

Железосодержащие оксигеназы: структура, механизм действия и моделирование

А.А.Штейнман

Институт проблем химической физики Российской академии наук

142432 Черногловка Московской обл., просп. Акад. Семенова, 1, факс (496) 522–3507

Рассмотрены последние достижения в области исследования структуры и механизма действия железосодержащих оксигеназ. Приведены примеры химического моделирования этих ферментов, которое имеет большое значение для создания эффективных биомиметических катализаторов селективного окисления углеводородов и направленного окисления неактивированных связей С–Н и С=С в сложных многофункциональных молекулах. Библиография — 253 ссылки.

Оглавление

I. Введение	1013
II. Активация O ₂ в биологических системах. Цитохром P450 как катализатор образования и переноса атома кислорода	1014
III. Негемовые моноядерные оксигеназы — идеальная платформа для катализа	1018
IV. Метанмонооксигеназа: невероятная активность и высокая селективность	1021
V. Стратегия Природы в окислении неактивированных С–Н- и С=С-связей	1024
VI. Перспективы биомиметического окисления	1029

I. Введение

Нефть и газ являются доступными и дешевыми природными источниками углеводородов. Хотя постоянно открываются новые месторождения нефти и газа, очевидно, что их запасы на Земле ограничены. Это ценное химическое сырье используется преимущественно в качестве топлива, но даже такое применение природного газа проблематично вследствие удаленности его месторождений от центров цивилизации и сложности транспортировки. Начальной стадией использования углеводородов нефти и природного газа в качестве химического сырья является их функционализация, которая представляет определенные трудности, поскольку неактивированные связи С–Н инертны к действию обычных реагентов. С некоторыми оговорками это относится и к неактивированным кратным С=С-связям. Наиболее приемлемым с экологической и экономической точек зрения способом функционализации углеводородов является их окисление кислородом, несмотря на то что молекула последнего также довольно инертна в нормальных условиях.

В настоящее время существуют два подхода к решению этой проблемы. С одной стороны, инертные молекулы алканов и алкенов могут быть активированы комплексами пере-

ходных металлов¹ с образованием интермедиатов, реакционная способность которых достаточна для их прямого окисления молекулярным кислородом или его стабильными производными, например водой. Примером такого подхода является Вакер-процесс (каталитическое окисление алкенов в альдегиды в присутствии солей палладия) и активация насыщенных углеводородов комплексами платиновых металлов, широко изучаемая в последнее время в надежде создать подобный процесс для алканов.^{1,2} С другой стороны, возможна активация молекулярного кислорода с образованием его более активных форм, способных реагировать с алканами и алкенами.¹ Именно по такому пути осуществляются многочисленные процессы биологического окисления в живой природе.³ Оксигеназы, используемые для окисления неактивированных С–Н- и С=С-связей, представляют собой металлопротеины, т.е. металлокомплексы, лигандами в которых являются высокоструктурированные полипептидные цепи.

К концу XX в. в общих чертах была установлена структура активного центра и механизм функционирования основного класса оксигеназ — семейства цитохрома P450, моноядерных гемовых железосодержащих ферментов, — и показана выдающаяся роль железа в биологической активации O₂. К этому же времени относится начало исследований других классов железосодержащих оксигеназ. Были также обнаружены оксигеназы, содержащие медь.

Цитохромы P450 играют фундаментальную роль в окислительных превращениях эндогенных и экзогенных молекул. Это один из наиболее распространенных и важных ферментов в природе.⁴ К июню 2006 г. описано свыше 6000 изоформ цитохрома P450, находящихся в различных тканях разных организмов той или иной ветви «дерева

А.А.Штейнман. Доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории комплексных катализаторов ИПХФ РАН. Телефон: 8(496)522–3135, e-mail: as237t@icp.ac.ru
Область научных интересов: биоординационная химия и биомиметический катализ, активация и окисление алканов.

Дата поступления 28 мая 2008 г.

жизни» и отличающихся деталями строения активного центра и биологическими функциями. Интерес к химии цитохрома P450 вызван желанием понять, как фермент в водном окружении при нейтральных pH и физиологических температурах может селективно осуществлять одну из важных реакций органической химии — гидроксирование неактивированных связей C—H. О высокой организации активного центра фермента свидетельствует и способность ω-гидроксилирующих изоформ преимущественно окислять концевые метильные группы углеводородной цепи в присутствии более легко окисляемых метиленовых групп. Всестороннее и глубокое изучение механизма действия цитохрома P450 в течение последних 30 лет позволило выявить роль биологической активации O₂ в регио- и стереоселективном окислении сложных молекул. Важность этой проблемы очевидна, поскольку в настоящее время в синтетической химии не существует общих прямых методов специфического гидроксирования неактивированных C—H-связей.

