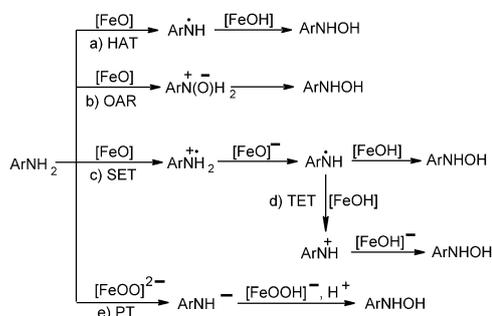


Modell und Mechanismus: N-Hydroxylierung primärer aromatischer Amine durch Cytochrom P450**

Li Ji und Gerrit Schüürmann*

Primäre aromatische Amine (PAA) werden für die Synthese verschiedener Produkte wie Pestizide, Pharmazeutika, Gummi, Azofarbstoffe, Epoxidharze und aromatische Polyurethane eingesetzt und sind daher von beträchtlichem industriellem Interesse.^[1] Zugleich verfügen sie über ein mutagenes und kanzerogenes Potential, welches durch die mit Cytochrom P450 katalysierte N-Hydroxylierung induziert wird.^[2] Die zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen sind allerdings immer noch Gegenstand kontroverser Debatten. Bislang werden für den Katalysemechanismus vier Reaktionspfade mit dem Compound I (Cpd I)^[3] genannten Eisen-Oxo-Komplex $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}$ und ein Reaktionsweg mit der Peroxo-Dianion-Einheit $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^{2-}$ ^[4] diskutiert (vgl. Schema 1): a) H-Atom-Transfer (HAT) mit einer H-Abstraktion vom Amin-N durch den FeO-Sauerstoff, gefolgt von einer radikalischen Rekombination (rebound) zur Bildung des aromatischen Hydroxylamins ArNHOH ; b) Sauerstoff-Addition mit anschließender Umlagerung (OAR = oxygen addition rearrangement), wobei der FeO-Sauerstoff an das freie Elektronenpaar vom Amin-N addiert und dann durch Umlagerung ArNHOH gebildet wird; c) Ein-Elektron-Transfer (SET = single-electron transfer) vom Amin zum FeO mit nachfolgendem Protonentransfer und abschließender Rekombination des intermediären Aminyl-Radikals mit FeOH; d) Zwei-Elektronen-Transfer (TET = two-electron transfer), wovon in Schema 1 nur die Variante mit der maximalen Anzahl von Elementarschritten (SET + Protonentransfer + SET + Rekombination) gezeigt wird; e) Protonentransfer (PT) zur Bildung des Ferri-Hydroperoxid-Komplexes FeOOH^- (Cpd 0) und von ArNH^- , woraus nach Protonierung ArNHOH entsteht.

Computerchemische Analysen der enzymatischen Katalyse wie der P450-Oxygenierung haben neuen Einblicke in die Abhängigkeit der Reaktivität von der Elektronenstruktur geliefert und damit experimentelle Befunde ergänzt.^[5] Frü-



Schema 1. Alternative Mechanismen für die N-Hydroxylierung primärer aromatischer Amine mit P450. HAT: H-Atom-Transfer; OAR: Sauerstoff-Addition mit anschließender Umlagerung; SET: Ein-Elektron-Transfer; TET: Zwei-Elektronen-Transfer; PT: Protonentransfer.

here Untersuchungen der P450-Katalyse betrafen die Hydroxylierung von C-H-Bindungen,^[6] die Epoxidierung von C=C-Bindungen^[7] und die Oxidation von Heteroatomen.^[8] Dabei wurde gezeigt, dass bei Cpd I im aktiven Zentrum von P450 der Quartett- (HS = high spin) und der Dublett-Zustand (LS = low spin) energetisch nahe beieinander liegen und zu verschiedenen Reaktionen in unterschiedlicher Weise beitragen.^[5] Bislang allerdings ist der Mechanismus der PAA-Hydroxylierung unklar, und zwar sowohl was die mögliche energetische Präferenz eines der fünf oben genannten Reaktionspfade anbelangt als auch im Hinblick auf die Frage, ob einer oder mehrere Spinzustände an dieser toxikologisch wichtigen metabolischen Umwandlung beteiligt sind.

Zur Klärung dieser Fragen haben wir Rechnungen mit der Dichtefunktionaltheorie (DFT) mit Gaussian03^[9] ohne und mit simulierter Solvation (PCM = polarized continuum-solvation model; vgl. Abschnitt Methoden) durchgeführt. Hierbei diente der sechsfach koordinierte Oxoferryl(IV)-Porphyrin-Komplex $\text{Fe}^{4+}\text{O}^{2-}(\text{Por})^-(\text{SH})^-$ (Por = Porphyrin = $\text{C}_{20}\text{N}_4\text{H}_{12}$) als Modell für Cpd I^[5,10] und $\text{Fe}^{3+}\text{OO}^{2-}(\text{Por})^{2-}\text{SH}^-$ als Modell für die Peroxo-Dianion-Base, aus welcher im katalytischen Zyklus Cpd 0 (Ferri(III)-Hydroperoxo-Komplex) als Vorläufer von Cpd I entsteht.^[5a] Vergleichsrechnungen mit COSMO^[11] als alternativem Kontinuum-Solvationsmodell in der Gaussian-CPCM-Variante ergaben dabei zu PCM sehr ähnliche Ergebnisse. Neben Anilin ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$) wurden drei *para*-substituierte Derivate (*p*-CN, *p*-Cl, *p*- $\text{CH}_3 \equiv$ *p*-Me) in die Rechnungen mit einbezogen, um Vergleiche mit experimentellen Daten zu ermöglichen.^[12]

