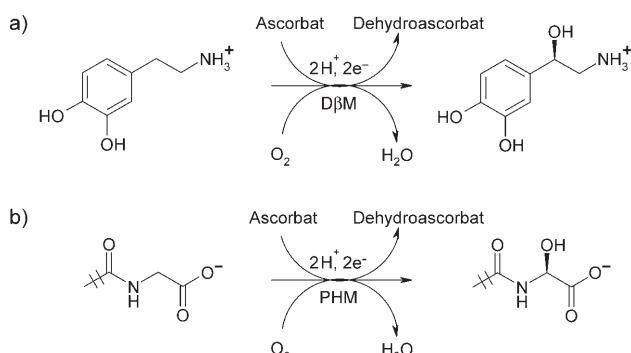


Wie hydroxylieren Kupferenzyme aliphatische Substrate? Jüngste Erkenntnisse aus der Chemie synthetischer Modellsysteme**

Malte Rolff und Felix Tuczek*

Bioanorganische Chemie · Enzyme · Kupfer · Peroxo-Komplexe · Superoxo-Komplexe

Kupferenzyme spielen eine Rolle bei vielen wichtigen biochemischen Prozessen. Klassisch werden die dabei beteiligten aktiven Zentren je nach Zahl der Kupferatome und chemischer Zusammensetzung in Typ1, Typ2 und Typ3 unterteilt.^[1] Obwohl diese Einteilung ursprünglich auf der Grundlage struktureller und spektroskopischer Eigenschaften erfolgte, spiegelt sie auch eine klare Aufgabenteilung wider: Während Typ3-Zentren in den Enzymen Tyrosinase und Catecholoxidase die Oxygenierung (Hydroxylierung) und/oder Zweielektronenoxidation von Phenolsubstraten vermitteln, sind Typ1-Kupferzentren („blaue Kupferzentren“) in den Elektronentransfer involviert. Typ2-Kupferzentren gibt es in Superoxid-Dismutasen, Oxidasen/Reduktasen und Oxygenasen. Kupferhaltige Oxidasen wie Aminoxidase oder Galactose-Oxidase enthalten ein Typ2-Kupferzentrum und koppeln die Oxidation eines Substrats an die Zweielektronenübertragung auf Sauerstoff unter Bildung von H_2O_2 . Monoxygenase-Aktivität findet sich hingegen bei Kupferenzymen mit zwei Typ2-Zentren. Ein Typ2-Zentrum (Cu_A) übernimmt dabei den Elektronentransfer, während das andere Typ2-Zentrum (Cu_B) für den Einbau von Sauerstoff in das Substrat zuständig ist. Im Unterschied zu den Typ3-Systemen werden von diesen Enzymen keine aromatischen, sondern aliphatische Substrate hydroxyliert; ferner sind die beiden Kupferzentren ungekoppelt. Dies trifft besonders auf die Dopamin- β -monoxygenase (D β M) und die Peptidylglycin- α -hydroxylierende Monoxygenase (PHM) zu.^[2] Das erstgenannte Enzym spielt eine Rolle bei der Biosynthese von Adrenalin (Umwandlung von Dopamin in Noradrenalin) während PHM in die post-translationale Modifizierung von Peptiden involviert ist. Beide Enzyme setzen den nicht eingebauten Sauerstoff mithilfe von zwei Äquivalenten Ascorbat zu Wasser um (Schema 1).



Schema 1. Substratumsetzungen von a) D β M und b) PHM.