На рубеже XX и XXI столетий совместными усилиями биологов, химиков и физиков осуществлен прорыв в исследовании процессов активации O₂ в живых системах и ферментативного окисления. В первую очередь это относится к доказательству строения высокорекреационноспособных ключевых интермедиатов каталитического цикла цитохрома P450. Огромное значение имели установление структуры биядерного активного центра метанмонооксигеназы (ММО), содержащего два связанных негемовых атома железа, а также регистрация спектральных характеристик ключевых интермедиатов его каталитического цикла. Выдающаяся роль этого бактериального фермента состоит в том, что он позволяет провести селективное окисление крайне инертного углеводорода — метана — при физиологических условиях. В последнее десятилетие открыт и всесторонне изучен новый класс оксигеназ — моноядерных негемовых железосодержащих ферментов, — круг каталитических реакций которых оказался шире, чем для цитохрома P450. Наконец, прогресс в области точных квантово-химических расчетов многоатомных систем с переходными металлами значительно способствовал установлению механизма действия многих металлоферментов, включая оксигеназы.⁵

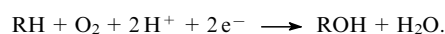
Параллельно с развитием бионеорганической химии процессов окисления в настоящее время происходит формирование биомиметического подхода в катализе, т.е. принципы организации и функционирования природных катализаторов — ферментов — используются для создания высокоэффективных и селективных химических катализаторов реакций окисления.^{6,7}

Многочисленные конференции и ежегодное появление тысяч публикаций, а также монографий и обзоров (см., например,^{3–39}), посвященных отдельным оксигеназам и их моделям, хорошо отражают динамичное развитие этой области исследований. В настоящем обзоре сделана попытка дать общее представление о различных железосодержащих оксигеназах и их моделях на основе единого механизма действия.

II. Активация O₂ в биологических системах. Цитохром P450 как катализатор образования и переноса атома кислорода

В природных процессах активации молекулы кислорода участвуют ферменты с различными механизмами каталитического действия. Окисление различных субстратов

осуществляется оксидазами и оксигеназами. Последние отличаются тем, что способны оксигенировать субстрат, т.е. вводить в него один или оба атома молекулы кислорода. Наиболее трудные реакции окисления, например окисление неактивированных C—H-связей, осуществляются металлсодержащими оксидазами и оксигеназами.³ Пероксидазы и пероксигеназы используют в качестве окислителя пероксид водорода. Возможно также восстановление O₂ на металлическом центре до пероксида, который далее активируется на этом центре с образованием в конечном счете значительно более сильного окислителя — оксокомплекса высоковалентного металла. Монооксигеназы — это ферменты, способные катализировать оксигенирование субстрата молекулярным кислородом в присутствии эндогенного восстановителя. При этом один атом кислорода молекулы O₂ внедряется в субстрат, а другой образует воду в соответствии со стехиометрическим уравнением:



В случае диоксигеназ оба атома кислорода внедряются в субстрат(ы).

В состав многих оксигеназ входят переходные металлы, в первую очередь железо. Менее распространены медьсодержащие оксигеназы. Два электрона, необходимые для осуществления монооксигеназного цикла, генерируются из обязательно присутствующего в системе органического восстановителя под действием редуктазы. Получая электроны, металл переходит в восстановленное состояние и приобретает способность реагировать с молекулярным кислородом, активируя его для дальнейшей реакции с субстратом. Основой каталитического действия оксигеназ является активация молекулярного кислорода с образованием пероксо- и оксокомплексов металла. В зависимости от строения каталитического центра железосодержащих оксигеназ различают гемовые и негемовые оксигеназы. Первые содержат порфириновый комплекс железа (гем), во вторых атом Fe связан в активном центре с имидазольными и карбоксилатными фрагментами аминокислот полипептидной цепи.

Наиболее подробно изучено биологическое окисление различных органических веществ под действием гемовой монооксигеназы — цитохрома P450. В последнее время активно исследуются также два семейства негемовых монооксигеназ. Биядерные негемовые монооксигеназы содержат в активном центре два связанных друг с другом иона железа, а моноядерные — один ион железа, координированный двумя гистиридиновыми и одним глутаматным или аспартатным остатками.

Цитохром P450 присутствует во всех живых организмах — от бактерий до млекопитающих — и выполняет различные функции.^{4,8–11} Этот универсальный биологический окислительный катализатор наряду с гидроксированием алканов и других содержащих C—H-связь соединений способен осуществлять дегидрирование насыщенных систем, эпоксилирование алкенов, образование S- и N-оксидов и др. Однако уникальным свойством цитохрома P450, как и других железосодержащих оксигеназ, считается селективное гидроксирование неактивированных связей C—H, что объясняет частое употребление для их названия термина «гидроксилазы». Высокая организация активного центра некоторых изоформ цитохрома P450, называемых ω-гидроксилазами, позволяет селективно окислять наиболее прочные C—H-связи концевых метильных групп в присутствии

менее прочных С—Н-связей метиленовых групп *n*-алканов и активированных α - и β -метиленовых групп нормальных жирных кислот.⁴⁰

Активный центр фермента (рис. 1) включает встроенный в белок октаэдрический комплекс железа, где четыре экваториальных координационных места занимает порфириновый лиганд, а одно из аксиальных (пятое, или иначе проксимальное) — тиолатная группа цистеинового остатка.^{41, 42} Второе аксиальное место (дистальное) в «покоящемся» состоянии фермента (ферри-состоянии) занимает молекула воды. Это координационное место на дистальной стороне порфирина имеет в своем окружении преимущественно липофильные аминокислотные остатки, составляющие так называемый «гидрофобный карман» для связывания субстратов. При связывании субстрата за счет нековалентных взаимодействий в гидрофобной полости фермента молекула воды отщепляется, освобождая это координационное место для дальнейшего присоединения молекулярного кислорода после восстановления атома железа до ферро-состояния. Структурные данные указывают на наличие канала доставки субстрата с поверхности фермента к его активному центру, находящемуся внутри белковой глобулы.⁴³

Несмотря на то что контролируемый перенос протона в гидрофобном активном центре цитохрома P450 представляет определенную проблему, он является необходимой стадией активации молекулярного кислорода. Исследования методами направленных мутаций⁴⁴ и криокристаллографии⁴⁵ показали, что полярные аминокислотные остатки дистальной области гема участвуют в переносе протонов от поверхности белковой глобулы к связанному с атомом железа кислороду, образуя вместе с несколькими молекулами воды цепь водородных связей, которая работает подобно челночному механизму.

