden Stereo-Projektionen sind die proximalen Liganden am Zink durch ausgefüllte Kreise gekennzeichnet, der distale Ligand ist durch einen Punkt markiert. Für nicht stereographische Betrachtungsweise ist das linke Bild massgebend.)



Abstände und Winkel am Zink:

		S46	N67	S174	OH20	NSub
Zn...OH20 = 2.030 Å	S46	-				
Zn...N67 = 2.127 Å	N67	101.7°	-			
Zn...NSub = 2.140 Å	S174	88.0°	96.2°	-		
Zn...S46 = 3.609 Å	OH20	69.8°	103.0°	153.0°	-	
Zn...S174 = 2.474 Å	NSub	156.2°	95.7°	106.2°	90.7°	-

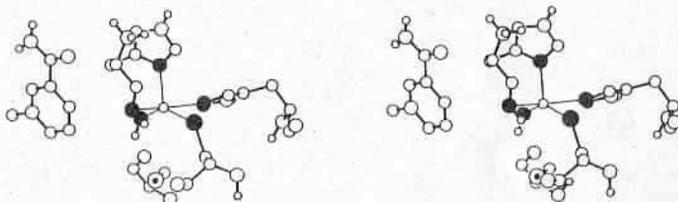
Die Metall-Koordination am Zink weist eine Energie von -18.7 kcal/Mol (71% der maximal möglichen Energie von -26.5 kcal/Mol) auf, was zeigt, dass die vorgeschlagene Ligandenanordnung vom strukturellen Standpunkt aus gesehen wahrscheinlich ist. Die Gesamt-Energie dieser Konformation beträgt -184.1 kcal/Mol, wovon noch -145.4 kcal/Mol auf van-der-Waals-Kontakte und -20.0 kcal/Mol auf H-Brücken entfallen.

Als einziger Faktor scheint der Zn...S₄₆-Abstand den strukturellen Erwartungen nicht zu genügen: Im CCDF wird für penta-koordiniertes Zink ein mittlerer Zn...S Abstand von 2.45 Å gefunden¹⁰. Dieser optimale Abstand wird denn auch vom S-Atom des Cys 174 eigenommen (d=2.47 Å), während sich das S-Atom von Cys 46 dem Zink nur bis auf 3.61 Å nähern kann. Die Direktionalität des S₄₆ bezüglich des Metalls ist jedoch nahezu ideal (vgl. Tabelle der Winkel am Zink). Es stellt sich daher die Frage, ob das Enzym durch entsprechende Veränderung der Hauptkette (was 'YETI' nicht zu simulieren vermag) Cys 46 in eine proximalere Position führen kann oder ob gerade der etwas zu lange Zn...S Abstand für die spätere Bindung von S₄₆ ans NAD⁺ (vgl. Struktur 2) entscheidend ist. Dies ist Gegenstand weiterer Untersuchungen, insbesondere mit dem Kraftfeld-Programm-System 'CHARMM'²², welches auch grössere Bewegungen der Protein-Hauptkette simulieren kann.

Das Wassermolekül bindet mit einem Abstand von 2.030 Å und mit Zn...O-H Winkeln von 119° bzw. 127° ideal ans Metall. Das Zink liegt exakt in der Ebene des Wassermoleküls, was eine sp²-Hybridisierung am Sauerstoff impliziert. Eine solche Orientierung von Wassermoleküeln wird auch bei H-Brückenbindungen mit Hydroxyl-Gruppen beobachtet⁹. Das H₂O-Molekül bildet zudem eine H-Brücke mit Ser 48 (d_{O...O}=2.74 Å).

4.2. Struktur 2: Histidinol - bidentat

In einem nächsten Reaktionsschritt bindet Histidinol als bidentater Ligand ans Metall. Dabei wird das S-Atom des Cys 46 in eine distale Position gedrängt. Die quadratische Pyramide am Zink wird nun durch die Hydroxyl-O-Atome des Substrats und eines OH⁻-Ions, dem Imidazol-N-Atom von His 67, dem S-Atom von Cys 174 und dem Imidazol-N-Atom des Substrates gebildet, wobei letzteres die Pyramiden-spitze bildet.