Obwohl großes Interesse daran besteht, die Wirkungsweise von D β M und PHM auf molekularer Ebene aufzuklären, ist der genaue Reaktionsverlauf in diesen Enzymen bislang unbekannt. Einen entscheidenden Hinweis lieferte eine Veröffentlichung aus dem Jahre 2004, welche die Röntgenstruktur der Sauerstoff-gebundenen Form von PHM mit einem Substratanalogon zeigt (Abbildung 1).^[3] Dabei wird Disauerstoff end-on (η^1) an Cu_B gebunden. Der Cu_B -O-O-Winkel beträgt 110° , und der O-O-Abstand wurde zu 1.23 \AA bestimmt. Diese Geometrie ist in Einklang mit einem Disauerstoff oder einer Superoxidspezies, die an Cu_B gebunden ist, nicht aber mit einer Cu-Peroxo-Einheit (oder Cu-Hydroperoxy-Einheit) (Schema 2a,b). Die Autoren nahmen zunächst an, dass im ersten Schritt ein Elektron von Cu_A übertragen wird, wobei die Cu^{II} - in eine Cu^{I} -Superoxospezies übergeht. Dieses Intermediat würde das aliphatische Substrat unter H-Abstraktion angreifen, wofür der O_2 -Ligand in Richtung dieses H-Atoms rotieren könnte (Abbildung 1). Basierend auf Rechnungen wurde dieses Reaktionsschema jedoch später modifiziert (Schema 3):^[4] Demnach werden zunächst ein Elektron und ein Proton auf das Superoxo-Intermediat übertragen, wobei eine Cu^{II} -Hydroperoxospezies entsteht. Dieses Zwischenprodukt spaltet spontan die O-O-Bindung unter Bildung von Wasser und einem hochreaktiven Kupfer-Oxo-Intermediat. Diese $\{Cu=O\}^{2+}$ -Spezies, die als $[L_3^{+}Cu^{II}-O^{-}]^{2+}$ -Einheit formuliert wurde (L = Liganden), hydroxyliert sodann das Substrat in einer Weise, die analog zum $[(Por^-)Fe^{IV}=O]$ -Intermediat („compound I“; $Por^- =$

[*] M. Rolff, Prof. Dr. F. Tuczek
Institut für Anorganische Chemie
Christian Albrechts Universität Kiel
Otto Hahn Platz 6/7, 24098 Kiel (Deutschland)
Fax: (+49) 431-880-1520
E-Mail: ftuczek@ac.uni-kiel.de

[**] Wir danken T. Schweikardt (Mainz) für Abbildung 1, die mithilfe des Programms YASARA erstellt wurde.

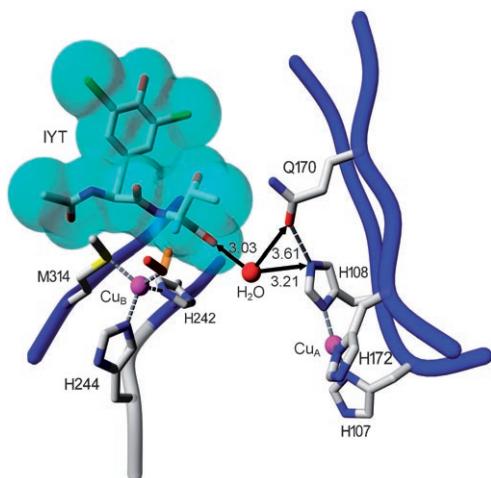
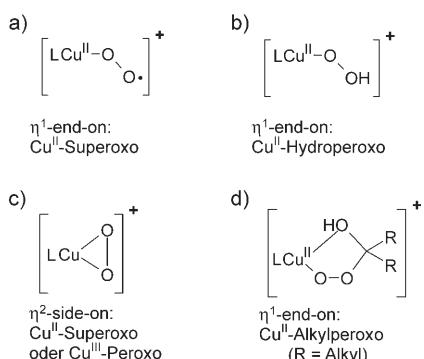
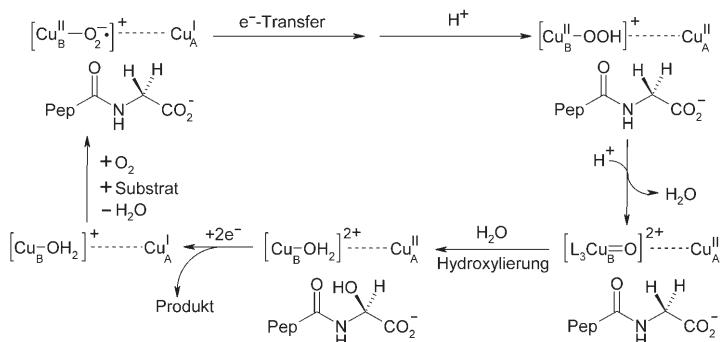