Высоконуклеофильный тиолатный аксиальный лиганд способствует гетеролитическому разрыву связи О—О путем донирования электронов.^{8, 46} Замена в активном центре координированного к атому железа цистеинового остатка на сериновый приводит к резкому снижению монооксигеназной активности.⁴⁷ При гетеролитическом расщеплении связи О—О аксиальный тиолатный лиганд и протоны действуют согласованно путем так называемого «пуш-пульного» механизма.

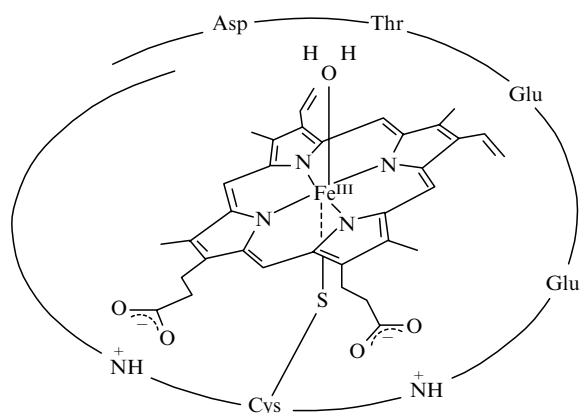


Рис. 1. Активный центр цитохрома P450.

Здесь и на рис. 3, 5 белковое окружение условно представлено витком спирали вокруг металлоцентра.

Процесс активации O_2 гемовыми оксигеназами был изучен в основном на примере наиболее доступного бактериального камфорного цитохрома P450_{cam} (CYP101, согласно современной классификации). На рис. 2 схематически представлены интермедиаты каталитического цикла цитохрома P450. При связывании субстрата в активном центре фермента атом железа, находящийся в низкоспиновом Fe^{III} -состоянии (структура 1), переходит в пятикоординированное высокоспиновое состояние 2 за счет конформационных изменений в полипептидных цепях, прилегающих к гидрофобной области. Далее происходит перенос одного электрона от цитохром-P450-редуктазы на фермент-субстратный комплекс. Восстановленный фермент-субстратный комплекс 3 быстро взаимодействует с O_2 , образуя кислородсодержащий комплекс 4. Последний формально подобен кислородному комплексу гемоглобина, однако отличается электронной структурой, реакционной способностью и меньшей стабильностью. При пониженных температурах комплекс 4 относительно устойчив и его удается наблюдать спектральными методами.⁴⁸ Перенос на него второго электрона определяет скорость всего процесса и немедленно приводит к образованию продуктов окисления. До недавнего времени свидетельств промежуточных стадий этого процесса на самом ферменте обнаружить не удавалось, поскольку скорость превращений интермедиатов намного выше скорости их образования.

При переносе второго электрона на комплекс 4 образуется пероксонтермедиат 5, который, по-видимому, служит нуклеофильным окислителем в некоторых реакциях цитохрома P450 с субстратами, содержащими активированные С—Н-связи. Вывод о том, что перенос второго электрона на скоростьопределяющей стадии первоначально приводит к пероксокомплексу 5, сделан на основании наблюдения спектра этого интермедиата на мутантном цитохроме P450, в котором перенос протонов частично блокирован заменой определенных аминокислотных остатков. Получено хорошее соответствие между рассчитанными¹² методом функционала плотности (DFT) и экспериментальными⁴⁴ спектрами интермедиатов с группировками $Fe^{III}-O_2^+$ и $Fe^{III}-O_2^-$. Протонирование последнего интермедиата по дистальному атому кислорода⁴⁹ приводит к гидропероксидному комплексу 6, который может быть обнаружен при низкой температуре (см. ниже).

Последующие стадии цикла были предложены ранее по аналогии с циклом более изученных родственных гемовых

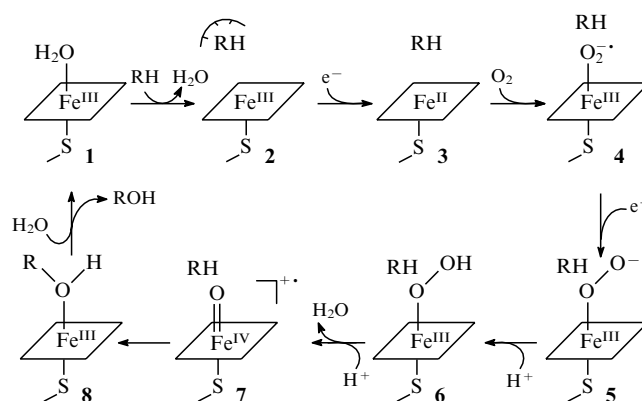


Рис. 2. Каталитический цикл цитохрома P450.