Für die SET- und TET-Mechanismen mit Cpd I (Schema 1c und d) wurden die freien Aktivierungsbarrieren (ΔG^\ddagger) mithilfe der Marcus-Theorie^[13] berechnet (siehe Hintergrundinformationen; eine aufwendigere Alternative wäre die Kombination von Elektronentransfer-Kinetik und Dynamik

[*] L. Ji, Prof. Dr. G. Schüürmann
UFZ-Department Ökologische Chemie
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung
Permoserstraße 15, 04318 Leipzig (Deutschland)
und
Institut für Organische Chemie
Technische Universität Bergakademie Freiberg
Leipziger Straße 29, 09596 Freiberg (Deutschland)
E-Mail: gerrit.schuurmann@ufz.de

[**] Diese Arbeit wurde durch das China Scholarship Council (Nr. 2008619025) und das EU-Projekt OSIRIS (Nr. GOCE-CT-2007-037017) unterstützt. L. Ji dankt D. Wondrousch und R. Stüwe für technische Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201204116> erhältlich.

in Form beschränkter DFT-Simulationen^[14]). Im HS-/LS-Zustand betragen die SET- ΔG^\ddagger -Werte in kcalmol⁻¹ 248.6/242.5 für Anilin, 191.8/187.9 für *p*-Me-Anilin, 223.5/219.0 für *p*-Cl-Anilin und 272.1/266.2 für *p*-CN-Anilin. Die entsprechenden TET- ΔG^\ddagger -Werte lauten 248.6/242.5 (Anilin), 191.8/187.9 (*p*-Me), 223.5/219.0 (*p*-Cl) und 272.1/266.2 (*p*-CN). Aufgrund dieser sehr großen Aktivierungsbarrieren kann der Elektronentransfer als P450-Katalysenmechanismus für die N-Hydroxylierung primärer aromatischer Amine ausgeschlossen werden.

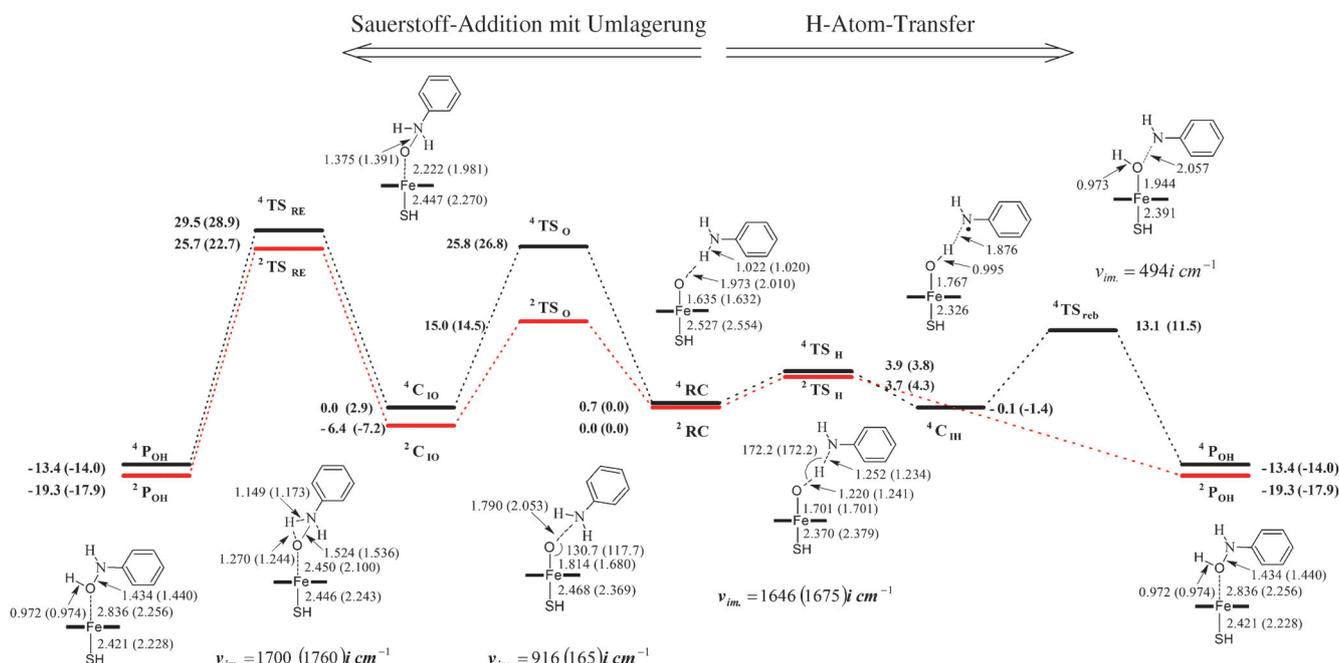
Diese Schlussfolgerung wird gestützt durch die experimentelle Beobachtung, dass die Geschwindigkeiten von NADPH-Verbrauch und Hydroxylamin-Bildung bei diesen Anilinen nicht signifikant mit der *para*-Hammett-Konstante^[22] korrelieren; im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt findet also offenbar keine substantielle Ladungsanhäufung statt. Weiterhin betragen die experimentellen^[15] Ionisationspotentiale (IP) von Anilin und seinen *p*-Me-, *p*-Cl- und *p*-CN-Derivaten 7.73, 7.85, 7.80 bzw. 8.64 eV im Vergleich zur viel niedrigeren Elektronenaffinität (EA) von Cpd I von nur 3.06 eV.^[16] Für das Anilinradikal (C₆H₅NH[•]) und die *p*-substituierten Derivate liefern unsere DFT-Rechnungen vertikale IPs [eV] in der Gasphase von 8.05, 7.67 (*p*-Me), 7.97 (*p*-Cl) und 8.54 (*p*-CN) sowie eine vertikale EA von 2.58 eV für FeOH (Cpd I). Damit ist ein signifikanter Beitrag der SET- und TET-Reaktionspfade insgesamt sehr unwahrscheinlich.