Abstände und Winkel am Zink:

		N ₆₇	S ₁₇₄	O _{OH-}	N _{Sub}	O _{Sub}
Zn•••O _{OH-} = 2.043 Å	N ₆₇	-				
Zn•••O _{Sub} = 2.094 Å	S ₁₇₄	82.1°	-			
Zn•••N ₆₇ = 2.333 Å	O _{OH-}	97.8°	148.2°	-		
Zn•••N _{Sub} = 2.176 Å	N _{Sub}	83.9°	118.5°	93.0°	-	
Zn•••S ₁₇₄ = 2.531 Å	O _{Sub}	166.8°	86.5°	95.5°	95.8°	-

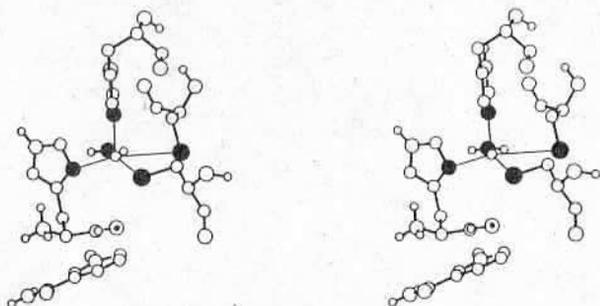
Die Koordination am Zink weist (wie bei Struktur 1) eine Energie von -18.7 kcal/Mol auf. Die Gesamt-Energie ist mit -188.4 kcal/Mol (wovon noch -149.1 kcal/Mol auf van-der-Waals-Kontakte und -20.6 kcal/Mol auf H-Brücken entfallen) um 4.3 kcal/Mol günstiger als diejenige mit monodentater Koordination. Absolute Energien aus Kraftfeldrechnungen sind mit Vorsicht zu genießen, da Energien (im Gegensatz zu strukturellen Parametern) kaum an experimentellen Daten ge-eicht werden können. Immerhin deutet die doch signifikante Differenz eine erhöhte Stabilität der bidentaten Koordination an.

Das Hydroxid-Ion bindet mit einem Abstand von 2.043 Å und mit einem Zn•••O-H Winkel von 130° ans Metall. Das OH⁻-Molekül bildet wie die Wassermolekel (in Struktur 1) eine H-Brücke mit Ser 48 (d_{O•••O}=2.78 Å), wobei das OH⁻-Ion (im Gegensatz zum H₂O in Struktur 1) als H-Brücken-Acceptor fungiert.

Für die anschließende H^- -Übertragung vom Substrat auf das Coenzym NAD^+ , müssen sich diese in günstiger gegenseitiger Orientierung befinden: Die rechnerisch gefundene Konformation minimaler Energie sieht das C-4-Atom des Nicotinamid-Ringes von NAD^+ in einem Abstand von 3.41 Å vom Hydroxyl-C-Atom des Substrates. Wichtiger als der direkte C-C-Abstand ist jedoch die räumliche Lage des Nicotinamid-Ringes zum Substrat: Der Winkel des Angriffsvektors (vom Hydroxyl-C-Atom des Substrates zum C-4-Atom des Nicotinamidringes von NAD^+) zur Ringebene beträgt 129° , was nahe dem strukturellen Optimum von 120° liegt²³.

4.3. Struktur 3: Histidinal - monodentat

Wie in Struktur 1 wird die quadratische Pyramide am Metall durch die beiden S-Atome von Cys 46 und Cys 174, den Imidazol-N-Atomen von His 67 und dem Substrat sowie dem O-Atom einer Wassermolekel gebildet. Die Spitze der Pyramide wird vom Stickstoff-Atom des His 67 eingenommen, die anderen vier proximalen Liganden bilden deren Basis. Das Carbonyl-O-Atom des Histidinals ist in einer distalen Position unterhalb der Pyramiden-Basis lokalisiert:



Abstände und Winkel am Zink:

	S46	N67	S174	OH2O	NSub
Zn•••OH ₂ O = 2.031 Å	S46	-			
Zn•••N ₆₇ = 2.143 Å	N67	100.4°	-		
Zn•••N _{Sub} = 2.141 Å	S174	88.8°	95.1°	-	
Zn•••S ₄₆ = 3.649 Å	OH ₂ O	70.2°	104.0°	153.6°	-
Zn•••S ₁₇₄ = 2.466 Å	N _{Sub}	154.8°	99.6°	104.7°	90.1°