RH — субстрат.

ферментов, использующим пероксид водорода в качестве субстрата (пероксидаз, каталаз), и только в последнее время начинают получать прямое подтверждение. Повторное протонирование по дистальному атому кислорода⁴⁹ должно привести к гидратированному оксоинтермедиату **7** с одно-временным или последовательным отщеплением молекулы воды.⁵⁰ Исследования с изотопно-обогащенным O_2 подтвердили, что к субстрату переносится атом О, непосредственно связанный с гемовым атомом железа цитохрома P450, а терминальный атом кислорода образует молекулу воды.¹² Расчеты подтверждают, что терминальный атом О пероксоинтермедиата **5** протонируется дважды, что облегчает гетеролитическое расщепление связи $O-O$ с образованием воды и феррильного интермедиата **7**.

Предполагают, что перенос на молекулу кислорода двух электронов и двух протонов превращает ее в пероксид. В пользу такого предположения говорит то, что в отсутствие естественного восстановителя пероксиды способны окислять алканы при катализе цитохромом P450, выполняя роль пероксидного шунта. Другие доноры атома кислорода, например иодозобензол ($PhIO$) или гипохлорит-ион (ClO^-), в шунтированных системах, по-видимому, напрямую образуют феррильный интермедиат **7** путем переноса атома О от окислителя. В то время как интермедиат **7** не удается изолировать в естественном цикле цитохрома P450, его спектральное наблюдение оказалось возможным в системах, шунтированных пероксидами. Следует отметить, что оксигенирование субстратов цитохромом P450 по сути является сопряженным процессом, позволяющим окислить трудно-окисляемый субстрат за счет параллельного окисления легкоокисляемого соединения, например природного восстановителя — никотинамиддинуклеотид(фосфат)а, $NAD(P)H$.

Атака вторым протоном ближайшего к металлу атома кислорода должна приводить к комплексу с пероксидом водорода. Выделение пероксида водорода рассматривается как нарушение нормального сопряженного процесса окисления. В шунтированной реакции комплекс с пероксидом водорода является первым кислородным интермедиатом, подобным аналогичному интермедиату пероксидаз. Последние в качестве проксимального лиганда содержат гистидиновый остаток и обычно осуществляют одноэлектронные реакции окисления фенолов, т.е. гораздо более реакционноспособных соединений, чем алканы. Активный окислительный интермедиат пероксидаз был выделен и охарактеризован как оксокомплекс высоковалентного железа, имеющий строение $P^{+}Fe^{IV}=O$ (P^{+} — катион-радикал порфирина) и получивший название «Соединение I» ($Cpd\ I$).⁵¹ Гетеролитическое расщепление H_2O_2 пероксидазами с образованием $Cpd\ I$ и воды моделирует соответствующую стадию каталитического цикла цитохрома P450. Одноэлектронное восстановление $Cpd\ I$ приводит к другому интермедиату — «Соединению II» ($Cpd\ II$).

По аналогии с пероксидазами окислительный феррильный интермедиат **7**, формально содержащий группировку $PFe^V=O$, часто описывается как частица $P^{+}Fe^{IV}=O$, и обозначается $Cpd\ I\ P450$. При окислении алканов и эпексидировании алкенов в шунтированных системах при катализе простыми железопорфириновыми комплексами удалось выделить и охарактеризовать аналоги $Cpd\ I$. Другие интермедиаты, показанные на рис. 2, также были идентифицированы в модельных системах с использованием синтетических аналогов типа мезо-тетраарилпорфиринов железа (см. ниже).

Среди пероксидаз особое место занимает хлорпероксидаза,⁵² которая наряду с одноэлектронными реакциями окисления может осуществлять двухэлектронные реакции переноса, подобные известным для цитохрома P450, т.е. выступать как пероксигеназа. Это связано с тем, что в отличие от типичных пероксидаз хлорпероксидаза содержит в качестве проксимального лиганда тиолатную группу цистеинового остатка, как и цитохром P450. С участием хлорпероксидазы в присутствии галогенид-ионов протекают реакции галогенирования субстрата, а в отсутствие галогенид-ионов идет гидрокселирование и эпексидирование, типичные стереоспецифические реакции цитохрома P450.⁵³ «Соединение I» хлорпероксидазы является наиболее подробно исследованной ферментативной моделью интермедиата $Cpd\ I\ P450$. Следует отметить, что существует несколько принципиальных отличий в механизмах действия хлорпероксидазы и цитохрома P450. Во-первых, в случае хлорпероксидазы, как и других пероксидаз, дистальная область гема, в которую диффундирует субстрат после образования $Cpd\ I$, имеет полярный характер; тогда как в случае цитохрома P450 субстрат связывается с гидрофобной областью вблизи гема, что инициирует каталитический цикл, приводящий к $Cpd\ I$. Во-вторых, в случае пероксидаз для образования $Cpd\ I$ протоны координированного к атому железа пероксида водорода перестраиваются с участием находящегося рядом имидазольного кольца гистидина; а для доставки протонов в неполярный каталитический центр цитохрома P450 необходим специальный канал, связывающий гидрофильную поверхность фермента с его гидрофобным активным центром. Эти обстоятельства объясняют более высокую энергию активации образования $Cpd\ I\ P450$ ($14\ \text{ккал}\cdot\text{моль}^{-1}$) по сравнению с энергией активации образования аналогичного интермедиата пероксидаз ($2-5\ \text{ккал}\cdot\text{моль}^{-1}$).⁵⁴

