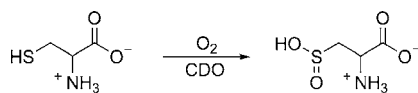


Ein Trispyrazolylborato-Eisen-Cysteinato-Komplex als funktionelles Modell für die Cystein-Dioxygenase**

Madleen Sallmann, Inke Siewert, Lea Fohlmeister, Christian Limberg* und Christina Knispel

Während in den letzten Jahrzehnten die Funktionen vieler oxygenierender Nicht-Häm-Eisenenzyme erfolgreich mit molekularen Modellverbindungen nachempfunden werden konnten,^[1] gibt es in der Literatur bislang kaum Berichte zu biomimetischen Modellen für die Cystein-Dioxygenase (CDO), deren Struktur seit 2006 bekannt ist.^[2] Das Enzym katalysiert die Oxidation von Cystein mithilfe von molekularem Sauerstoff zu Cysteinsulfinsäure, die zum Aufbau zentraler Stoffwechselprodukte im menschlichen Organismus benötigt wird (Schema 1).^[3]



Schema 1. Oxidation von Cystein zu Cysteinsulfinsäure, katalysiert durch die CDO.

Im Unterschied zu anderen einkernigen Nicht-Häm-Eisen-Dioxygenasen, deren aktive Zentren typischerweise Eisenionen mit einer 2-Histidin-1-Carboxylat-Koordination enthalten,^[1a] weist die CDO ein dreifach Histidin-gebundenes Eisenzentrum auf.^[3] An dieser Einheit koordiniert das Substrat Cystein über das Schwefelatom und das Stickstoffatom, sodass für das Eisen(II)-Ion eine pentagonale Koordinationssphäre resultiert. Der genaue Mechanismus der Cystein-oxidation wird noch immer kontrovers diskutiert,^[4] allerdings wird eine einleitende „End-on“-Koordination und Aktivierung von Disauerstoff am Eisen(II)-Ion allgemein akzeptiert.

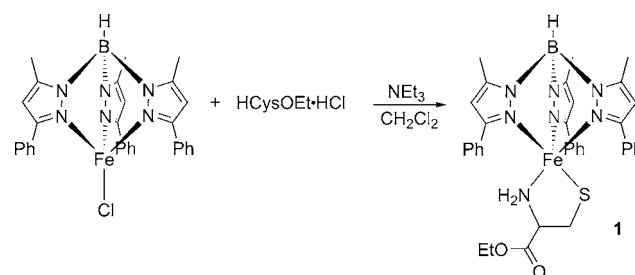
Bei Versuchen zur Modellierung der CDO-Funktion durch Umsetzung von Fe^{II}-SR-Komplexen mit O₂ wurde häufig die Bildung von Fe^{III}-O-Fe^{III}-Verbindungen anstelle von oxygenierten schwefelhaltigen Spezies beobachtet.^[5] Im Jahr 2010 zeigten Goldberg et al. zum ersten Mal, dass in einer angemessenen Ligandenumgebung Fe^{II}-SR-Verbindungen mit O₂ selektiv unter S-Oxygenierung reagieren können, wobei die SR-Funktion in dem beschriebenen Beispiel Teil

des verwendeten Ligandsystems (mit einem Bis(imino)pyridin(BIP)-Gerüst) war und am Ende dreifach oxygeniert wurde.^[5a] Folgestudien zeigten, dass unter Verwendung von BIP auch die S-Oxidation von terminalen, nichtverhenkelten Thiolatliganden gelingt.^[6] Erwähnenswert sind darüber hinaus Modellstudien mit Cyclam-Eisen-Thiolat-Komplexen und Persäuren als Oxidationsmittel, die – ebenfalls 2010 – gezeigt haben, dass ein Eisen(IV)-Oxo-Intermediat^[4b] im Katalysemechanismus der CDO plausibel ist.^[7]

Wir berichten hier über die erfolgreiche Koordination und Dioxygenierung eines geschützten Cysteinato-Liganden an einem (His)₃Fe^{II}-Analogon und damit über das bislang realistischste biomimetische Modellsystem für die CDO.