Schema 2 zeigt die berechneten Energieprofile für die Reaktion von Cpd I mit Anilin nach den Mechanismen HAT und OAR (Schema 1a und b) zusammen mit geometrischen Details der relevanten molekularen Spezies. Ausgangspunkt sind die in der Mitte von Schema 2 dargestellten LS- und HS-

Reaktantkomplexe (^{2,4}RC) mit H-Brückenbindungen zwischen einem H vom Anilin-Stickstoff und dem Fe^{IV}O-Sauerstoff von Cpd I, von wo aus die HAT- und OAR-Reaktionswege nach rechts bzw. links fortschreiten. In den ^{2,4}RC-Spezies hat Cpd I eine berechnete Spindichte von etwa 2 für die FeO-Einheit und von etwa 1 für das Fragment Por + SH. Diese stimmen gut mit CASPT2/MM-Ergebnissen^[17] für das triradikaloide Fe^{IV} von Cpd I im HS- und LS-Zustand überein. Auf dem HS-HAT-Reaktionsweg führt eine kleine H-Abstraktionsbarriere (⁴T_{SH}) von 3.2 kcalmol⁻¹ in der PCM-simulierten Proteinumgebung (3.8 kcalmol⁻¹ in der Gasphase) zu einem Intermediat (⁴C_{IH}), dessen Eisen-Hydroxy-Komplex (PorFe^{IV}OH) einen geschlossenschaligen Porphyrinring (mit einer Spindichte von -0.12 im Gegensatz zu 0.44 im Reaktantkomplex ⁴RC, was einer Dominanz von Fe^{IV} über Fe^{III} im Intermediat ⁴C_{IH} entspricht)^[5a,18] und ein Anilinoradikal (ArNH[•]) enthält. Nach einer nun beträchtlichen Barriere für den Übergangszustand der Rekombination (⁴T_{re,b}, rebound) entsteht das Produkt (⁴P_{OH}) als Komplex von Porphyrin-Eisen (Por-Fe^{III}) und *N*-Hydroxylamin (ArNHOH). Die Höhe dieser HS-Barriere macht ⁴Cpd I zu einem trägen Oxidans und lässt eine wichtige Rolle des HS-Pfades beim HAT-Mechanismus unwahrscheinlich erscheinen.

Der entsprechende LS-Weg liefert ein qualitativ anderes Bild. Hier wird aus dem Reaktantkomplex (²RC) das Produkt (²P_{OH}) konzertiert gebildet, mit einer kleinen H-Abstraktionsbarriere (²T_{SH}) von 3.7 kcalmol⁻¹ (Proteinumgebung).

Es ist bemerkenswert, dass die HS-Barriere der Rekombination (⁴T_{re,b}) höher ist als die HS- und LS-Barrieren (⁴T_{SH} und ²T_{SH}) der vorherigen H-Abstraktion. Dies widerspricht dem Energieprofil der aliphatischen C-H-Hydroxylierung, wo



Schema 2. Energieprofile (UB3LYP/BSII//BSI) und geometrische Details [Längen in Å, Winkel in Grad, angegeben in der Reihenfolge HS (LS)] für die HAT- und OAR-N-Hydroxylierung von Anilin durch Cpd I im HS- und LS-Zustand. Energien (kcalmol⁻¹) sind relativ zum ²RC mit PCM ($\epsilon = 5.6$) + ZPE angegeben (Gasphasenwerte in Klammern). ^{4,2}RC = Quartett- und Dublett-Reaktantkomplex, TS_H = Übergangszustand der H-Abstraktion, C_{IH} = intermediärer Komplex mit H abstrahiert durch Cpd I, TS_{re,b} = Übergangszustand der Rekombination (rebound), TS_O = Übergangszustand der O-Addition, C_{IO} = intermediärer N-Oxid-Komplex, TS_{RE} = Übergangszustand der H-Umlagerung, P_{OH} = N-Hydroxylamin-Produktkomplex. Für die Übergangszustände sind die imaginären Frequenzen mit angegeben.