Анализ кристаллической структуры цитохрома P450 показывает, что с проксимальной стороны гема также существует гидрофобная область, называемая «цистеиновым карманом». Конформационные изменения примыкающего к нему α -спирального участка полипептидной цепи посредством изменения степени водородного связывания с координированной тиолатной группой контролируют редокс-свойства гем-тиолатного центра.⁵⁰ Изучение гем-тиолатных модельных комплексов продемонстрировало, что тиолатный лиганд увеличивает скорость разрыва связи $O-O$ в этих комплексах и способствует ее расщеплению по гетеролитическому, а не гомолитическому механизму.⁵⁵

В качестве модели активного центра цитохрома P450 был предложен железопорфирин с закрепленной тиолатной группой и гидрофобной полостью с дистальной стороны.^{56,57} Этот комплекс обладает высокой стабильностью и сохраняет свою структуру, включая тиолатный лиганд, во время каталитического окисления алканов в бензоле, полярность которого близка к окружению гема в активном центре цитохрома P450. Показано,⁵⁷ что тиолатный лиганд не только значительно ускоряет скорость расщепления связи $O-O$ в пероксикислотах, но и способствует гетеролизу этой связи даже в сильно неполярной среде без содействия кислоты или основания. Феррильный интермедиат, образующийся в такой модельной системе, обладает высокой электрофильностью и способен гидрокселировать алканы и эпексидировать алкены. В присутствии тиолатного лиганда увеличивается предпочтительность атаки феррильной группы ($Fe=O$) по связи $C-H$ по сравнению с присоединением к ненасыщенным системам.⁵⁵ Обычно это связывают с увеличением вклада структуры с координированным тиольным радикалом,

$\text{PFe}^{\text{IV}}=\text{O}(\text{RS}^-)$.⁵⁸ Действительно, расчеты методом DFT показали, что анион RS^- в большей степени, чем имидазольное кольцо (Im) или анион Cl^- , стабилизирует высоковалентное состояние железа, способствует гетеролитическому расщеплению связи $\text{O}-\text{O}$ и понижает эффективный барьер реакции гидроксирования алканов.⁵⁹ Можно надеяться, что подобные гем-тиолатные комплексы⁵⁵ позволят в будущем получить модель истинного Cpd I P450 .

При попытках зафиксировать короткоживущие интермедиаты каталитического цикла цитохрома P450 большую роль сыграли изучение его реакций при низких и сверхнизких температурах, а также использование современных спектральных методов исследования быстрых реакций, таких как метод остановленной струи (Stopped Flow, SF) и гашение реакции при быстром замораживании (Rapid Freeze-Quench, RFQ).¹³

Активный окислительный интермедиат Cpd I P450 трудно наблюдать, поскольку из-за крайне высокой реакционной способности он не накапливается в заметной концентрации в нативной системе. При криовосстановлении цитохрома P450_{cam} в водном глицерине в присутствии камфоры электронами, получаемыми при γ -радиолизе, с хорошим выходом образуется интермедиат **3**, который в реакции с O_2 приводит к комплексу **4** (см. рис. 2).⁶⁰ Последний далее восстанавливается до пероксоинтермедиата **5**. При очень низкой температуре интермедиат **5** достаточно стабилен и может быть охарактеризован методами ЭПР и ENDOR (Electron-Nuclear Double Resonance).⁶⁰ Осторожное нагревание образца позволяет осуществить перенос протона за счет размораживания некоторых степеней свободы и приводит к появлению гидропероксидного интермедиата **6**, который также был охарактеризован спектральными методами. Однако при постепенном нагревании образца до более высокой температуры единственным наблюдаемым интермедиатом был напряженный комплекс, в котором атом кислорода образовавшегося спирта связан с атомом железа значительно прочнее, чем в равновесном комплексе **8**.⁶⁰ При дальнейшем нагревании этот комплекс превращается в интермедиат **8**. Невозможность наблюдать активный интермедиат **7** указывает на то, что в данных условиях он реагирует с субстратом на порядок быстрее, чем образуется. Этот результат позволяет оценить, что при физиологических температурах константа скорости реакции псевдопервого порядка для гидроксирования камфоры составляет $> 1000 \text{ c}^{-1}$ (см.⁶¹).