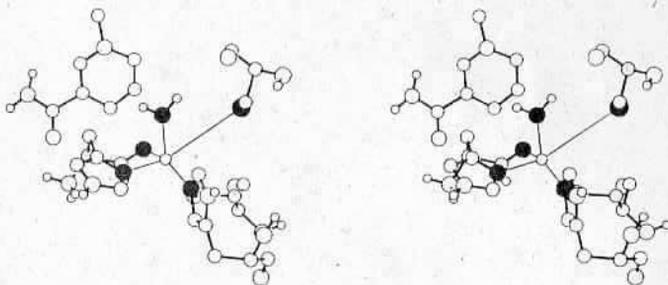
Die Metall-Koordination am Zink weist eine Energie von -18.7 kcal/Mol (71% der maximal möglichen Energie) auf. Die Gesamt-Energie beträgt -187.2 kcal/Mol, wovon noch -146.9 kcal/Mol auf van-der-Waals-Kontakte und -21.6 kcal/Mol auf H-Brücken entfallen.

Das Wassermolekül bindet mit einem Abstand von 2.031 Å und mit $\text{Zn} \cdots \text{O}-\text{H}$ Winkeln von 118° bzw. 130° ans Metall. Auch hier bildet das H_2O -Molekül eine H-Brücke mit Ser 48 ($\text{d}_{\text{O} \cdots \text{O}} = 2.75$ Å).

Die rechnerisch gefundene Konformation minimaler Energie sieht das C-4-Atom des Dihydropyridinringes von NADH in einem Abstand von 3.61 Å zum Carbonyl-C-Atom des Substrates.

4.4. Struktur 6' (Vorstufe zu 6): Histidinal - bidentat

Im nächsten Reaktionsschritt bindet Histidinal als bidentater Ligand ans Metall: Die quadratische Pyramide am Zink wird durch das Carbonyl-O-Atom des Substrats, dem Hydroxyl-O-Atom eines Wasser-Moleküls, dem Imidazol-N-Atom von His 67, dem S-Atom von Cys 46 und dem Imidazol-N-Atom des Substrates gebildet. Das S-Atom von Cys 174, welches in einem nucleophilen Reaktionsschritt das Carbonyl-C-Atom des Substrats angreifen wird (Bildung eines Thiohemiacetals; Struktur 6), befindet sich in distaler Lage unterhalb der Pyramidenbasis:



Abstände und Winkel am Zink:

	N ₆₇	S ₁₇₄	O _{OH-}	N _{Sub}	O _{Sub}
Zn•••O _{OH-} = 2.027 Å	N ₆₇	-			
Zn•••O _{Sub} = 2.068 Å	S ₁₇₄	89.7°	-		
Zn•••N ₆₇ = 2.161 Å	O _{OH-}	65.3°	111.3°	-	
Zn•••N _{Sub} = 2.175 Å	N _{Sub}	153.4°	87.8°	91.1°	-
Zn•••S ₄₆ = 4.039 Å	O _{Sub}	98.8°	155.6°	93.0°	94.3°

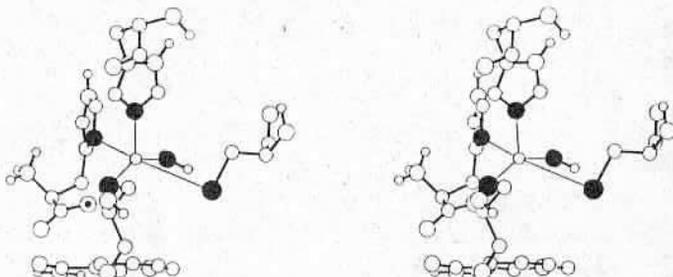
Die Metall-Koordination am Zink weist eine Energie von nur -14.4 kcal/Mol (54% der maximal möglichen Energie) auf. Die Gesamt-Energie beträgt -185.1 kcal/Mol, wovon noch -150.1 kcal/Mol auf van-der-Waals-Kontakte und -20.6 kcal/Mol auf H-Brücken entfallen. Die gegenüber den Strukturen 1,2 und 3 deutlich tiefere Energie am Zink ist ein Hinweis für die (zumindest strukturell) ungünstige Konformation dieser Spezies.