${}^4\text{TS}_{\text{reb}}$ stets viel tiefer war als ${}^4\text{T}_{\text{SH}}$ und ${}^2\text{T}_{\text{SH}}$.^[5a] Nach unserer Kenntnis wurde die bisher größte Rekombinationsbarriere einer C-H-Hydroxylierung beim HS-Reaktionspfad der α -CH-Hydroxylierung von *N*-Nitrosodimethylamin erhalten ($11.2 \text{ kcal mol}^{-1}$),^[18] welche allerdings noch erheblich kleiner war als die entsprechende spingemittelte H-Abstraktionsbarriere ($16.6 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Für die *p*-substituierten Anilinderivate sind die entsprechenden Reaktionsbarrieren der N-H-Abstraktion (${}^4\text{T}_{\text{SH}}$, ${}^2\text{T}_{\text{SH}}$) und Rekombination (${}^4\text{TS}_{\text{reb}}$) in Tabelle 1 zusammengefasst (gemeinsam mit den zugehörigen Anilinwerten). Wie bei Anilin ist die HS-Barriere der Rekombination viel größer als die LS-Barriere der H-Abstraktion, welche ihrerseits etwas oberhalb der entsprechenden HS-Barriere ist. Damit trägt beim HAT-Mechanismus nur der LS-Weg wesentlich zur N-Hydroxylierung primärer aromatischer Amine bei. Weiterhin steigt mit zunehmender Elektronenakzeptorstärke des Anilin-Substituenten (Hammett-Konstante σ_{para} von -0.17 für Me bis 0.66 für CN) die H-Abstraktionsbarriere für HS und LS und liefert hierfür eine gute Korrelation mit $r^2 = 0.987$ (ΔE^\ddagger (spingemittelt, PCM) = $8.736 \sigma_{\text{para}} + 2.934$).

Für eine mögliche experimentelle Prüfung des HAT haben wir den kinetischen Isotopeneffekt (KIE) nach dem semiklassischen Eyring-Modell und seiner Wigner-Korrektur^[6b] berechnet (siehe Hintergrundinformationen) mit Ergebnissen von 5.8 und 8.0 (${}^2\text{T}_{\text{SH}}$) sowie von 5.7 und 7.8 (${}^4\text{T}_{\text{SH}}$). Dabei kann der HAT auch als besonders einfacher Fall eines PCET (protonengekoppelter Elektronentransfer) aufgefasst werden.^[19] Hingegen wäre der konsekutive PT-ET-Mechanismus stark endotherm mit etwa 55 kcal mol^{-1} für den anfänglichen Protonentransfer (PCM, $\epsilon = 5.62$) und kann außerdem wegen der sehr großen ET-Barriere (siehe oben) ausgeschlossen werden.

Das Energieprofil des alternativen OAR-Reaktionsweges der N-Hydroxylierung ist im linken Teil von Schema 2 dargestellt. Hier ist die anfängliche Sauerstoff-Addition an das freie Elektronenpaar vom Amin-Stickstoff im LS-Zustand (${}^2\text{TS}_0$) um $10.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ (PCM-Proteinumgebung) günstiger als im HS-Zustand (${}^4\text{TS}_0$). Daher wird das intermediäre N-Oxid hauptsächlich im Dublett-Zustand (${}^2\text{C}_{10}$) gebildet,

was anderen Heteroatom-Oxidationen entspricht.^[8] Letzteres gilt auch für die Geometrien der Übergangszustände, wobei der Winkel Fe-O-N_{Anilin} deutlich größer ist für ${}^4\text{TS}_0$ (130.7°) als für ${}^2\text{TS}_0$ (117.7°).

Anschließend lagert sich das N-Oxid (${}^{4(2)}\text{C}_{10}$) zum Hydroxylamin-Produkt (${}^{4(2)}\text{P}_{\text{OH}}$) um. Die zugehörige Aktivierungsbarriere ist noch größer als für die vorherige O-Addition mit Werten von 32.1 und $29.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ im LS (${}^2\text{TS}_{\text{RE}}$) und HS (${}^4\text{TS}_{\text{RE}}$). Damit ist diese H-Umlagerung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der OAR-Reaktion, dessen Energiebarriere um mehr als 25 kcal mol^{-1} höher ist als die der H-Abstraktion, welche ihrerseits den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der HAT-Reaktion im LS-Zustand darstellt. Für die *p*-Me-, *p*-Cl- und *p*-CN-Derivate sind die entsprechenden Daten in Tabelle 1 zusammengefasst.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse zur N-Hydroxylierung primärer aromatischer Amine, dass der OAR-Weg nicht mit dem HAT-Weg konkurrieren kann, weil der Energiebedarf seines geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes um mehr als 20 kcal mol^{-1} größer ist. Ein weiterer Befund ist, dass der HAT-Weg eindeutig den LS-Zustand bevorzugt, weil dort keine nennenswerte Rekombinationsbarriere vorhanden ist; dies entspricht der C-H-Hydroxylierung von Alkanen^[5a] und von *N,N*-Dialkylnitrosaminen.^[18]

Um die mögliche Abhängigkeit der Rechenergebnisse von der Wahl der Funktionals B3LYP zu prüfen, haben wir für Anilin Vergleichsrechnungen mit B3PW91, BLYP, BP86, PBE, TPSS und B97D (mit Dispersionskorrektur)^[20] durchgeführt. Alle diese Funktionale liefern dasselbe qualitative Bild einschließlich einer klaren energetischen Präferenz für den HAT-Mechanismus im LS-Zustand (siehe Hintergrundinformationen) und stützen somit die genannten Schlussfolgerungen.