Недавно методом криокристаллографии удалось установить структуры интермедиатов **3** и **4** и проследить каталитический путь цитохрома P450_{cam} при атомном разрешении.⁴⁵ При связывании O_2 с интермедиатом **3** дистальный атом кислорода образует водородные связи с гидроксильными группами аминокислотного остатка треонина (Thr) и воды. Действие на кристаллы комплекса **4** мягкого рентгеновского излучения при 100 K приводит к переносу на атом железа электронов, образующихся при радиолизе воды. При этом дистального атома O обнаружить уже не удастся. По-видимому, в данном случае образуется Cpd I P450 , так как расстояние $\text{Fe}-\text{O}$ в нем, равное 1.65 Å, соответствует феррильной природе этого интермедиата.⁵¹ Вблизи предполагаемого феррильного атома кислорода обнаружена молекула воды, которая, возможно, образована из дистального атома O после расщепления связи $\text{O}-\text{O}$. Как и ожидалось, в этом интермедиате тиолатный лиганд сохраняется, причем расстояние $\text{Fe}-\text{S}$ близко к наблюдаемому в комплексе **4**. При кратковременном размораживании происходит

стереоспецифический перенос атома O в положение 5 камфоры с образованием уже известной структуры — ферри-состояния P450 (см. рис. 1). Протоны, необходимые для осуществления этого процесса, доставляются в гидрофобный активный центр цитохрома P450 через систему водородных связей по челночному механизму с участием аминокислотных остатков Thr и Asp и нескольких упорядоченных молекул воды. В случае мутантного цитохрома P450, в котором эта цепь водородных связей нарушена, получены данные, указывающие на образование гидропероксидного интермедиата **6**. Таким образом, метод кристаллографии подтверждает, что перенос на атом железа второго электрона и двух протонов приводит к разрыву связи $\text{O}-\text{O}$ и образованию феррильного интермедиата **7**. Причиной того, что феррильный интермедиат обнаружен в кристалле, но не в замороженном растворе, может быть ограниченная подвижность камфоры в кристаллической решетке фермент-субстратного комплекса, препятствующая ее реакции с феррильным интермедиатом.⁹ Хотя описанный выше метод не позволил охарактеризовать Cpd I P450 , полученные результаты свидетельствуют в пользу участия этого интермедиата в гидроксировании субстрата.

Первые спектральные характеристики Cpd I P450 были получены при попытке наблюдать его методом остановленной струи.⁶² При быстром смешивании растворов цитохрома P450 и *m*-хлорпероксибензойной кислоты образуется короткоживущий активный интермедиат, спектр оптического поглощения которого сходен со спектром более стабильного и хорошо охарактеризованного Cpd I хлорпероксидазы⁶³ (табл. 1). Аналогичные результаты получены в случае термофильного цитохрома P450 (CYP119),⁵⁴ для которого Cpd I оказался стабильнее и сравним по стабильности с Cpd I хлорпероксидазы (см. табл. 1). Отметим, что квантово-химические расчеты подтверждают экспериментальные спектры Cpd I .^{11, 12}

Согласно спектральным данным, интермедиаты Cpd I хлорпероксидазы и цитохрома P450 имеют строение $\text{P}^+\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}(\text{RS}^-)$. Квантово-химические расчеты показывают, что взаимодействие двух неспаренных электронов, находящихся на феррильной группе, с неспаренным электроном порфиринового кольца приводит к тому, что дублетное (основное) состояние этой системы очень близко по энергии к квартетному (возбужденному) состоянию.¹¹ Состояние, в котором неспаренный электрон находится на атоме серы цистеина, также находится довольно близко. Согласно данным спектроскопии ЭПР и ENDOR, неспаренный электрон Cpd I хлорпероксидазы локализован преимущественно на

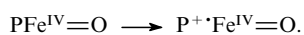
Таблица 1. Оптические спектры и времена жизни феррильных интермедиатов хлорпероксидазы и цитохрома P450 при 20°C и pH 7.

Фермент	Максимумы полос поглощения, нм		Время жизни, кс	Ссылки
	Cpd I	Cpd II		
Хлорпероксидаза	367, 610, 688	433, 542, 571	0.03	63
P450 CYP101	367, 694	429, 536, 568	—	63
P450 CYP119	370, 608, 690	—	0.03	63
	367, 416, 650	429, 540, 570	0.2	64 ^a

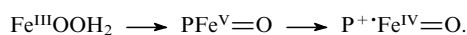
^a Фотохимическое окисление, в остальных случаях — окисление пероксикислотой.

порфирине⁶⁵ и только частично делокализован на тиолатный лиганд. Однако этот эффект сильно зависит от степени водородного связывания тиолатного фрагмента с группами N—H полипептидной цепи.

В большинстве работ для образования Cpd I применяли двухэлектронное химическое окисление ферри-цитохрома сильными окислителями, например пероксикислотами. Другой подход связан с использованием фотохимического метода, в одном из вариантов которого контролируемая вспышка лазера вызывает отрыв электрона от порфирина в Cpd II (см. табл. 1):⁶⁴



В этих условиях время жизни активного интермедиата становится больше, что позволяет изучить его реакционную способность по отношению к обычным субстратам CYP119. Оказалось, что полученный таким способом интермедиат реагирует с неактивированной вторичной связью C—H лауриновой кислоты медленнее (> 1000 раз), чем активный интермедиат цитохрома P450 с аналогичной связью в камфоре.⁶⁴ Авторы работы⁶⁴ полагают, что для оксигенирования наиболее инертных субстратов в цитохроме P450 используется высокоэнергетический изомер Cpd I. Такой интермедиат содержит оба окислительных эквивалента на атоме железа⁶⁶ и предшествует образованию Cpd I:



По-видимому, этим также объясняется тот факт, что хлорпероксидаза, которая взаимодействует с субстратом после образования Cpd I, не способна окислять более прочные C—H-связи, чем бензильные, причем окисление последних также протекает неэффективно.⁶⁷