Zur Simulation der (His)₃-Koordinationsphäre am Fe-Zentrum der CDO haben wir das gut bekannte Trispyrazolylborat-Ligandsystem gewählt, mit dem in der Vergangenheit bereits erfolgreich oxygenierende Eisenenzyme modelliert werden konnten.^[8] Um eine schützende Reaktionskapsel zu kreieren, wie sie auch von Enzymen genutzt wird, und um ferner die Bildung von Fe-O-Fe-Einheiten zu verhindern, schienen Phenylreste an den 3-Positionen der Pyrazolateinheiten vorteilhaft. Eine geeignete Ausgangsverbindung stellte somit der Komplex [Tp^{Me,Ph}FeCl] (Tp^{Me,Ph} = Hydridotris(3-phenyl-5-methylpyrazol-1-yl)borato)^[9] dar, der gelöst in Dichlormethan mit L-Cysteinethylester-Hydrochlorid (L-HCysOEt·HCl) in Gegenwart von Triethylamin umgesetzt wurde. Nach Aufarbeitung der Reaktionsmischung konnte der Cysteinato-Komplex [Tp^{Me,Ph}FeCysOEt] (**1**) in einer Ausbeute von 65 % enantiomerenrein isoliert werden (Schema 2).

1 kristallisiert aus CH₂Cl₂ in der chiralen Raumgruppe P2₁, und die Molekülstruktur ist in Abbildung 1 dargestellt. Wie in der Struktur des Substratkomplexes der CDO^[2b] bindet die Cysteinato-Einheit chelatisierend, sodass sich die unmittelbaren Koordinationssphären der Fe-Zentren in der CDO und in **1** sehr ähneln (Abbildung 2). Das Eisen(II)-Ion in **1** ist verzerrt trigonal-bipyramidal ($\tau = 0.68$, zum Vergleich $\tau_{\text{CDO}} = 0.71$) von den drei N-Atomen des Tp^{Me,Ph}-Liganden



Schema 2. Synthese von [Tp^{Me,Ph}FeCysOEt] (**1**).

[*] Dipl.-Chem. M. Sallmann, Dr. I. Siewert, Dipl.-Chem. L. Fohlmeister, Prof. Dr. C. Limberg, Dr. C. Knispel
Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Chemie
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
E-Mail: christian.limberg@chemie.hu-berlin.de
Homepage: <http://www.chemie.hu-berlin.de/aglimberg>

[**] Wir danken dem Fonds der Chemischen Industrie, dem BMBF und der Humboldt-Universität zu Berlin für die finanzielle Unterstützung, Prof. Dr. R. Stößer für die ESR-Untersuchungen und den Mitgliedern des Exzellenzclusters „Unifying Concepts in Catalysis“ für die hilfreichen Diskussionen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201107345> zu finden.

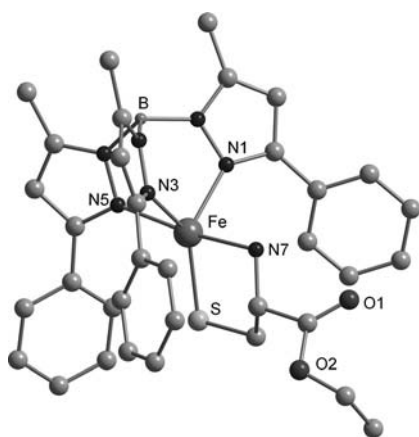


Abbildung 1. Molekülstruktur von **1** im Festkörper (alle Wasserstoffatome wurden zur besseren Übersicht weggelassen). Ausgewählte Bindungslängen [Å] und -winkel [°]: Fe-S 2.3122(8), Fe-N7 2.290(3), Fe-N1 2.106(2), Fe-N3 2.112(2), Fe-N5 2.275(2); S-Fe-N7 84.33(7).

sowie den Amin- und Thiolatfunktionen des an der Thiol-einheit deprotonierten Cysteinthylesters koordiniert.