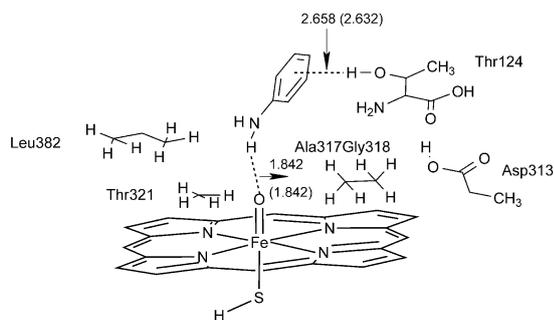
Kürzlich ist die Beteiligung von Cpd I an der N-Hydroxylierung primärer aromatischer Amine in Frage gestellt worden.^[4] Aufgrund geometrischer Beschränkungen durch eine H-Brückenbindung zwischen Thr-124 (Threonin) im aktiven Zentrum und dem Amino-N des Substrats sei nur für FeOO^{2-} eine reaktive Entfernung zum Substrat möglich. Entsprechend wurde ein Protonentransfer von ArNH_2 zu FeOO^{2-} als erster Schritt dieses alternativen N-Hydroxylierungsmechanismus vorgeschlagen (Schema 1e), was angesichts geeigneter Protonenaffinitäten (FeOO^{2-} : $422 \text{ kcal mol}^{-1}$, ArNH_2 : $350\text{--}390 \text{ kcal mol}^{-1}$) thermodynamisch gut möglich wäre.

Allerdings sind unsere Versuche der Lokalisierung eines entsprechenden PT-Übergangszustandes mit Reaktionsweg-Rechnungen – auch bei Hinzunahme einer expliziten Zwei-Wasser-Brücke – gescheitert. Stattdessen lieferte die Geometrieoptimierung von Cpd I mit Anilin in der Proteinumgebung von P450 1A2 unter Einbeziehung aller relevanten Aminosäurereste in der ersten Umgebungssphäre den in Schema 3 gezeigten Komplex. Dieser zeigt eine H-Brückenbindung zwischen Thr-124 und dem Anilin-Ring, was eine hinreichende Annäherung zwischen Anilin-N und Cpd I (Entfernung $\text{FeO}\cdots\text{H}_2\text{NAr} = 1.84 \text{ \AA}$) zur Auslösung der H-Abstraktion als erstem HAT-Schritt (Weg a in Schema 1 sowie rechte Seite von Schema 2) ermöglicht. Die so berechnete HAT-Barriere beträgt $3.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ im HS- und LS-

Tabelle 1: Aktivierungsenergien (in kcal mol^{-1}) für die HAT- und OAR-Reaktionen von Anilin und *p*-substituierten Anilinderivaten mit Cpd I von P450.^[a]

	Anilin	<i>p</i> -Me	<i>p</i> -Cl	<i>p</i> -CN
<i>UB3LYP/BSII//BSI + ZPE</i>				
${}^4\text{TS}_{\text{H}}/{}^2\text{TS}_{\text{H}}$	3.8/4.3	2.1/2.5	4.3/4.8	7.3/8.1
${}^4\text{TS}_{\text{reb}}$	12.9	10.0	11.8	15.3
${}^4\text{TS}_0/{}^2\text{TS}_0$	26.8/14.5	25.8/13.6	27.9/15.9	31.1/19.4
${}^4\text{TS}_{\text{RE}}/{}^2\text{TS}_{\text{RE}}$	26.0/29.9	26.3/30.1	25.8/29.5	24.8/28.5
<i>UB3LYP/BSII//BSI + PCM-Solvation + ZPE</i>				
${}^4\text{TS}_{\text{H}}/{}^2\text{TS}_{\text{H}}$	3.2/3.7	0.8/1.4	4.7/4.9	8.5/8.8
${}^4\text{TS}_{\text{reb}}$	13.2	10.5	13.3	17.4
${}^4\text{TS}_0/{}^2\text{TS}_0$	25.1/15.0	23.9/14.0	26.5/16.9	30.3/20.6
${}^4\text{TS}_{\text{RE}}/{}^2\text{TS}_{\text{RE}}$	29.5/32.1	29.6/31.9	29.6/31.0	28.7/30.1

[a] BSI = Basissatz I: LACVP (Fe), 6-31G* (O-Atom am Fe, vier Pyrrol-N-Atome, Amino-N, Thiol-S), 6-31G (alle anderen Atome); BSII = Basissatz II: LACVP (Fe), 6-31 + G** (alle anderen Atome); PCM-Solvation mit $\epsilon = 5.62$ zur Simulation der Proteinumgebung.



Schema 3. Geometrieoptimierter Komplex von Cpd I und Anilin im aktiven Zentrum von P450 1A2. Geometrische Parameter (Längen in Å) sind in der Reihenfolge HS (LS) angegeben.