Abbildung 1. Aktives Zentrum von PHM mit den beiden Kupferatomen (violett) und einem gebundenen Substratanalogon (IYT, cyan). Disauerstoff (roter Balken) ist end-on terminal (η^1) als Superoxid koordiniert und kann prinzipiell zu einem H-Atom von IYT (hellblau) hin rotieren (orange), um eine H-Abstraktion zu verursachen (Details siehe Text). N blau, S gelb, I grün.



Schema 2. Einkernige Cu-O₂-Komplexe (a)–(d); L = Ligand.

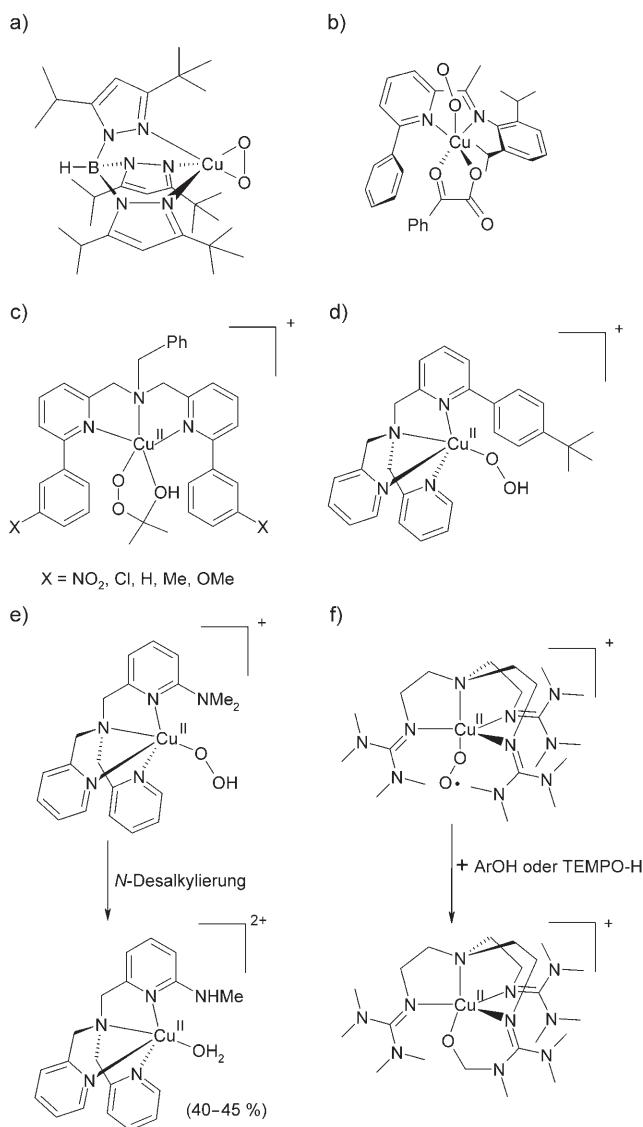


Schema 3. Vorschlag von Amzel et al. (2006) für den katalytischen Mechanismus der PHM. Pep = Peptidrest.