Die Distanz vom S-Atom von Cys 174 zum Carbonyl-C-Atom des Histidinalins von 3.55 Å scheint (auch in dieser Vorstufe zu Spezies 6) noch zu gross, um ohne entsprechende Konformationsänderung der Protein-Hauptkette eine Thioacetalbildung zu initialisieren. Die besondere Mobilität dieses Abschnittes der Hauptkette kam bei der kristallographischen Strukturbestimmung in erhöhten Temperaturfaktoren der entsprechenden Atome zum Ausdruck²⁰. Zur Simulation dieser Hauptkettenbewegung soll demnächst das Kraftfeldprogramm 'CHARMM'²² eingesetzt werden.

Das Wassermolekül bindet mit einem Abstand von 2.027 Å und mit Zn•••O-H Winkeln von 121° bzw. 129° ans Metall. Zusätzlich findet sich wieder eine H-Brücke zu Ser 48 (d_{O•••O}=2.74 Å).

4.5. Struktur 11: Histidin - monodentat

Das Oxidationsprodukt der zweiten Stufe, Histidin, bindet mit dem Imidazol-N-Atom monodentat ans Zink. Die quadratische Pyramide am Metall wird durch die beiden S-Atome von Cys 46 und Cys 174, dem Imidazol-N-Atom von His 67 sowie dem O-Atom einer Wassermolekel gebildet. Das Carboxyl-O-Atom des Histidins ist in einer distalen Lage unterhalb der Pyramidenbasis lokalisiert:



Abstände und Winkel am Zink:

	S46	N67	S174	OH2O	NSub
Zn•••OH2O = 2.032 Å	S46	-			
Zn•••N67 = 2.121 Å	N67	103.3°	-		
Zn•••NSub = 2.673 Å	S174	89.8°	95.6°	-	
Zn•••S46 = 3.562 Å	OH2O	69.4°	108.1°	151.2°	-
Zn•••S174 = 2.487 Å	NSub	154.9°	86.9°	112.3°	85.7°

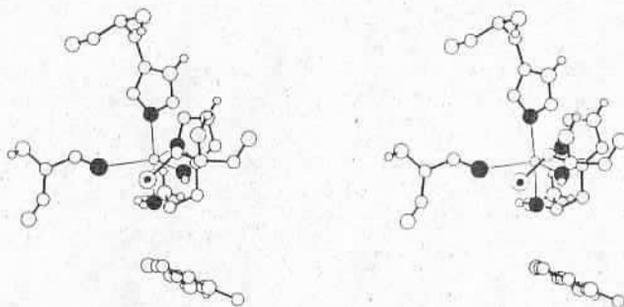
Die Metall-Koordination am Zink weist eine Energie von nur -13.8 kcal/Mol (52% der maximal möglichen Energie) auf. Die Gesamt-Energie beträgt trotzdem -193.6 kcal/Mol, wovon -155.0 kcal/Mol auf van-der-Waals-Kontakte und -24.8 kcal/Mol auf H-Brücken entfallen. Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass die Anordnung mit dem Imidazol-N-Atom des Substrats Histidin als proximalem Liganden am Zink nicht besonders stabil ist. Dies erscheint sinnvoll, da die Reaktion Histidinal --> Histidin nicht reversibel verläuft und das Produkt Histidin daher die proximale Position am Zink schnell verlassen wird (vgl. Struktur 12).

Das Wassermolekül bindet mit einem Abstand von 2.032 Å und mit Zn•••O-H Winkeln von 120° bzw. 129° ideal ans Metall und bildet eine H-Brücke mit Ser 48 (dO•••O=2.75 Å).

4.6. Trigonal-bipyramidale Anordnung am Zink

Zink vermag bei fünfzähliger Koordination sowohl eine quadratisch-planare als auch eine trigonal-bipyramidale Ligandenanordnung zu stabilisieren¹⁰. Wir haben daher sämtliche untersuchten Strukturen auf beide Möglichkeiten hin analysiert. Als Beispiel für die trigonal-bipyramidale Anordnung soll Struktur 2 diskutiert werden.

