

Das erste katalytische Tyrosinasemodell basierend auf einem einkernigen Kupfer(I)-Komplex: Kinetik und Mechanismus**

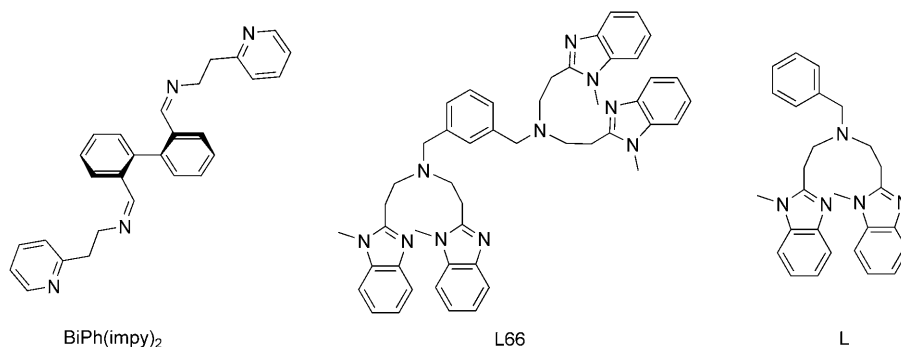
Malte Rolff, Julia Schottenheim, Gerhard Peters und Felix Tuczek*

Professor Martin Jansen zum 65. Geburtstag gewidmet

Die Tyrosinase ist ein ubiquitäres Enzym, das die *o*-Hydroxylierung von Monophenolen zu Catecholen und deren anschließende Zweielektronenoxidation zu Chinonen vermittelt.^[1] Ihre physiologische Funktion ist der erste Schritt der Melaninsynthese, die Umwandlung von Tyrosin zu Dopachinon.^[2,3] Wie aus spektroskopischen Daten und einer Kristallstruktur ersichtlich ist,^[4] enthält das zweikernige aktive Zentrum der Tyrosinase zwei Kupferionen, die von sechs Histidinresten koordiniert werden. Ein solches Typ-3-Kupferzentrum findet sich auch in den aktiven Zentren der Häemocyanine und Catechol-Oxidase.^[3] Diese Kupferproteine binden alle in ihrem Oxy-Zustand Disauerstoff in einer verbrückenden Side-on-Form, wobei die Kupfer(I)-Ionen des Desoxy-Zustands zu Cu^{II} oxidiert werden. Ausgehend vom Oxy-Zustand der Tyrosinase werden Monophenole vermutlich durch elektrophile Substitution in *o*-Diphenole, auch Catechole genannt, umgewandelt (Monophenolasereaktion).^[5] Anschließend werden die Catecholintermediate zu *o*-Chinonen oxidiert. Eine zweite Reaktivität des Oxy-Zentrums ist die Zweielektronenoxidation von externen Catecholsubstraten zu *o*-Chinonen (Diphenolasereaktion). Während die Tyrosinase sowohl Mono- als auch Diphenolasereaktivität zeigt, ist die enzymatische Aktivität der Catechol-Oxidase auf die letztere Umwandlung beschränkt.^[6]

Die Reaktivität der Tyrosinase gegenüber phenolischen oder aromatischen Substraten wurde erfolgreich mit niedermolekularen Kupferkomplexen reproduziert.^[7–12] Zunächst wurden hauptsächlich aromatische Hydroxylierungen des

Ligandengerüsts durch $\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2$ -Peroxo- und Bis- μ -Oxidokupferkerne untersucht,^[13–17] doch inzwischen ist die Hydroxylierung externer mono- und diphenolischer Substrate immer mehr in den Fokus des Interesses gerückt.^[18–24] Eine zusätzliche Herausforderung auf diesem Forschungsgebiet ist die Synthese von Systemen, die die katalytische Funktion der Tyrosinase nachstellen. Abgesehen von einem Patent^[25] existieren nur zwei Veröffentlichungen, die sich auf diesen Punkt beziehen. Im Jahr 1990 synthetisierten Réglier et al. den Liganden Bis-2,2'-[2-(pyrid-2-yl)ethyl]iminobiphenyl (BiPh(impy)₂), der zwei über einen Biphenylspacer verbrückte Pyridylethylimin-Seitenketten enthält (Schema 1).^[21,26] Es wurde gezeigt, dass eine Mischung dieses Li-