Zustand (PCM + ZPE) und ist somit den Ergebnissen ohne explizite Proteinumgebung ähnlich. Daraus folgt, dass Cpd I geometrisch verfügbar ist zur Katalyse der N-Hydroxylierung der PAA, und dass der oben diskutierte HAT-Mechanismus gegenüber allen bisher diskutierten Alternativen kinetisch bevorzugt ist.

Eine weitere Konsequenz unserer aktuellen Analyse betrifft die mögliche N-Oxid-Bildung während der P450-katalysierten Biotransformation primärer aromatischer Amine. Während bei Exposition mit tertiären Aminen N-Oxid-Metabolite in Lebermikrosomen gefunden wurden,^[21] sind uns keine entsprechenden Befunde für primäre Amine bekannt. Tatsächlich ermöglicht der recht kleine Unterschied zwischen den berechneten Aktivierungsenergien für die N-Oxid-Bildung und α -CH-Hydroxylierung tertiärer aliphatischer und aromatischer Amine (Trimethylamin: 2.90 und 4.45 kcal mol⁻¹,^[8b,c] *N,N*-Dimethylanilin: 6.09 kcal mol⁻¹^[8c]) eine Konkurrenz zwischen beiden Reaktionswegen. Demgegenüber zeigen unsere Ergebnisse, dass bei primären aromatischen Aminen die Reaktionsbarriere der O-Addition (als erstem Schritt des OAR-Mechanismus der N-Hydroxylierung) um ca. 12.5 kcal mol⁻¹ höher ist als für die H-Abstraktion (als erstem HAT-Schritt). Damit ist bei PAA die N-Oxid-Bildung wegen ihres zu großen Energiebedarfs im Vergleich zur alternativen H-Abstraktion wenig wahrscheinlich, was das Fehlen eines entsprechenden experimentellen N-Oxid-Nachweises erklärt.

Für die H-Abstraktion von Alkanen und beim α -C von *N,N*-Dialkylnitrosaminen als erstem Schritt ihrer P450-katalysierten C-H-Hydroxylierung korrelieren die berechneten (spingemittelten) Reaktionsbarrieren mit den C-H-Bindungsdissoziationsenergien (BDE) der isolierten Substrate.^[18,22] Ein ähnliches Bild ergibt sich für primäre aromatische Amine mit einer guten Korrelation zwischen ihren (spingemittelten) H-Abstraktionsbarrieren und elektrochemischen N-H-BDE-Werten^[23] ($r^2 = 0.9$). Damit sind BDE-Werte auch für PAA geeignet zur Abschätzung der Energiebarrieren ihrer P450-katalysierten H-Abstraktion vom Amin-N.

Im Vergleich zu Alkanen sowie zu benzylichem und allylischem C-H mit berechneten H-Abstraktionsbarrieren in kcal mol⁻¹ von 14–23, 13 (Toluol) und knapp unter 11 (Propen)^[22] ist der Energiebedarf der H-Abstraktion vom Anilin-N-H viel geringer mit einer spingemittelten Barriere von nur 3.5 kcal mol⁻¹ (vgl. Schema 2 und Tabelle 1). Letzte-

res passt gut zum experimentellen Befund, dass die metabolische Umwandlung von Anilinen zu den schnellsten P450-katalysierten Reaktionen gehört.^[24] Interessanterweise ist jedoch die H-Abstraktionsbarriere von Toluol viel größer als die von Anilin, obwohl die N-H-BDE von Anilin (89.1–92.3 kcal mol⁻¹)^[25] und die C-H-BDE von Toluol (87.9–90.4 kcal mol⁻¹)^[26] recht ähnlich sind. Eine erneute Berechnung der Toluol-HAT-Barriere mit der hier gewählten Methode liefert HS-(LS-)Werte mit und ohne PCM ($\epsilon = 5.62$) von 13.7 (11.8) und 12.7 (12.0) kcal mol⁻¹ und damit spingemittelt einen um 9.3 kcal mol⁻¹ (PCM) höheren Wert als für die Anilin-HAT-Barriere.

Warum ist Anilin so viel reaktiver für eine P450-katalysierte H-Abstraktion als Toluol, obwohl nach den BDE-Werten die H-Atome ähnlich stark gebunden sind? Eine mögliche Erklärung ergibt sich aus der Elektronenstruktur der entsprechenden HS-Übergangszustände (unter Berücksichtigung der Tatsache, dass mit DFT berechnete Elektronenstruktur-Details für LS-Zustände im Allgemeinen weniger zuverlässig sind):^[7a]

Erstens ist mit Anilin als P450-Substrat die Mulliken-Spindichte des entstehenden Anilinoradikals (PhNH[•]) im ⁴TS_H 0.78, aber nur 0.54 für das aus Toluol entstehende Benzylradikal (PhCH₂[•]), und die entsprechenden Werte für das Anilino-N und Benzyl-C lauten 0.46 und 0.43. Offenbar ist also bei Anilin der Phenylring viel stärker an der Reorganisation der Elektronenstruktur beteiligt und erleichtert damit die homolytische H-Abstraktion durch Stabilisierung des entstehenden Radikals.