Porphyrin-Radikal anion) von Cytochrom P450 ist. Nachfolgend müssen die beiden Cu^{II}-Zentren wieder reduziert werden; der Katalyzyklus schließt sich mit der Freisetzung des Substrats. Es sollte allerdings erwähnt werden, dass es auch andere Vorschläge für den Mechanismus gibt, die sich von diesem Reaktionsschema unterscheiden.^[5]

Die Nachahmung der enzymatischen Reaktion mit einfachen Modellsystemen und die Charakterisierung der dabei auftretenden Kupfer-Sauerstoff-Intermediate ist ein spannendes und hochaktuelles Gebiet der bioanorganischen Chemie. Dabei ging und geht es zunächst einmal darum, Sauerstoff-Addukte einkerniger Kupfer-Komplexe herzustellen und zu charakterisieren. Das ist nicht einfach, da solche Intermediate die Tendenz haben, zu zweikernigen O₂-verbrückten Intermediaten zu dimerisieren. Diese sind aber Modellsysteme für Typ3-Kupferzentren, deren Sauerstoff-Reaktivität mit Monophenolsubstraten heute als elektrophile aromatische Substitution interpretiert wird.^[6] Insofern wurden viele Versuche unternommen, die einkernigen Cu-O₂-Addukte durch sperrige Liganden vor einer Dimerisierung zu schützen. Ein früher Vertreter der Klasse von einkernigen Cu-O₂-Addukten ist der Side-on-Superoxo-Komplex (Schema 2c) von Kitajima et al., der durch Reaktion des Cu^I-Komplexes mit O₂ in Lösung bei tiefen Temperaturen generiert wurde (Schema 4a).^[7] Der Schlüssel zur Synthese dieses Komplexes lag in der Weiterentwicklung eines für die Bildung von $\mu\text{-}^2\text{-}\text{O}_2$ -Dikupfer(II)-Komplexen bekannten Liganden zu einem Liganden mit stärkerer sterischer Hinderung, der eine Dimerisierung zweier Kupferzentren verhindert. Weitere Beispiele für η^2 -Disauerstoff-gebundene, einkernige Kupfer-Komplexe wurden von Tolman et al. untersucht.^[8] Diese Komplexe wurden bei tiefen Temperaturen durch Oxygenierung sterisch gehinderter β -Diketiminato- und Anilido-Imin-Kupfer(I)-Komplexe synthetisiert.^[8b–d] Der hohe räumliche Anspruch der Liganden ist auch hier wieder notwendig, um die Bildung von zweikernigen Cu₂-Bis(μ -oxo)-Komplexen zu verhindern, die insbesondere im Überschuss des jeweiligen Kupfer(I)-Komplexes entstehen. Während die η^2 -Koordination durch Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen werden konnte, bleibt die Frage offen, ob es sich bei diesen Systemen um Cu^{II}-Superoxokomplexe oder um Cu^{III}-Peroxo-Komplexe handelt.^[8b,c] Aktuelle spektroskopische Studien und DFT-Rechnungen lassen auch auf eine Cu-O₂-Einheit im Kontinuum zwischen diesen beiden Grenzstrukturen schließen.^[8a] Des Weiteren synthetisierten Tolman et al. einkernige Cu-Komplexe mit 2-Pyridincarbaldehydimin-Liganden, die in 6-Stellung verschieden substituierte Arene enthalten (Schema 4b). Bei der Reaktion zweier dieser Systeme mit O₂ wurde eine Hydroxylierung des Arenrings gefunden, die vermutlich durch eine hochvalente [Cu=O]⁺-Spezies vermittelt wird. Das andere O-Atom des zuerst end-on Superoxokomplexen gebundenen Disauerstoffs wird auf das als Cofaktor koordinierte α -Ketocarboxylat übertragen, nachdem CO₂ abgespalten wurde.^[8c]

Im Unterschied zu Tolman et al. synthetisierten Itoh und Mitarbeiter einkernige Cu^{II}-Hydroperoxo-Komplexe (Schema 2b) durch Umsetzung von Kupfer(II)-Komplexen sperriger dreizähniger Liganden mit einem Gemisch aus Triethylamin und Wasserstoffperoxid im Überschuss bei tiefen Temperaturen.^[9] Auf der Basis kinetischer Messungen postulierten sie ein vorgelagertes De-protonierungsgleichgewicht von H₂O₂ mit anschließender Koordination des Hydroperoxidionen an das Kupferzen-