Schema 1. Formeln des Liganden BiPh(impy)₂ von Réglier et al. sowie der Liganden L66 und L von Casella et al.

ganden mit 2 Äquivalenten Cu^I-Salz, 100 Äquivalenten 2,4-Di-*tert*-butylphenol (DTBP-H) und 200 Äquivalenten Triethylamin (NEt₃) in Gegenwart von Sauerstoff die Bildung von *o*-Chinon mit einer Umsatzzahl (TON) von 16 katalysiert. Die Reaktion, die über das Auftreten einer Absorptionsbande von 3,5-Di-*tert*-butyl-*o*-chinon (DTBQ) bei rund 400 nm verfolgt wurde, stoppte nach 1 h, vermutlich wegen der Bildung eines oxoverbrückten Komplexes. Ein Mechanismus, bei dem ein zweikerniger Peroxokomplex und ein catecholverbrücktes Intermediat auftreten, wurde vorgeschlagen. Kurz nach Réglier et al. beschrieben Casella et al. ein Tyrosinasemodell basierend auf dem Liganden α,α' -Bis[bis[2-(1-methylbenzimidazol-2-yl)ethyl]amino]-*m*-xylol (L66, Schema 1).^[18] Dieses System führte in einem stöchiometrischen Modus (TON=1) zur Hydroxylierung von Methoxycarbonylphenol zu Methoxycarbonylcatechol. Mit

[*] M. Rolff, J. Schottenheim, G. Peters, F. Tuczek
Institut für Anorganische Chemie
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Max-Eyth-Straße 2, 24098 Kiel (Deutschland)
Fax: (+49) 431-880-1520
E-Mail: ftuczek@ac.uni-kiel.de

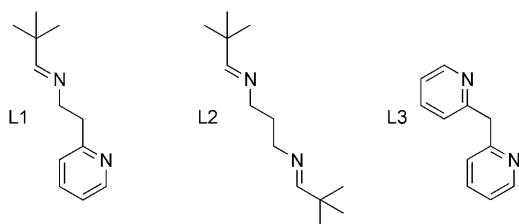
[**] Die Autoren danken Ursula Cornelissen, Stephanie Pehlke, Marianne Karbstein und Franziska Wendt für ihre Unterstützung bei den Synthesen und/oder spektroskopischen Untersuchungen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (alle Synthesen, Analytikdaten und spektroskopische Messungen) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201000973> zu finden.

Phenolen, die elektronenschiebende Substituenten wie zwei *tert*-Butylgruppen enthalten, wurden TONs > 1 beobachtet.

Eine stöchiometrische Hydroxylierung von Phenolen wurde auch für den einkernigen Cu^I-Komplex des Liganden L (Schema 1), des dreizähligen Analogons von L66, belegt. In dieser Reaktion wurde die Beteiligung des zweikernigen μ - η^2 : η^2 -Peroxo-komplexes demonstriert.^[27] Deshalb stellt sich die Frage, ob einkernige Kupfer(I)-Komplexe auch in der Lage sind, die *katalytische* Hydroxylierung von Phenolen zu vermitteln.

Um diese Frage zu beantworten, haben wir den Liganden L1 (Schema 2) synthetisiert, der eine Hälfte des zweikernigen Komplexe bildenden, vierzähligen Liganden BiPh(imp)₂ darstellt, wobei die Iminfunktion durch eine *tert*-Butylgruppe



Schema 2. Ligandenset L1–L3 dieser Studie.^[28]

statt einen aromatischen Ring terminiert wird. Der von L1 abgeleitete Bis(acetonitril)kupfer(I)-Komplex $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{L1})(\text{CH}_3\text{CN})_2](\text{PF}_6)$ (**1**) wurde der Prozedur von Casella folgend in den Phenolatokomplex überführt,^[18] indem er mit einem Äquivalent DTBP-H und zwei Äquivalenten NEt₃ umgesetzt wurde, was eine 1:1-Mischung (**2**) aus dem neutralen Phenolato-Triethylamin-Komplex $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{L1})(\text{DTBP})(\text{NEt}_3)]$ und $(\text{HNEt}_3)\text{PF}_6$ ergab.