Die Fe-S- und Fe-N7-Bindungen in **1** sind mit 2.3122(3) Å und 2.290(3) Å etwas länger als diejenigen im Substratkomplex der CDO (Fe-S 2.0202 Å und Fe-N 2.0302 Å).^[2b]

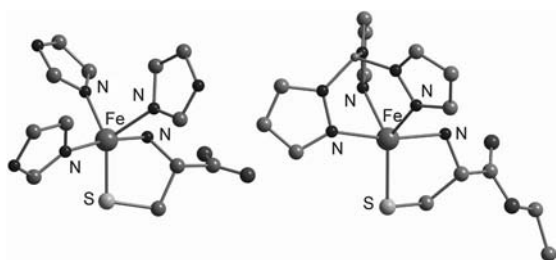


Abbildung 2. Vergleich der unmittelbaren Koordinationssphären der Eisen-Zentren im Substratkomplex der CDO (links) und in **1** (rechts). (Die Proteinumgebung sowie die Substituenten am Tp-Liganden wurden zur besseren Übersicht weggelassen.)

Versetzt man eine Lösung von **1** in Dichlormethan unter wasserfreien Bedingungen mit Disauerstoff, so kann ein langsamer Farbwechsel von Hellgelb zu Dunkelgrün beobachtet werden; dabei verschwindet im UV/Vis-Spektrum eine Bande bei 356 nm, die einem Schwefel→Eisen(II)-Charge-Transfer-Übergang zuzuordnen ist, innerhalb von 7.5 h. Eine ESI-TOF-Analyse der Reaktionslösung nach 12 h Rühren zeigte einen intensiven Peak bei m/z 742.19, welcher sich dem Natrium-Addukt des zweifach oxygenierten Komplexes, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Tp}^{\text{Me,Ph}}\text{CysOEt} + \text{O}_2) + \text{Na}]^+$, zuordnen lässt (Abbildung 3). Daneben konnten Peaks mit geringen Intensitäten bei m/z 719.19 und 758.19 für das zweifach oxygenierte Kation $[\text{Fe}(\text{Tp}^{\text{Me,Ph}}\text{CysOEt} + \text{O}_2)]^+$ selbst bzw. für das entsprechende Kalium-Addukt $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Tp}^{\text{Me,Ph}}\text{CysOEt} + \text{O}_2) + \text{K}]^+$ beobachtet werden. Außerdem zeigte sich ein intensiver Peak bei m/z 1258.38. Dieser wird vermutlich durch einen Eisenkomplex $[\text{Fe}^{\text{II}}_2(\text{Tp}^{\text{Me,Ph}})_2\text{CysOEt} + \text{O}_2]$ hervorgerufen, der sich bei der O_2 -Umsetzung in einer Neben- oder Folgereak-

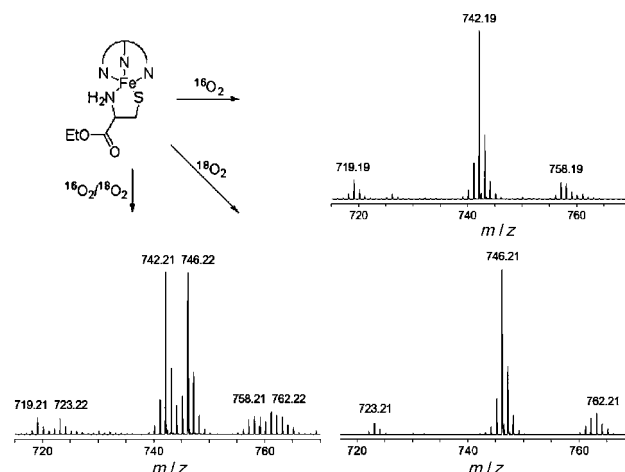


Abbildung 3. ESI-TOF-Spektren der Umsetzung von **1** mit $^{16}\text{O}_2$ (oben rechts), $^{18}\text{O}_2$ (unten rechts) und dem Isotopengemisch $^{16}\text{O}_2/^{18}\text{O}_2$ (unten links).

tion bildet und möglicherweise einen verbrückenden dioxygenierten CysOEt-Liganden enthält. Um diese Zuordnungen zu bestätigen, wurden zudem Experimente mit ^{18}O -angereichertem Disauerstoff (99 %) durchgeführt. Die anschließende Analyse der Reaktionslösung zeigte im ESI-TOF-Spektrum eine Verschiebung des $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Tp}^{\text{Me,Ph}}\text{CysOEt} + \text{O}_2) + \text{Na}]^+$ -Peaks um vier Masseneinheiten auf m/z 746.21, was darauf hinweist, dass im Zuge der Umsetzung mit O_2 zwei O-Atome in **1** eingebaut werden, dass also eine Dioxygenierung stattfindet (Abbildung 3). Auch alle anderen Peaks verschoben sich entsprechend um vier Masseneinheiten, wie aufgrund der Zuordnung zu erwarten war.