Schema 4. Cu-O₂-Modellsysteme für D β M und PHM: a) Side-on-Cu^{II}-Superoxo-Komplex von Kitajima et al.^[17] b) End-on-Cu-O₂-Komplex mit einem substituierten 2-Pyridincarbaldehydimin- und einem α -Ketocarboxylat-Liganden von Tolman et al.^[18] c) Cu^{II}-Alkylperoxy-Komplex mit verschiedenen substituierten N,N-Bis[(6-phenyl-2-pyridyl)methyl]benzylamin-Liganden von Itoh et al.^[9a] d) Cu^{II}-Hydroperoxy-Komplex mit 6tBP-Ligand nach Karlin et al.^[10] e) N-Desalkylierung des Cu^{II}-Hydroperoxy-Komplexes mit NMe₂-TMPA-Ligand nach Karlin et al.^[11] f) aliphatische Hydroxylierung des Cu^{II}-Superoxo-Komplexes mit TMG₃tren-Ligand, initiiert durch einen H-Atom-Donor, nach Karlin et al.^[13]

trum.^[9b,c] Des Weiteren beobachteten Itoh et al., dass das Lösungsmittel einen großen Einfluss auf die Bindung der reaktiven Sauerstoffspezies hat, da bei der Umsetzung eines einkernigen Kupfer-Komplexes mit NEt₃ und H₂O₂ in verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedliche Reaktionsprodukte erhalten wurden. So wurde für die Reaktion eines einkernigen Kupfer-Komplexes mit NEt₃ und H₂O₂ in Aceton bei tiefen Temperaturen die Bildung eines Alkylperoxy-Komplexes (Schema 2d, Schema 4c) formuliert, der nach Erwärmen auf Raumtemperatur zu einer aromatischen Li-

gand-Hydroxylierung und der Bildung des analogen Phenolat-Komplexes führte.^[9a] Die gleiche Reaktion in Propionitril hingegen lieferte den Hydroperoxy-Komplex, für den nach der Erwärmung keine Ligand-Hydroxylierung beobachtet werden konnte. Der Mechanismus der Hydroxylierung durch den Alkylperoxy-Komplex wurde bislang noch nicht ermittelt.^[9a]

Auch Karlin et al. konnten die aromatische Ligand-Hydroxylierung eines einkernigen Kupfer-Komplexes des Liganden 6tBP durch Umsetzung mit H₂O₂ in Gegenwart von NEt₃ in Aceton nachweisen.^[10] Im Unterschied zur Gruppe um Itoh wurde jedoch für diese Reaktion in Aceton der Hydroperoxy-Komplex (Schema 4d) und nicht der Alkylperoxy-Komplex als reaktives Intermediat postuliert. Eine weitere Reaktivität, die von Karlin et al. bei einkernigen Kupfer-Modellkomplexen beobachtet wurde, ist die N-Desalkylierung eines NMe₂TMPA-Liganden durch einen Hydroperoxy-Komplex (Schema 4e).^[11] Das NMe₂TMPA-System ähnelt dem H₂bppa-System [H₂bppa = Bis[(6-pivalamido-2-pyridyl)methyl][(2-pyridyl)methyl]amin] von Masuda et al., mit dem Unterschied, dass der von Karlin untersuchte Ligand ein potenziell oxidierbares Substrat in Form einer Dimethylamino-Gruppe enthält.^[12]

In keinem dieser Fälle konnte jedoch bisher eine aliphatische Ligand-Hydroxylierung beobachtet werden, wie sie durch D β M oder PHM katalysiert wird. Diese Lücke wurde kürzlich durch Karlin et al. geschlossen, die bei einem einkernigen Cu^{II}-O₂-Komplex die Hydroxylierung einer Methylgruppe des Liganden nachweisen konnten (Schema 4f).^[13] Beim untersuchten System handelt es sich um einen bei tiefen Temperaturen stabilen 1:1-Cu/O₂-Komplex mit dem superbasischen Liganden Tris[2-(N-tetramethylguanidyl)ethyl]amin (TMG₃tren). Dieses Addukt war in der Arbeitsgruppe von Sundermeyer durch Oxygenierung des analogen Cu^I-Komplexes synthetisiert worden. Schindler und Mitarbeitern war es gelungen, die Kristallstruktur des SbF₆-Salzes dieses Komplexes zu lösen.^[14] Die Molekülstruktur zeigt eine End-on-Koordination des Disauerstoffs, wie sie auch im Enzym PHM nachgewiesen wurde (Schema 4f). Die O-O-Bindungslänge und die O-O-Streckschwingungsfrequenz lassen ebenfalls auf eine End-on-Superoxo-Konfiguration (Schema 2a) schließen.