Eine Mischung von **1** oder **2** mit 50 Äquiv. DTBP-H und 100 Äquiv. NEt₃ in CH₂Cl₂ führte nun in der Tat zur katalytischen Erzeugung von DTBQ, wie durch das Auftreten einer Absorptionsbande bei 407 nm (Abbildung 1) gezeigt werden konnte. Basierend auf einem ϵ -Wert von $1830 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ wurde – nahezu identisch mit dem Ergebnis von Réglier et al. – eine Umsatzzahl pro Dikupfereinheit von 18 (siehe unten) gefunden. Die Reaktion erwies sich jedoch als deutlich langsamer, was mit einer längeren Lebensdauer verbunden war: Während die Reaktion des BiPh(imp)₂-Systems nach einer Stunde beendet ist, werden die ersten 16 Zyklen des Cu(L1)-Systems in 10 h und die erwähnten 18 Zyklen nach 1 d erreicht.

Um durch Kupferspezies verursachte Absorptionen zu eliminieren, wurde die Reaktionsmischung nach 8 h Oxygenierung mit HCl im Überschuss versetzt und mit CH₂Cl₂ extrahiert. Das UV/Vis-Spektrum der organischen Phase zeigte deutlich die Banden von DTBQ (Abbildung 1, durchgezogene Linie). Des Weiteren wurde die organische Phase NMR-spektroskopisch untersucht, was eine Mischung aus DTBQ (15 % der Anfangsmenge an DTBP-H), DTBP-H (52 %), 3,5-Di-*tert*-butylcatechol (DTBC-H₂, 3 %) und dem C-C-Kuppelungsprodukt 4,4',6,6'-Tetra(*tert*-butyl)-2,2'-biphenol (30 %) offenbarte. Dieses Resultat stimmt gut mit der TON für die Entstehung des Chinons überein, die über die 407-nm-Bande

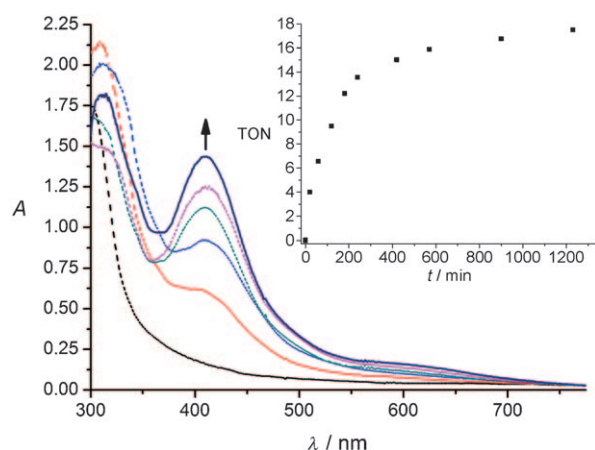


Abbildung 1. UV/Vis-spektroskopische Verfolgung der katalytischen Bildung von DTBQ durch Oxygenierung einer 20 μM Lösung von **1** in Dichlormethan in Gegenwart von 50 Äquiv. DTBP-H und 100 Äquiv. NEt₃ während der ersten 6 h (gestrichelte Linien) und nach 8 h sowie anschließendem Abbrechen durch HCl-Zugabe und Extraktion mit CH₂Cl₂ (durchgezogene Linie); A = Absorbanz; l = 5 cm. Einschub: Umsatzzahl pro Dikupfereinheit als Funktion der Zeit.

bestimmt wurde (Abbildung 1, Einschub).^[29,30] Schließlich wurde in einem Kontrollexperiment eine 1:1-Mischung aus DTBP-H und DTBC-H₂ in Gegenwart von NEt₃ oxygeniert, wobei nach der Zugabe von HCl eine 1:1-Mischung aus DTBP-H und DTBQ erhalten wurde; die UV/Vis- und NMR-Spektren von DTBQ aus diesem Experiment waren identisch mit denen, die bei der kupferkatalysierten Oxygenierung von DTBP-H erhalten wurden.

Um die Rolle des gemischten Pyridin/Imin-Donorsets in L1 klären zu können, wurden die Liganden L2 und L3 synthetisiert, die zwei Imin- bzw. zwei Pyridinfunktionen aufweisen (Schema 2).^[28] Die Umsetzung einer Mischung von $[\text{Cu}(\text{L2})]^+$ oder $[\text{Cu}(\text{L3})]^+$ mit 50 Äquiv. DTBP-H und 100 Äquiv. NEt₃ führte jedoch nicht zum Auftreten der 407-nm-Bande, was belegt, dass diese Komplexe in Bezug auf die Oxygenierung von Monophenolen katalytisch inaktiv sind. Offensichtlich stellen also weder zwei Pyridin- noch zwei Imin-Donorfunktionen pro Metallzentrum die geeignete Koordinationssphäre für eine katalytische Aktivität des Kupferkomplexes bereit.