Zweitens beträgt im ⁴TS_H der temporäre Elektronentransfer zu Cpd I 0.50 (NBO-Ladung) von Anilin, aber nur 0.29 von Toluol, und im anschließenden Intermediat-Komplex (⁴C_{1H}) nur noch 0.05 (Anilinoradikal) bzw. 0.01 (Benzylradikal). Durch das im Vergleich zu Toluol tiefere Ionisationspotential von Anilin (vertikal: 7.83 vs. 8.80 eV) ist dieses besser geeignet für eine solche HAT-Unterstützung. Obwohl also die SET- und TET-Wege der PAA-N-Hydroxylierung energetisch nicht praktikabel sind, wird der HAT-Weg anscheinend durch einen temporären Ladungstransfer unterstützt, was die ansonsten homolytische H-Abstraktion mechanistisch bereichert.

Im Vergleich zu PAA haben primäre aliphatische Amine höhere HAT-Barrieren und tiefere OAR-Barrieren.^[27] Letztere können mit der größeren Nucleophilie des aliphatischen N (z. B. NBO-Ladung Propan-2-amin vs. Anilin: -0.853 vs. -0.792) erklärt werden. Im Hinblick auf erstere liefert unsere Berechnung der HAT-Barriere für Propan-2-amin HS-(LS-)Werte mit und ohne PCM von 11.1 (11.3) und 9.5 (10.0) kcal mol⁻¹ (welche damit die entsprechenden Anilin-Werte deutlich übersteigen, vgl. Tabelle 1). Die im aliphatischen Radikal RNH[•] entstandene Spindichte ist – im Gegensatz zur Spin-Delokalisierung im Anilinoradikal (siehe oben) – hauptsächlich am N lokalisiert (0.73). Somit kann die starke Präferenz von PAA für den HAT-Mechanismus durch die aromatische Delokalisierung erklärt werden, während im Gegensatz dazu primäre aliphatische Amine für OAR und HAT ähnlich reaktiv sind.

Insgesamt zeigt unsere rechnerische Analyse der N-Hydroxylierung primärer aromatischer Amine, dass von den fünf

bislang diskutierten Reaktionsmechanismen^[3,4] die SET- und TET-Wege wegen sehr hoher Energiebarrieren von $>180 \text{ kcal mol}^{-1}$ praktisch unmöglich sind, und dass der OAR-Weg ebenfalls ausgeschlossen werden kann wegen einer geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsbarriere von ca. 30 kcal mol^{-1} im Vergleich zu $<9 \text{ kcal mol}^{-1}$ für den HAT-Weg. Weiterhin erscheint auch der kürzlich vorgeschlagene PT-Weg mit FeOO^{2-} weniger wahrscheinlich aus zwei Gründen: Zum einen ist die Protonenabgabe von ArNH_2 offenbar kinetisch stark gehemmt, und zum anderen ist Cpd I entgegen früherer Schlussfolgerungen^[4] geometrisch durchaus verfügbar für eine Reaktion mit PAA. Damit ist also der HAT-Mechanismus kinetisch gegenüber allen bisher vorgeschlagenen Alternativen bevorzugt und bietet im LS eine konzentrierte N-Hydroxylierung mit einem praktisch barrierefreien Rekombinationsschritt.

Methoden

Die DFT-Rechnungen erfolgten mit Gaussian03^[9] außer für das Funktional B97D, wo Gaussian09^[28] eingesetzt wurde. Cpd I vom aktiven P450-Zentrum wurde modelliert als sechsfach koordinierter triradikaloider Oxoferrylkomplex $\text{Fe}^{4+}\text{O}^{2-}(\text{C}_{20}\text{N}_4\text{H}_{12})^-(\text{SH})^- \equiv \text{FeO}$ mit $\text{C}_{20}\text{N}_4\text{H}_{12} = \text{Porphyrin} = \text{Por}$. Die Geometrieoptimierung erfolgte mit dem unbeschränkten B3LYP-Funktional und dem BSI genannten folgenden Basissatz: effektives Kernpotential plus LACVP (LanL2Dz) für Fe, 6-31G* für sieben weitere Heteroatome (O-Atom am Fe, vier Pyrrol-N-Atome, Amino-N, Thiol-S) und 6-31G für alle übrigen Atome. Genauere Energien wurden durch Einzelpunkt-Rechnungen mit LACVP für Fe und 6-31+G* für alle anderen Atome (BSII) erhalten. Die allgemeine Proteinumgebung wurde mit dem Kontinuum-Solvatationsmodell PCM ($\epsilon = 5.62$, Chlorbenzol) auf dem UB3LYP/BSI-Niveau simuliert. Die Nullpunktsenergie (ZPE) basiert auf UB3LYP/BSI-Frequenzrechnungen. Die IP-Berechnung erfolgte mit B3LYP/aug-cc-pVTZ//6-311++G**, und für die EA von $\text{FeOH}(\text{PorSH})$ wurde B3LYP/LACVP-6-31+G**//LACVP-6-31G eingesetzt. Für zusätzliche UB3LYP/LACVP-6-31G-Rechnungen mit Cpd I in der Proteinumgebung von P450 1A2 unter Einbeziehung der relevanten Aminosäurereste Thr-124, Asp-313, Ala-317, Gly-318, Thr-321 und Leu-382 der ersten Umgebungssphäre entsprechend der Kristallstruktur 2HI4 (PDB-Code) wurde deren strukturelle Zusammensetzung außer für Thr-124 vereinfacht wie in den Hintergrundinformationen angegeben.