Um zu bestätigen, dass hierbei beide O-Atome von ein und demselben O_2 -Molekül stammen, wurde außerdem eine Reaktion von **1** mit einem $^{16}\text{O}_2/^{18}\text{O}_2$ -Gemisch (ca. 50:50) durchgeführt. Danach wurden im ESI-TOF-Spektrum intensive Peaks bei m/z 742.21 und bei 746.22 beobachtet, welche den jeweiligen isotonenreinen zweifach oxygenierten Komplexkationen $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Tp}^{\text{Me,Ph}}\text{CysOEt} + ^{16}\text{O}^{16}\text{O}) + \text{Na}]^+$ und $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Tp}^{\text{Me,Ph}}\text{CysOEt} + ^{18}\text{O}^{18}\text{O}) + \text{Na}]^+$ entsprechen (Abbildung 3). Ein Signal für das Isotopolog $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Tp}^{\text{Me,Ph}}\text{CysOEt} + ^{16}\text{O}^{18}\text{O}) + \text{Na}]^+$ mit jeweils einem ^{16}O - und einem ^{18}O -Atom wurde nicht beobachtet, woraus gefolgert werden kann, dass jeweils beide O-Atome eines O_2 -Moleküls auf genau ein Komplexmolekül übertragen werden.

Der Verlauf der Reaktion wurde über ^1H -NMR-Spektroskopie verfolgt. Die Pyrazol-4-*H*-Resonanz des $\text{Tp}^{\text{Me,Ph}}$ -Liganden von **1** erscheint als breites, paramagnetisch verschobenes Signal bei 51 ppm. Nach der Zugabe von O_2 nimmt dieses Signal zugunsten eines neuen Signals bei 54 ppm an Intensität ab. Nach 8 h zeigt sich dann bereits eine deutliche Zunahme der Produktkonzentration im Verhältnis zum Ausgangskomplex. Zudem ist die Bildung eines zweiten, kleineren Produktsignals bei 57 ppm zu beobachten, das seinen Ursprung in dem bereits erwähnten Eisen-Nebenprodukt haben könnte. Nach einer Reaktionszeit von 14 h sind nur noch Signale der beiden Produkte auszumachen (Abbildung 4).

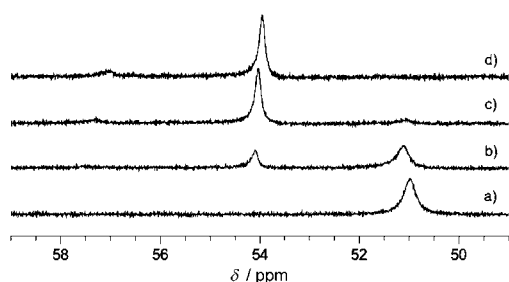


Abbildung 4. ^1H -NMR-spektroskopische Veränderungen, die sich im Verlauf der Umsetzung von **1** (a) in $[\text{D}_2]$ Dichlormethan mit O_2 nach 2 h (b), 8 h (c) und 14 h (d) ergeben.

Aus diesen Resultaten ist (im Einklang mit den ESI-TOF-Ergebnissen) zu folgern, dass die Reaktionsprodukte am Ende größtenteils Fe^{II} enthalten, und tatsächlich zeigt ein ESR-Spektrum der Reaktionslösung bei 77 K nur ein schwaches Signal für High-spin- Fe^{III} ($g = 4.3$). Durch Doppelintegration konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an Fe^{III} -Ionen weniger als 2% der Gesamtkonzentration an Eisen ausmacht.

Aufgrund der Zersetzlichkeit des Hauptproduktes gelang es nicht, Einkristalle für eine kristallstrukturanalytische Charakterisierung zu züchten.