Wie Karlin et al. nun zeigen konnten, reagiert dieser Superoxo-Komplex mit einer Reihe von Mono- und Diphenol-Substraten zu den entsprechenden oxygenierten bzw. oxidierten Produkten, wobei auch Phenoxyradikale und die für Cu-Sauerstoff-Systeme typischen C-C-gekoppelten Produkte beobachtet werden. Diese Chemie war jedoch für einkernige Kupfer-Komplexe bereits vom NMe₂-TMPA-Komplex (Schema 4e) bekannt.^[11] Interessanter war die Beobachtung, dass bei diesen Reaktionen immer auch der TMG₃tren-Ligand hydroxyliert wurde, was einer dem Enzym analogen aliphatischen Hydroxylierung entspricht (Schema 1). Die Autoren schlossen aus ihren Beobachtungen, dass der Anfangsschritt für alle Hydroxylierungen eine H-Abstraktion von einem Phenol ist. Um die Ligand-Hydroxylierung zur Hauptreaktion zu machen, verwendeten sie daher einen H-Atom-Donor, der keine Folgereaktionen eingeht: N-Hydroxy-2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (TEMPO-H). Bei der Reak-

tion des Superoxo-Komplexes mit diesem Reagens entsteht zunächst ein Cu^{II}-Hydroperoxo-Komplex, was sich bei tiefen Temperaturen (ca. -100°C) spektroskopisch verfolgen lässt. Dieses Intermediat, das sich auch durch Reaktion des Cu^{II}-Komplexes mit H₂O₂ erzeugen lässt, reagiert anschließend bei Erwärmen weiter zum hydroxylierten Endprodukt (Schema 4 f, unten).

Die entscheidende Frage ist nun, ob das Hydroperoxo-Intermediat selbst in der Lage ist, die Hydroxylierung zu vermitteln, oder ob zunächst eine O-O-Spaltung erfolgen muss. Dabei würde eine $[\text{Cu}=\text{O}]^{2+}$ -Spezies ($[\text{Cu}^{\text{III}}\text{O}^-]$ oder $[\text{L}^+\text{Cu}^{\text{II}}\text{O}^-]$) entstehen, die nachfolgend das Substrat angreift. Dieses Szenario, das völlig analog zum Reaktionsmechanismus von PHM wäre (Schema 3), wurde von den Autoren durch die Zugabe eines O-Atom-Donors (PhIO) zum Cu^I-Komplex untersucht. Dabei wurde in der Tat ebenfalls eine Ligand-Hydroxylierung beobachtet.^[15] Die Autoren weisen allerdings darauf hin, dass es sich bei der Hydroxylierung auch um die Reaktion eines an das Cu^I-Zentrum koordinierten PhIO-Moleküls handeln könnte.