Несмотря на то что химические модели Cpd I P450 — оксокомплексы железорпорфиринов — катализируют многие реакции данного фермента, их активность на несколько порядков ниже.⁶⁸ Это, однако, не относится к каталитическим реакциям оксигенирования с участием железорпорфиринов, где возможно образование комплексов $\text{PFe}^{\text{V}}=\text{O}$ и их взаимодействие с субстратом до превращения в интермедиаты $\text{P}^+\cdot\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$. Поскольку процесс окисления с участием цитохрома P450 инициируется связыванием субстрата в гидрофобной полости вблизи гема, оксигенирование может осуществляться образующимся суперактивным интермедиатом $\text{PFe}^{\text{V}}=\text{O}$ до его релаксации в более стабильный изомер.⁶⁸ Такая гипотеза кажется вполне правдоподобной, но требует дополнительных исследований для подтверждения.

Уже долгое время ведутся дебаты вокруг механизма оксигенирования субстратов цитохромом P450.⁶⁹ Наиболее популярна точка зрения, что единственным электрофильным интермедиатом в этом процессе является комплекс $\text{P}^+\cdot\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, который реагирует с C—H-связями по механизму отщепления–рекомбинации (oxygen rebound).⁷⁰ Однако экспериментальные результаты не всегда согласуются с этим представлением. Ряд авторов указывают, что координированный с атомом железа пероксид водорода или гидропероксидный интермедиат **6** могут быть другими электрофильными окислителями,^{69,71} которые реагируют путем синхронного внедрения атома O в связь C—H или C=C. Недавние расчеты методом DFT показали, что реакционная способность Cpd I P450 значительно превышает реакционную способность интермедиата **6** или пероксидного

комплекса $\text{Fe}^{\text{III}}\cdot\text{H}_2\text{O}_2$ и поэтому их участием в нативной системе можно пренебречь.⁷²

В случае оксигенирования субстрата с участием Cpd I P450 в принципе возможны два механизма процесса. В соответствии с механизмом отщепления–рекомбинации, при отрыве атома водорода от C—H-связи (или присоединении по двойной связи) образуется углеродцентрированный радикал, который далее связывается с феррильным атомом кислорода.⁷⁰ Второй механизм, согласованный, — предполагает синхронное внедрение атома O в связь C—H и C=C.⁷³ Теоретические расчеты показывают, что эти механизмы могут быть реализованы двумя спиновыми состояниями $\text{P}^+\cdot\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$: низкоспиновый интермедиат внедряет атом O, а высокоспиновый реагирует путем отщепления атома H с образованием радикала.¹¹ Поскольку Cpd I P450 в качестве основного электронного состояния имеет два близко лежащих состояния — дублет и кватрет, — взаимодействие с C—H-связью, протекающее на двух конкурирующих поверхностях, получило название двухмаршрутной реактивности (Two-State Reactivity, TSR).⁷⁴

В заключение этого раздела ответим на вопрос: почему активный интермедиат белка окисляет самые инертные соединения и не затрагивает лабильную белковую структуру? Недавно получены доказательства,¹⁴ что способность оксо-соединений металлов отщеплять атом H от субстрата определяется прочностью образующейся связи O—H, которая, в свою очередь, зависит от одноэлектронного потенциала восстановления (E°) Cpd I и pK_a Cpd II:⁷⁵

$$D(\text{O}—\text{H}) = 23.06 E^\circ + 1.37 pK_a + 57 \pm 2 \text{ (ккал} \cdot \text{моль}^{-1}). \quad (1)$$

Данные γ-резонансной спектроскопии и расчеты методом DFT показали, что феррильная группа в Cpd II протонирована при физиологических значениях pH.⁷⁶ Это указывает на основной характер феррильного атома кислорода в Cpd II, обусловленный сильным донированием электронов аксиальным тиолатным лигандом. Увеличение вклада второго слагаемого в уравнении (1) позволяет уменьшить вклад первого члена, т.е. осуществлять отрыв атома H и последующее гидроксидирование при относительно низких редокс-потенциалах Cpd I, при которых не повреждается белковое окружение фермента.⁷⁷

Таким образом, в результате обширных экспериментальных исследований на самом ферменте и его моделях, а также на основании квантово-химических расчетов удалось создать точную картину активации O₂ гемовой монооксигеназой P450: после гетеролитического расщепления связи O—O образуется уникальный гем-тиолатный феррильный интермедиат, способный внедрять атом O в связь C—H алканов и эпоксидировать алкены. Эти исследования показали, что цитохром P450 является хорошо организованным биокатализатором контролируемого окисления алканов и других субстратов и открыли для химии новую каталитическую реакцию — монооксигенирование неактивированных C—H-связей.

III. Негемовые моноядерные оксигеназы — идеальная платформа для катализа

В последние десять лет подробно изучены моноядерные негемовые оксигеназы, выполняющие важные превращения в метаболизме и физиологии млекопитающих и в биодеградационных процессах с участием микроорганизмов.^{15, 16, 78–80} К январю 2005 г. было исследовано свыше

125 структур тридцати различных форм этого класса ферментов.⁷⁹ Такие оксигеназы катализируют реакции оксигенирования: гидроксирование алифатических и ароматических C—H-связей, эпексидирование C=C-связей, *цис*-дигидроксилирование алкенов и аренов, образование и раскрытие гетероциклов, окислительное расщепление ароматических связей и др. Круг реакций моноядерных негемовых Fe(II)-оксигеназ оказался даже шире, чем для цитохрома P450, и включает реакции дегидрирования, дезалкилирования, эпимеризации и галогенирования. Среди большого разнообразия ферментов этого класса в рамках настоящего обзора будут рассмотрены три семейства.