Um Einblicke in den Mechanismus der durch Cu(L1) vermittelten Oxygenierung von DTBP-H zu DTBQ zu erhalten, wurde die Reaktion auch im stöchiometrischen Modus durchgeführt. Dabei wurde der zugrundeliegende Phenolato-Triethylamin-Kupfer-Komplex aus **1** und NaDTBP/NEt₃ synthetisiert, um die Anwesenheit von HNEt_3^+ in der Lösung zu vermeiden, was zu einer Mischung (**2'**) aus $[\text{Cu}(\text{L1})(\text{DTBP})(\text{NEt}_3)]$ und NaPF₆ führte.

Eine Lösung von **2'** in CH₂Cl₂ wurde nun ohne Zugabe von weiterem NEt₃ oder DTBP-H 30 min oxygeniert. Das Absorptionsspektrum von **2'** weist einen Phenolat \rightarrow Cu-Übergang (Schulter bei ca. 350 nm in Abbildung 2, Kurve a) auf. Nach der Oxygenierung wurde ein Absorptionsspektrum mit einer Schulter bei 340 nm (Abbildung 2, Kurve b) beobachtet. Das zugehörige Spektrum ähnelt dem des Catecholatokomplexes des L55-Systems von Casella et al.^[31] Das er-

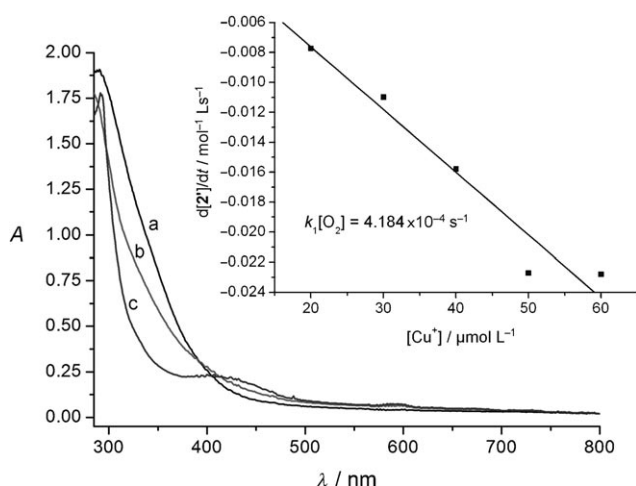


Abbildung 2. 500 μM Lösung von **1** in Dichlormethan in Gegenwart von 1 Äquiv. NaDTBP und 1 Äquiv. NEt_3 (a, **2'**), nach 30 min Oxygenierung (b, **4**) sowie nach Zugabe von 200 Äquiv. NEt_3 und 100 Äquiv. DTBP-H in Argonatmosphäre (c); $l = 1$ cm. Einschub: Kinetik der Oxygenierung von **2'** zu **4** bei $\lambda = 310$ nm.