Karlin et al. haben durch den Nachweis der Ligand-Hydroxylierung in Sundermeyers Cu-TMG₃tren-Komplex neue experimentelle Einblicke in den Reaktionsverlauf der aliphatischen Hydroxylierung an Kupferzentren geliefert. Nun steht ein einfaches Modellsystem zur Verfügung, mit dessen Hilfe sich die Reaktionen im Enzym detailliert nachvollziehen und so besser verstehen lassen. Allerdings dürfen die stark unterschiedlichen Ligandsysteme in Enzym und Modellkomplex nicht übersehen werden: Während das aktive Cu_B-Zentrum von PHM zwei Histidin- und einen Methionin-Liganden enthält, ist das Kupferzentrum des TMG₃tren-Komplexes trigonal-pyramidal durch ein Amin-Stickstoffatom und drei stark Elektronen-donierende Imin-Gruppen koordiniert. Diese verschiedenen Koordinationsphären können durchaus unterschiedliche Reaktivitäten der involvierten Sauerstoffspezies verursachen und dementsprechend auch verschiedene Reaktionsmechanismen für die Hydroxylierung aliphatischer Substrate nach sich ziehen. Ein systematisches Verständnis dieser Struktur-Funktions-Beziehungen steht noch aus. Insofern wird dieses Thema auch in Zukunft noch reichlich Gelegenheit für neue, überraschende Befunde und interessante wissenschaftliche Kontroversen bieten.

- [1] Heute werden bis zu sieben Typen von Kupferzentren unterschieden: I. A. Koval, P. Gamez, C. Belle, K. Selmeczi, J. Reedijk, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 814–840.
- [2] J. B. Klinman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2541–2561.
- [3] S. T. Prigge, B. Eipper, R. Mains, L. M. Amzel, *Science* **2004**, *304*, 864–867.
- [4] A. Crespo, M. A. Martí, A. E. Roitberg, L. M. Amzel, D. A. Estrin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12817–12828.
- [5] a) P. Chen, E. I. Solomon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13105–13110; b) K. Yoshizawa, N. Kihara, T. Kamachi, Y. Shiota, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 3034–3041; c) J. P. Klinman, *J. Biol. Chem.* **2005**, *281*, 3013–3016.
- [6] H. Decker, T. Schweikardt, F. Tuczak, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4658–4663; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4546–4550.
- [7] K. Fujisawa, M. Tanaka, Y. Moro-oka, N. Kitajima, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 12079–12080.
- [8] a) C. J. Cramer, W. B. Tolman, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 601–608; b) N. W. Aboeella, S. V. Kryatov, B. F. Gherman, W. W. Brennessel, V. G. Young, Jr., R. Sarangi, E. V. Rybak-Akimova, K. O. Hodgson, B. Hedman, E. I. Solomon, C. J. Cramer, W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16896–16911; c) A. M. Reynolds, B. F. Gherman, C. J. Cramer, W. B. Tolman, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 6989–6997; d) D. J. E. Spencer, N. W. Aboeella, A. M. Reynolds, P. L. Holland, W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2108–2109; e) S. Hong, S. M. Huber, L. Gagliardi, C. C. Cramer, W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14190–14192.
- [9] a) A. Kunishita, J. Teraoka, J. D. Scanlon, T. Matsumoto, M. Suzuki, C. J. Cramer, S. Itoh, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7248–7249; b) T. Osako, S. Nagatomo, T. Kitagawa, C. J. Cramer, S. Itoh, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 581–590; c) T. Osako, S. Nagatomo, Y. Tachi, T. Kitagawa, S. Itoh, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4501–4504; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4325–4328.
- [10] D. Maiti, H. R. Lucas, A. A. Narducci Sarjeant, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6998–6999.
- [11] D. Maiti, A. A. Narducci Sarjeant, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6720–6721.
- [12] T. Fujii, S. Yamaguchi, Y. Funahashi, T. Ozawa, T. Toshia, T. Kitagawa, H. Masuda, *Chem. Commun.* **2006**, 4428–4430.
- [13] D. Maiti, D.-H. Lee, K. Gaoutchenova, C. Würtele, M. C. Holthausen, A. A. Narducci Sarjeant, J. Sundermeyer, S. Schindler, K. D. Karlin, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 88–91; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 82–85.
- [14] C. Würtele, E. Gaoutchenova, K. Harms, M. C. Holthausen, J. Sundermeyer, S. Schindler, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3951–3954; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3867–3869.
- [15] Falls das PhIO als Sauerstoffatom-Donor fungiert, würde allerdings formal eine $[\text{Cu}=\text{O}]^+$ -Einheit entstehen.