Histidinol bindet als bidentater Ligand ans Metall. Das Imidazol-N-Atom von His 67 und das Hydroxyl-O-Atom von Histidinol bilden die axialen Liganden der trigonalen Bipyramide, während das OH⁻-Ion, das S-Atom von Cys 174 und das Imidazol-N-Atom des Substrates die äquatoriale Ebene aufspannen. Das als distaler Ligand fungierende S-Atom von Cys 46 befindet sich in der äquatorialen Ebene zwischen dem S-Atom von Cys 174 und dem OH⁻-Ion, gegenüber vom Imidazol-N-Atom des Substrates:



Abstände und Winkel am Zink:

		N ₆₇	S ₁₇₄	OH ⁻	N _{Sub}	O _{Sub}
Zn•••O _{OH-} = 2.051 Å	N ₆₇	-				
Zn•••O _{Sub} = 2.072 Å	S ₁₇₄	90.5°	-			
Zn•••N ₆₇ = 2.172 Å	O _{OH-}	95.9°	119.3°	-		
Zn•••N _{Sub} = 2.157 Å	N _{Sub}	89.5°	131.2°	109.2°	-	
Zn•••S ₁₇₄ = 2.589 Å	O _{Sub}	176.1°	85.7°	86.9°	92.2°	-



Die Koordination am Zink ist fast optimal und weist eine Energie von -23.7 kcal/Mol (89% der maximal möglichen Energie; vgl. quadratische Pyramide: nur -18.7 kcal/Mol, 71%) auf. Die Gesamt-Energie ist mit -195.0 kcal/Mol (wovon -150.0 kcal/Mol auf van-der-Waals-Kontakte und -21.3 kcal/Mol auf H-Brücken entfallen) um 6.7 kcal/Mol günstiger als diejenige mit quadratisch-pyramidaler Ligandenanordnung. Diese signifikante Differenz zeigt eine erhöhte Stabilität und damit grossere Wahrscheinlichkeit der trigonal-bipyramidalen Koordination an.

Das OH^- -Ion bindet mit einem Abstand von 2.051 Å und mit einem $\text{Zn}\cdots\text{O}-\text{H}$ Winkel von 143° ans Metall und bildet eine H-Brücke mit Ser 48 ($d_{\text{O}\cdots\text{O}}=2.81$ Å).

Die rechnerisch gefundene Konformation minimaler Energie sieht das C-4-Atom des Nicotinamid-Ringes von NAD^+ in einem Abstand von 3.14 Å vom Hydroxyl-C-Atom des Substrates. Der Winkel des Angriffsvektors zur Ringebene beträgt 122° . Diese gegenseitige Orientierung von Substrat und NAD^+ darf als ideal bezeichnet werden.

In der folgenden Tabelle sind die berechneten Energien (in Klammer die Energien der Koordination am Zink) quadratisch-pyramidaler und trigonal-bipyramidaler Koordination der untersuchten Strukturen zusammengestellt (alle Energien in kcal/Mol):

<u>Struktur</u>	<u>quadratische Pyramide</u>	<u>trigonale Bipyramide</u>
1	-184.1 (-18.7)	-181.6 (-15.7)
2	-188.4 (-18.7)	-195.0 (-23.7)
3	-187.2 (-18.7)	-184.5 (-16.1)
6'	-185.1 (-14.4)	-186.6 (-16.5)
11	-193.6 (-13.8)	-192.5 (-11.6)

Es ist deutlich ersichtlich, dass bei monodentater Substrat-Bindung energetisch/strukturell die quadratisch-pyramidale Ligandenanordnung (Strukturen 1,3,11), bei bidentater jedoch die trigonal-bipyramidale (Strukturen 2,6') bevorzugt wird.



Der "Uebergangszustand" von einer quadratischen Pyramide zur anderen liegt strukturell nahe einer trigonalen Bipyramide. Daher würde z.B. bei der Oxidation von Histidinol (Struktur 1) zu Histidinal (Struktur 3) eine trigonal-bipyramidale Zwischenstruktur (Struktur 2) energetisch tiefer liegen als eine "umgeklappte" quadratische Pyramide, was durch die Kraftfeld-Rechnungen bestätigt wurde.

5. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Der für die zweistufige Oxidation von Histidinol über Histidinal zu Histidin vorgeschlagene Reaktionsmechanismus kann mit Computer-unterstütztem Molecular Modelling in den bisher untersuchten fünf Zwischenstufen gestützt werden. Die Annahme eines penta- koordinierten Zinks ist strukturell sinnvoll und steht in Übereinstimmung mit bekannten Daten von anderen Enzymen (Carboanhydrase, Thermolysin). Es zeigt sich jedoch, dass ein "kombinierter" Reaktionsmechanismus (quadratische Pyramide und trigonale Bipyramide) die strukturellen und energetischen Gegebenheiten besser zu beschreiben vermag als ein "einfacher" (nur quadratische Pyramide oder nur trigonale Bipyramide). Über jene Reaktionschritte, welche eine erhöhte Mobilität der Proteinhauptkette bedingen (Thioacetalbildung, Hydrolyisierung des Thioesters und der Austausch NAD^+/NADH), lässt sich anhand der bisherigen Konformations-Optimierungen mit 'YETI' wenig aussagen. Hierzu sollen Arbeiten mit dem Kraftfeldprogramm 'CHARMM' Aufschluss geben.