zeugte Intermediat (**4**) kann somit Catecholat enthalten, das an einen zweikernigen Kupferkomplex koordiniert ist. Diese Vermutung wurde durch die NMR-Analytik nach Zugabe von HCl und Extraktion mit CH_2Cl_2 gestützt: Die organische Phase enthielt annähernd eine 5:4:1-Mischung aus DTBP-H, DTBQ und DTBC- H_2 , was die Gegenwart eines Catecholats und eines Phenolats im Intermediat **4** nahelegt.^[32] Des Weiteren wurde **4** isoliert und durch Elementaranalyse, magnetische Suszeptibilität (χ) und Massenspektrometrie charakterisiert. Die Elementaranalyse ist mit einer Formulierung von **4** als zweikerniger Komplex $[\text{Cu}_2(\text{L1})_2(\text{OH})(\text{DTBC})(\text{DTBP})] \cdot 2\text{NaPF}_6$ kompatibel. Die $\chi(T)$ -Messungen deuten hingegen nur auf eine schwache antiferromagnetische Wechselwirkung hin, was nahelegt, dass **4** während der Isolierung in zwei Cu^{II} -Monomere, $[\text{Cu}(\text{L1})(\text{DTBC})] + [\text{Cu}(\text{L1})(\text{OH})(\text{DTBP})]$ (Verbindung **4'**; siehe die Hintergrundinformationen), zerfällt. Einen weiteren Beleg für diese Konstitution lieferte das MALDI-TOF-Massenspektrum (Abbildung 3, unten): Die Struktur des hochaufgelösten Signals bei $m/z \approx 477$ wird exzellent durch eine 1:1-Überlagerung der Signale von $[\{\text{Cu}(\text{L1})(\text{DTBC})\} + 3\text{H}]^+$ und $[\{\text{Cu}(\text{L1})(\text{DTBP})(\text{OH})\} + 3\text{H}]^+$ reproduziert (Abbildung 3, oben), die während der Ionisierung von **4'** gebildet werden. Der Zerfall des μ -Catecholato- μ -hydroxo- Cu^{II} -Dimers in zwei Monomere erinnert an das Cu-DBED-System, für dessen korrespondierendes Intermediat bei Zugabe von H^+ eine Aufspaltung in einen Aqua- Cu^{I} - und einen Semichinon- Cu^{II} -Komplex nachgewiesen wurde.^[23]

Somit ist durch zwei unabhängige Methoden (d. h. sowohl durch Aufarbeitung und NMR-Analytik einer Verbindung **4** enthaltenden Lösung als auch durch direkte Isolierung/Charakterisierung von **4**) belegt, dass die Produkt(Catechol)-Ausbeute im stöchiometrischen Modus (Phenol/Cu 1:1) 50 % beträgt. Dieser Befund ist ein starker Beleg für einen Reaktionsverlauf unter Beteiligung eines zweikernigen Komplexes, wie er in Schema 3 dargestellt ist: Oxygenierung des Pheno-

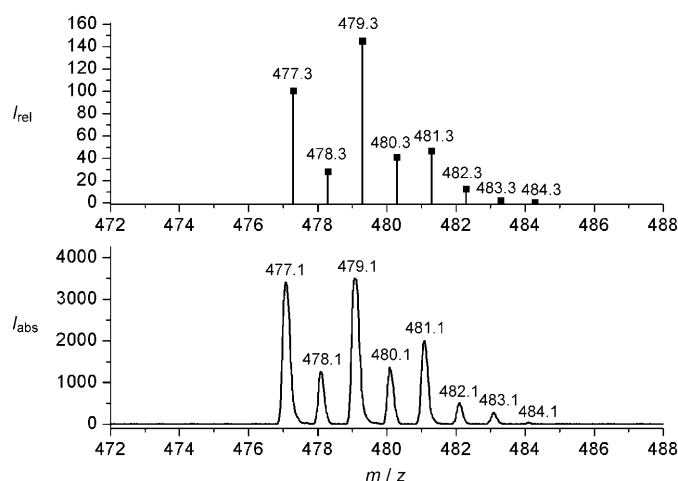
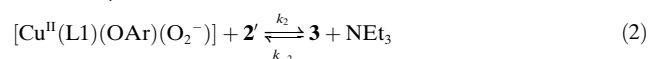
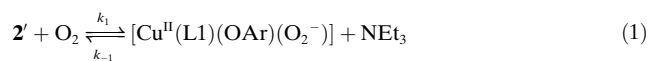


Abbildung 3. Hochaufgelöstes MALDI-TOF-Massenspektrum von **4'** (unten) und berechnetes Isotopenmuster für die beiden Fragmente von $[\mathbf{4'} + 6\text{H}]^{2+}$ (oben; siehe Text und die Hintergrundinformationen für nähere Erläuterungen).