Um zu belegen, dass die Dioxygenierung selektiv am Cysteinato-Liganden stattfindet, wurde ein Aufarbeitungsverfahren für die Reaktionsansätze entwickelt, das am Ende die Isolierung des Cysteinat-Teils des Reaktionsproduktes ermöglichte. Dabei musste zwischen vier Verbindungen unterschieden werden: Bei selektiver Oxygenierung des Tp-Liganden wird HCysOEt isoliert werden, während eine selektive Oxygenierung des Cysteinato-Liganden zur Sulfinsäure führt. Ferner musste mit zwei weiteren Produkten gerechnet werden, wenngleich diese nicht im Einklang mit den ESI-TOF-Ergebnissen stehen: Eine S-S-Bindungsknüpfung, wie sie häufig bei Koordination von Thiolaten an hochoxidierten Metallzentren beobachtet wird, führt zum Disulfid (Cystin), eine Dreifach-Oxygenierung – wie im Falle der literaturbekannten Modelle^[5a,6] – zur Cysteinsäure (Schema 3).

Das ^1H -NMR-Spektrum des aufgearbeiteten Reaktionsproduktes deckt sich, verglichen mit den Spektren von L-Cysteinethylester, L-Cystinethylester, L-Cysteinsäure-Monohydrat und L-Cysteinsulfinsäure (Abbildung 5), am besten mit demjenigen von L-Cysteinsulfinsäure. Naturgemäß führt

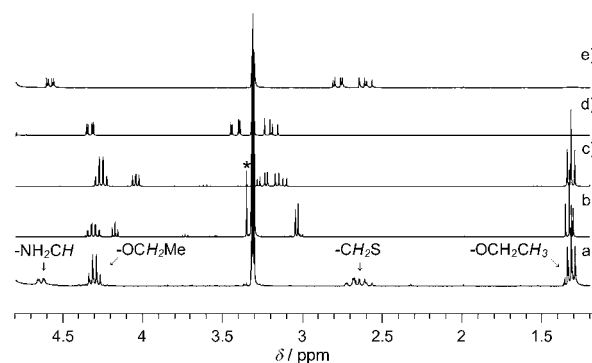


Abbildung 5. Vergleich des ^1H -NMR-Spektrums des isolierten Oxidationsproduktes (a) mit den Spektren von L-Cysteinethylester (b), L-Cystinethylester (c), L-Cysteinsäure-Monohydrat (d) und L-Cysteinsulfinsäure (e), jeweils gelöst in $[\text{D}_4]$ Methanol. (Die Proben b–e wurden ausgehend von käuflich erhältlichen Substanzen hergestellt, wo nötig nach dem Entfernen von HCl aus dem entsprechenden Hydrochlorid; das mit * markierte Signal gehört zu restlichem Methanol.)

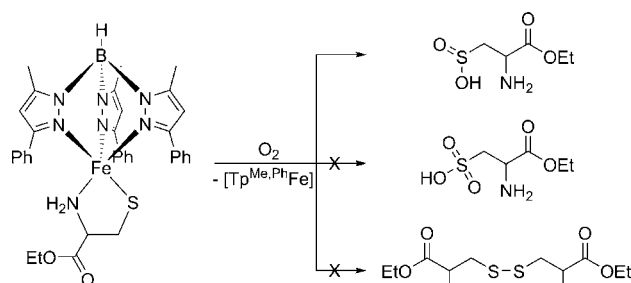
die Veresterung der Carbonsäurefunktion zu geringen Unterschieden sowie zu zwei zusätzlichen Signalen für die Ethylgruppe. Die Protonen der zur Schwefeleinheit benachbarten Methylengruppe weisen jedoch eine charakteristische Hochfeldverschiebung auf, wie sie sonst nur bei der Cysteinsulfinsäure zu beobachten ist. Dies lässt darauf schließen, dass sich, wie bei einer Dioxygenaseaktivität analog der Cystein-Dioxygenase zu erwarten, Cysteinsulfinsäureethylester gebildet hat.

Zusammenfassend stellt **1** also das bisher realistischste Modell für das aktive Zentrum der Cystein-Dioxygenase dar, denn es erfüllt zwei wichtige Kriterien: 1) Die strukturelle Ähnlichkeit: Der $\text{Tp}^{\text{Me,Ph}}$ -Ligand empfindet die His_3 -Koordinationsphäre des Fe^{II} -Zentrums hervorragend nach, und das Cysteinsubstrat wurde lediglich durch Veresterung leicht modifiziert. 2) Auch die Funktion wird simuliert: Die Umsetzung mit molekularem Sauerstoff führt zu Dioxygenaseaktivität, die mit Isotopenmarkierungsexperimenten nachgewiesen wurde. Zukünftige Studien werden zum Ziel haben, weitere strukturelle Informationen zum ursprünglichen Produkt sowie mechanistische Details zugänglich zu machen.