6. VERDANKUNG

Diese Arbeit wurde vom Fonds für versuchstierfreie Forschung Zürich (FFVFF), vom Schweizerischen Nationalfonds und von der ETH Zürich finanziert.



7. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] "Zahlen und Fakten zum Alkohol- und Drogenproblem 1985/86"
Schweiz. Fachstelle für Alkoholprobleme, Lausanne
- [2] Schweiz. Fachstelle für Alkoholprobleme:
Basler Zeitung 1981, 260, 6.Nov.1981
- [3] Repräsentativ-Untersuchung der Schweiz. Fachstelle für Alkoholprobleme,
Lausanne, 1979
- [4] Badische Zeitung (BRD) 1981, 242, 20.Okt.81
- [5] Ambar,A.; ETH-Dissertation 1981, Nr. 6840
- [6] Good,P.; ETH-Dissertation 1980, Nr. 6571
- [7] Dutler,H.; Ambar,A.
"The Coordination Chemistry of Metalloenzymes"
Edtn. Bertini, I.; Drago,R.S.; Lucchinat,C.
NATO Adv. Study Inst. Series
Reidel Publ., 1982, p. 135-145
- [8] Allen,F.H.; Bellard,S.; Brice,M.D.; Cartwright,B.A.; Doubleday,A.;
Higgs,H.; Hummelink,T.; Hummelink-Peters,B.G.; Kennard,O.; Motherwell,
W.D.S.; Rodgers,J.R.; Watson,D.G.
Acta Crystallogr., Sect B, 1979, B35, 2331-2339
- [9] Vedani,A.; Dunitz,J.D.
J.Am.Chem.Soc., 1985, 107 (im Druck)
- [10] Vedani,A.; Dobler,M.; Dunitz,J.D.
J.Comp.Chem. (eingesandt)
- [11] Teschke,A.; Lieber,C.S.
Leber Magen Darm, 1978, 8, 237
- [12] Thurman,R.G.; Yonetani,T.; Williamson,J.R.; Chance,B.
"Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems"
Academic Press Inc., New York & London 1974



- [13] Bringmann, G.
Naturwissenschaften, 1979, 66, 22
- [14] Adams, E.
J. Biol. Chem., 1954, 209, 829
- [15] Creaser, E.H.; Benett, D.J.; Drysdale, R.B.
Biochem. J., 1967, 103, 36
- [16] Wixom, R.L.; Anderson, H.L.
"Histidine Metabolism, Clinical Aspects, Therapeutic use"
Edtn. Kluthe, R.; Katz, N.R.
Thieme Publishers, Stuttgart 1979, p.19
- [17] Hansen, B.S.; Vaugham, M.H.; Wang, L.
J. Biol. Chem., 1972, 247, 3854
- [18] Prince, R.H.
Adv. Inorg. Chem. Radiochem., 1979, 22, 349-436
- [19] Vedani, A.; Meyer, jr. E.F.
J. Pharm. Sci., 1984, 73, 352-358
- [20] Brändén, C.-I.; Eklund, H.
"Dehydrogenases requiring Nicotinamide Coenzyme"
Ed. Jefferey, J.
Birkhäuser Basel, 1980, p. 1-43
- [21] Cedergren-Zeppezauer, E.
Biochemistry, 1983, 22, 5761-5772
- [22] Brooks, B.R.; Bruccoleri, R.E.; Olafson, B.D.; States, D.J.;
Swaminathan, S.; Karplus, M.
J. Comp. Chem., 1983, 4, 187-217
- [23] Bürgi, H.B.; Dunitz, J.D.; Lehn, J.M.; Wipff, G.
Tetrahedron, 1974, 30, 1563-1572

WER VON EUCH HÄT
GESAGT, ICH HÄTTE EINE
ALKOHOLDEHYDROGE-
NASE ?!!