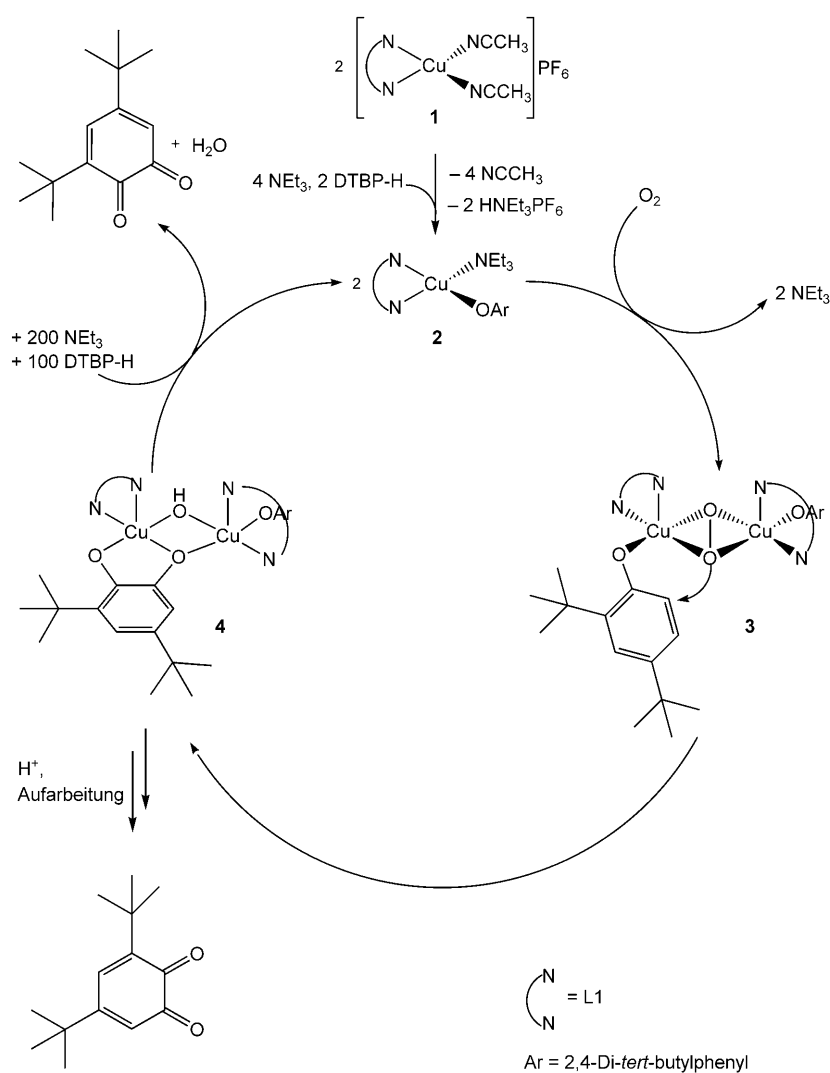
lato-Triethylamin- Cu^{I} -Komplexes **2** liefert zunächst den zweikernigen $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -Peroxo-Komplex **3** mit zwei Phenolatliganden. In diesem Komplex kann nur ein Phenolatligand hydroxyliert werden, was zu einem asymmetrisch verbrückten μ -Catecholato- μ -hydroxo-Komplex,^[33] Intermediat **4**, führt. Die Hydroxylierung wird dabei durch das σ^* -Orbital des koordinierten Peroxids vermittelt.^[16] Im stöchiometrischen Modus ist die Reaktion auf der Stufe von **4** beendet. Ein weiteres wichtiges Resultat ist die Tatsache, dass die Zugabe von DTBP-H/ NEt_3 im Überschuss zu **4** unter anaeroben Bedingungen zur Freisetzung des Substrats als Chinon führt (Schema 3 und Abbildung 2, Kurve c). Schließlich „springt“ die katalytische Aktivität des Systems durch Oxygenierung dieser Mischung wieder „an“, wie am Anwachsen der 407-nm-Bande von DTBQ mit der Zeit ersichtlich ist. Das lässt erkennen, dass sowohl Verbindung **2** als auch Intermediat **4** katalytisch kompetent sind.

Um weitere Informationen zum Mechanismus des Hydroxylierungsschritts zu erhalten, wurde die Umwandlung von **2'** in **4** auch kinetisch untersucht. Die Reaktionsfolge kann mit dem Kinetikschema (1)–(3) beschrieben werden (siehe Hintergrundinformationen).



Wenn der Superoxokomplex $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L1})(\text{OAr})(\text{O}_2^-)]$ wie auch der Peroxo-Komplex **3** hochreaktiv sind, können k_{-1} und k_{-2} als klein betrachtet werden im Vergleich zu k_1 , k_2 und k_3 , und die Produktbildung folgt dem Geschwindigkeitsgesetz (4).

$$\frac{d[\mathbf{4}]}{dt} = k_1[\mathbf{2'}]p(\text{O}_2) \quad (4)$$



Schema 3. Vorgeschlagener mechanistischer Zyklus für die Katalyse durch das Cu(L1)-System.