Eingegangen am 18. Oktober 2011

Online veröffentlicht am 27. Januar 2012

Stichwörter: Cystein-Dioxygenase · Eisen · Enzymmodelle · Sauerstoff · S-Oxygenierung



Schema 3. Die Reaktion von $[\text{Tp}^{\text{Me,Ph}}\text{FeCysOEt}]$ (**1**) mit O_2 und denkbare Alternativprodukte.

- [1] a) M. Costas, M. P. Mehn, M. P. Jensen, L. Que, Jr., *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 939–986; b) W. Nam, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 522–531; c) I. Siewert, C. Limberg, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10316–10328; d) S. Friedle, E. Reisner, S. J. Lippard, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2768–2779.
- [2] a) C. R. Simmons, Q. Liu, Q. Q. Huang, Q. Hao, T. P. Begley, P. A. Karplus, M. H. Stipanuk, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 18723–18733; b) S. Ye, X. Wu, L. Wei, D. Tang, P. Sun, M. Bartlam, Z. Rao, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 3391–3402.
- [3] A. Crisjoe, M. J. Maroney, *Chem. Commun.* **2007**, 3338–3349.

- [4] a) J. G. McCoy, L. J. Bailey, E. Bitto, C. A. Bingman, D. J. Aceti, B. G. Fox, G. N. Phillips, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 3084–3089; b) B. S. Pierce, J. D. Gardner, L. J. Bailey, T. C. Brunhold, B. G. Fox, *Biochemistry* **2007**, *46*, 8569–8578; c) S. Aluri, S. P. de Visser, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14846–14847; d) C. R. Simmons, K. Krishnamoorthy, S. L. Granett, D. J. Schuller, J. E. Dominy, Jr., T. P. Begley, M. H. Stipanuk, P. A. Karplus, *Biochemistry* **2008**, *47*, 11390–11392; e) S. P. de Visser, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 754–768; f) S. P. de Visser, G. D. Straganz, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 1835–1846; g) J. D. Gardner, B. S. Pierce, B. G. Fox, T. C. Brunold, *Biochemistry* **2010**, *49*, 6033–6041; h) D. Kumar, W. Thiel, S. P. De Visser, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3869–3882.
- [5] a) Y. Jiang, L. R. Widger, G. D. Kasper, M. A. Siegler, D. P. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12214–12215; b) G. Musie, C. H. Lai, J. H. Reibenspies, L. W. Sumner, M. Y. Darensbourg, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 4086–4093; c) R. M. Theisen, J. Shearer, W. Kaminsky, J. A. Kovacs, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 7682–7690.
- [6] Y. M. Badiei, M. A. Siegler, D. P. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1274–1277.
- [7] A. R. McDonald, M. R. Bukowski, E. R. Farquhar, T. A. Jackson, K. D. Koehntop, M. Sook Seo, R. F. De Hont, A. Stubna, J. A. Halfen, E. Münck, W. Nam, L. Que, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17118–17129.
- [8] a) W. H. Armstrong, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4837–4838; b) W. H. Armstrong, A. Spool, G. C. Papaefthymiou, R. B. Frankel, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3653–3667; c) E. H. Ha, R. Y. N. Ho, J. F. Kisiel, J. S. Valentine, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 2265–2266; d) S. Hikichi, T. Ogihara, K. Fujisawa, N. Kitajima, M. Akita, Y. Moro-oka, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 4539–4547; e) E. L. Hegg, R. Y. K. Ho, L. Que, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1972–1973; f) M. P. Mehn, K. Fujisawa, E. L. Hegg, L. Que, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7828–7842; g) T. K. Paine, H. Zheng, L. Que, Jr., *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 474–476; h) I. Siewert, C. Limberg, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8071–8074; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7953–7956; i) N. Burzlaff, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5688–5690; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5580–5582; j) A. Mukherjee, M. Martinho, E. D. Bominaar, E. Münck, L. Que, Jr., *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1812–1815; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1780–1783; k) S. Paria, L. Que, Jr., T. K. Paine, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11325–11328; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11129–11132.
- [9] T. Tietz, C. Limberg, R. Stöber, B. Ziemer, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 10010–10020.