Eingegangen am 27. Mai 2012,
veränderte Fassung am 4. August 2012
Online veröffentlicht am 21. November 2012

Stichwörter: Computerchemie · Cytochrom P450 · Enzymkatalyse · Reaktionsmechanismen · Wasserstofftransfer

- [1] a) J. L. Radomski, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1979**, *19*, 129–157; b) S. K. Mortensen, X. T. Trier, A. Foverskov, J. H. Petersen, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1091*, 40–50.
[2] D. Kim, F. P. Guengerich, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*, 27–49.
[3] a) G. J. Hammons, F. P. Guengerich, C. C. Weis, F. A. Beland, F. F. Kadlubar, *Cancer Res.* **1985**, *45*, 3578–3585; b) J. C. Sasaki, R. S. Fellers, M. E. Colvin, *Mutat. Res.* **2002**, *506–507*, 79–89.

- [4] I. Shamovsky, L. Ripa, L. Borjesson, C. Mee, B. Norden, P. Hansen, C. Hasselgren, M. O'Donovan, P. Sjo, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16168–16185.
[5] a) S. Shaik, D. Kumar, S. P. de Visser, A. Altun, W. Thiel, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2279–2328; b) S. Shaik, S. Cohen, Y. Wang, H. Chen, D. Kumar, W. Thiel, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 949–1017.
[6] a) F. Ogliaro, N. Harris, S. Cohen, M. Filatov, S. P. de Visser, S. Shaik, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8977–8989; b) S. P. de Visser, F. Ogliaro, P. K. Sharma, S. Shaik, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11809–11826; c) C. Li, W. Wu, D. Kumar, S. Shaik, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 394–395; d) S. Shaik, D. Kumar, S. P. de Visser, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14016–14016.
[7] a) S. P. de Visser, F. Ogliaro, N. Harris, S. Shaik, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3037–3047; b) S. P. de Visser, F. Ogliaro, S. Shaik, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2955–2958; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2871–2874; c) D. Kumar, B. Karamzadeh, G. N. Sastry, S. P. de Visser, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7656–7667.
[8] a) C. Li, L. Zhang, C. Zhang, H. Hirao, W. Wu, S. Shaik, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8316–8318; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8168–8170; b) P. Rydberg, U. Ryde, L. Olsen, *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 1369–1377; c) C. Li, W. Wu, K. B. Cho, S. Shaik, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 8492–8503; d) S. Shaik, Y. Wang, H. Chen, J. S. A. Song, R. Meir, *Faraday Discuss.* **2010**, *145*, 49–70.
[9] M. J. Frisch et al., Gaussian03, revision C.02; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, **2004**. Siehe Hintergrundinformationen.
[10] a) H. M. Senn, W. Thiel, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1220–1254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1198–1229; b) A. Franke, C. Fertinger, R. van Eldik, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5316–5320; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5238–5242.
[11] A. Klamt, G. Schüürmann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 799–805.
[12] J. N. Burstyn, M. Iskandar, J. F. Brady, J. M. Fukuto, A. K. Cho, *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, *4*, 70–76.
[13] R. A. Marcus, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1161–1172; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1111–1121.
[14] B. Kaduk, T. Kowalczyk, T. Van Voorhis, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 321–370.
[15] E. Klein, V. Lukes, Z. Cibulkova, J. Polovkova, *J. Mol. Struct. Theochem* **2006**, *758*, 149–159.
[16] F. Ogliaro, S. P. de Visser, S. Shaik, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 554–567.
[17] H. Chen, J. S. Song, W. Z. Lai, W. Wu, S. Shaik, *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 940–953.
[18] L. Ji, G. Schüürmann, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 903–912.
[19] M. H. V. Huynh, T. J. Meyer, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5004–5064.
[20] S. Grimme, *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1787–1799.
[21] P. Hlavica, *Drug Metab. Rev.* **2002**, *34*, 451–477.
[22] S. P. de Visser, D. Kumar, S. Cohen, R. Shacham, S. Shaik, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8362–8363.
[23] F. G. Bordwell, X. M. Zhang, J. P. Cheng, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6410–6416.
[24] a) J. M. Dady, S. P. Bradbury, A. D. Hoffman, M. M. Voit, D. L. Olson, *Xenobiotica* **1991**, *21*, 1605–1620; b) D. J. McCarthy, W. R. Waud, R. F. Struck, D. L. Hill, *Cancer Res.* **1985**, *45*, 174–180; c) I. Golly, P. Hlavica, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1987**, *913*, 219–227.
[25] D. A. Pratt, G. A. DiLabio, L. Valgimigli, G. F. Pedulli, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11085–11092.
[26] D. A. Pratt, J. S. Wright, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4877–4882.
[27] P. Rydberg, L. Olsen, *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 3399–3404.
[28] M. J. Frisch et al., Gaussian09, revision B.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, **2010**. Siehe Hintergrundinformationen.