Dies wird auch experimentell beobachtet (Abbildung 2, Einschub), d. h., obwohl die Hydroxylierungsreaktion über zweikernige Intermediate verläuft, zeigt die Reaktionsgeschwindigkeit eine Abhängigkeit erster Ordnung von der Kupferkonzentration.^[27] Die beschriebene Kinetik erklärt zudem, warum kein Peroxo-Intermediate in unserem System nachgewiesen werden konnte.

Der abgeleitete Katalysezyklus (Schema 3) hat eine interessante Konsequenz in Bezug auf die enzymatische Reaktion. Es wird allgemein angenommen, dass die Phenole an die Oxy-Form der Tyrosinase binden.^[2] Es ist jedoch schwer zu verstehen, warum die Zugabe von (protoniertem) Phenol zu synthetischen zweikernigen Peroxokomplexen immer zu unphysiologischen Radikalkupplungsprodukten führt und die korrekte Hydroxylierungsreaktion nur nach Zugabe von (deprotonierten) Phenolaten beobachtet wird.^[34] Es stellt sich somit die Frage, ob Phenole im Enzym vor der Koordination an das Oxy-Zentrum deprotoniert werden. In der direkten Umgebung des zweikernigen Kupferzentrums ist jedoch keine Seitengruppe vorhanden, die diese Deprotonierung

bewirken könnte, abgesehen von einem nichtkoordinierten Histidinrest, der sich in der Sequenz unmittelbar neben einem an CuB koordinierten His-Rest (His215 bzw. His216 in *Streptomyces-castaneoglobisporus*-Tyrosinase) befindet.^[4,35] Wie dieser nichtkoordinierte Rest in einen Protonen-Shuttle mit dem aktiven Zentrum involviert sein könnte, ist jedoch unklar. Alternativ könnte das sich nähernde Phenolmolekül durch den Hydroxidligenanden des Catecholatintermediats unter Bildung von Wasser deprotoniert werden, wodurch die Bindung des Phenols und die Freisetzung des gebundenen Catecholats als Chinon gekoppelt wären (vgl. Schema 3). Ein entsprechender Mechanismus im Enzym würde erstens eine basische Aminosäure dicht am zweikernigen Kupferzentrum unter Turnoverbedingungen überflüssig machen und zweitens nahelegen, dass das Phenol unter diesen Bedingungen im Desoxy-Zustand bereits gebunden ist. Zur Zeit werden Versuche durchgeführt, um zu überprüfen, ob dieses alternative Szenario auf die Tyrosinase zutrifft.^[36]

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Cu(L1)/NEt₃-System das erste katalytische Tyrosinasemodell ist, das auf einem einkernigen Cu^I-Komplex basiert. Im stöchiometrischen Modus ermöglicht es, die beiden aufeinander folgenden Schritte der Tyrosinasereaktion, Phenolhydroxylierung und Produktfreisetzung als Chinon, schrittweise und kontrolliert durchzuführen. Die Kombination aus Pyridin- und Imindonoren stellte sich als essenziell für die katalytische Aktivität des Systems heraus, und eine Verbrückung der beiden zweizahnigen Liganden bewirkt eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit. Das Cu(L1)/NEt₃-System ermöglicht somit ein vollständiges mechanistisches Verständnis der Tyrosinasereaktion und sollte zu weiteren katalytischen Tyrosinasemodellen führen. Derzeit werden detaillierte spektroskopische und quantenchemische Studien durchgeführt, um weitere Einblicke in die Elementarschritte des beschriebenen Katalysezyklus zu erhalten.

Eingegangen am 16. Februar 2010,
veränderte Fassung am 2. Juni 2010
Online veröffentlicht am 22. Juli 2010

Stichwörter: Bioanorganische Chemie · Enzyme · Homogene Katalyse · Typ-3-Kupferproteine · Tyrosinasen

- [1] E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2563.
- [2] Á. Sánchez-Ferrer, J. N. Rodríguez-López, F. García-Cánovas, F. García-Carmona, *Biochim. Biophys. Acta Prot. Struct. Mol. Enzym.* **1995**, 1247, 1.

- [3] K. E. van Holde, K. I. Miller, H. Decker, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 15563.
- [4] Y. Matoba, T. Kumagai, A. Yamamoto, H. Yoshitsu, M. Sugiyama, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 8981.
- [5] H. Decker, T. Schweikardt, F. Tuczek, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 4658; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4546.
- [6] C. Eicken, C. Gerdemann, B. Krebs in *Handbook of Metalloproteins*, Vol. 2 (Hrsg.: A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt), Wiley, New York, **2001**, S. 1319.
- [7] L. Que, Jr., W. B. Tolman, *Nature* **2008**, 455, 333.
- [8] E. A. Lewis, W. B. Tolman, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 1047.
- [9] L. M. Mirica, X. Ottenwaelde, T. D. P. Stack, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 1013.
- [10] L. Q. Hatcher, K. D. Karlin, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, 9, 669.
- [11] G. Battaini, A. Granata, E. Monzani, M. Gullotti, L. Casella, *Adv. Inorg. Chem.* **2006**, 58, 185.
- [12] S. Itoh in *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Vol. 8 (Hrsg.: L. Que, Jr., W. B. Tolman), Elsevier, Amsterdam, **2004**, S. 369.
- [13] K. D. Karlin, J. C. Hayes, Y. Gultneh, R. W. Cruse, J. W. Mckown, J. P. Hutchinson, J. Zubieta, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 2121.
- [14] P. L. Holland, K. R. Rodgers, W. B. Tolman, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1210; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1139.
- [15] H. Ohi, Y. Tachi, S. Itoh, *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 10825.
- [16] O. Sander, A. Henss, C. Näther, C. Würtele, M. C. Holthausen, S. Schindler, F. Tuczek, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 9714.
- [17] K. D. Karlin, S. Kaderli, A. D. Zuberbühler, *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 139.
- [18] L. Casella, M. Gullotti, R. Radaelli, P. Digennaro, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1611.
- [19] L. M. Mirica, M. Vance, D. J. Rudd, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, T. D. P. Stack, *Science* **2005**, 308, 1890.
- [20] S. Itoh, H. Kumei, M. Taki, S. Nagatomo, T. Kitagawa, S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6708.
- [21] M. Réglie, C. Jorand, B. Waegell, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1752.
- [22] S. Palavicini, A. Granata, E. Monzani, L. Casella, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 18031.
- [23] B. T. Op't Holt, M. A. Vance, L. M. Mirica, D. E. Heppner, T. D. P. Stack, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 6421.
- [24] A. Company, S. Palavicini, I. Garcia-Bosch, R. Mas-Ballesté, L. Que, Jr., E. V. Rybak-Akimova, L. Casella, X. Ribas, M. Costas, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 3535.
- [25] J. E. Bulkowski, US patent 4545937, **1984**.
- [26] M. Réglie, E. Amadé, E. H. Alilou, F. Eydoux, M. Pierrot, B. Waegell in *Bioinorganic Chemistry of Copper* (Hrsg.: K. D. Karlin, Z. Tyeklár), Chapman & Hall, London, **1993**, S. 348.
- [27] G. Battaini, M. De Carolis, E. Monzani, F. Tuczek, L. Casella, *Chem. Commun.* **2003**, 726.
- [28] A. J. Canty, N. J. Minchin, *Aust. J. Chem.* **1986**, 39, 1063.
- [29] G. J. H. Buisman, P. C. J. Kamer, P. W. N. M. van Leeuwen, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 1625.
- [30] Es ist bekannt, dass die DTBP-H-Kupplung in Gegenwart von CuCl₂ und Amin abläuft (Lit. [29]) und somit durch die Zugabe von HCl und nicht durch die katalytische Reaktion verursacht wird.
- [31] L. Casella, E. Monzani, *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 7516.
- [32] Das Catecholat wird durch die Protonen der Salzsäure in das Chinon überführt.
- [33] T. Plenge, R. Dillinger, L. Santagostini, L. Casella, F. Tuczek, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2003**, 629, 2258.
- [34] T. Osako, K. Ohkubo, M. Taki, Y. Tachi, S. Fukuzumi, S. Itoh, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11027.
- [35] Für Glu236 in *Ipomoea-batatas*-Catecholoxidase wurde ebenfalls eine Rolle in der Deprotonierung des Substrats vorgeschlagen: C. Eicken, C. Krebs, J. C. Sacchettini, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 677.
- [36] H. Decker, F. Tuczek, unveröffentlichte Ergebnisse.