Первое семейство — α -кетоглутаратзависимые ферменты. Это универсальная группа ферментов, которые требуют присутствия α -кетокислоты как косубстрата (кофактора) окисления и осуществляют функционализацию неактивированных C—H-связей параллельно с окислительным декарбокислированием α -кетокислоты, обычно α -кетоглутарата. Кетоглутарат связывается с ионом железа как бидентатный лиганд и восстанавливает два из четырех электронов, необходимых для восстановления O_2 . В соответствии с этим в реакции гидроксирования один атом молекулы кислорода включается в продукт, в то время как другой атом — в остаток кетокислоты, который превращается в остаток трикарбоновой кислоты, а после элиминирования CO_2 — в сукцинат.^{17,81}

Второе семейство — птеринзависимые гидроксилазы, которые используют тетрагидробиоптерин (BH_4) как кофактор, донирующий два электрона. Фенилаланин-, тирозин- и триптофангидроксилазы осуществляют региоселективное ароматическое гидроксирование.^{18,82}

Диоксигеназы Риске, представляющие третье семейство, катализируют *цис*-дигидроксилирование двойной связи в аренах, при этом NADH служит источником двух электронов и оба атома молекулы O_2 переходят в субстрат, образуя *цис*-диола.⁸³ Эти диоксигеназы, найденные в почвенных бактериях, осуществляют первую стадию деградации ароматических углеводородов. Наиболее изученной диоксигеназой Риске является нафталин-1,2-диоксигеназа (НДО), которая диоксигенирует нафталин с образованием (+)-*цис*-(1R,2S)-дигидрокси-1,2-дигидронафталина.⁸⁴ Диоксигеназы Риске могут также работать как монооксигеназы в реакциях гидроксирования и эпексидирования с превращением второго атома кислорода в молекулу воды.⁸⁵ Катализируемые ими реакции протекают стерео- и энантиоселективно, а *цис*-дигидроксилирование аренов представляет собой превращение, не известное в синтетической органической химии.

Во всех этих ферментах Fe(II)-центр (рис. 3) координирован тремя аминокислотными остатками: двумя гистидиновыми и одним аспартатным или глутаматным, расположенными в вершинах одной из треугольных граней октаэдра. Эта конфигурация получила название 2-гистидин-1-карбоксилат(N,N,O)-фасиальной триады.⁸⁶ В то время как в цитохроме P450 для катализа предназначено лишь одно координационное место на атоме железа, которое должно быть занято молекулой O_2 или ее восстановленными формами, металлоцентр негемовых моноядерных оксигеназ имеет три координационных места на противоположной грани октаэдра, доступных для связывания экзогенных лигандов — субстрата и/или кофактора и O_2 . Эти лабильные координационные места обычно заняты молекулами воды или другого легкозамещаемого лиганда. Фасиальная конфигурация позволяет активировать как субстрат, так и O_2 и располагать их в близком соседстве для последующей реакции. В отличие

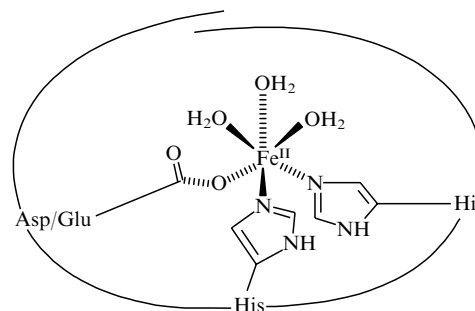


Рис. 3. Активный центр моноядерных негемовых оксигеназ.

от гемового атома железа, для которого высоко- и низкоспиновые состояния близки по энергии, N,N,O-триада стабилизирует высокоспиновую конфигурацию атома железа.⁸⁷ Недавно появились первые сообщения^{88,89} о структурном моделировании моноядерных негемовых центров с N,N,O-триадой.

Обобщенный механизм катализа моноядерными негемовыми ферментами,⁷⁹ основанный на структурных и спектроскопических данных, изучении модельных систем и квантово-химических расчетах, показан на рис. 4. Активный центр фермента изображен треугольной пирамидой, в вершине которой находится Fe(II), а основание представляет N,N,O-триаду.

В «покоящемся» состоянии фермента (структура 9, см. рис. 4) ион Fe(II) является шестикординированным и неактивен по отношению к O_2 . Как и в случае цитохрома P450, связывание субстрата и/или кофактора в активном центре фермента переводит атом железа в пятикоординированное состояние 10,⁹⁰ что увеличивает его сродство к кислороду. Как субстрат, так и кофактор могут быть непосредственно координированы к атому железа или иметь места связывания вблизи него. В случае диоксигеназ Риске субстрат и кофактор не связываются непосредственно с атомом Fe(II), а карбоксилатная группа фасиальной триады выступает как бидентатный лиганд. Координированный O_2 (структура 11) восстанавливается, приводя к пероксидному интермедиату 12 (см. рис. 4), дальнейшая активация ко-

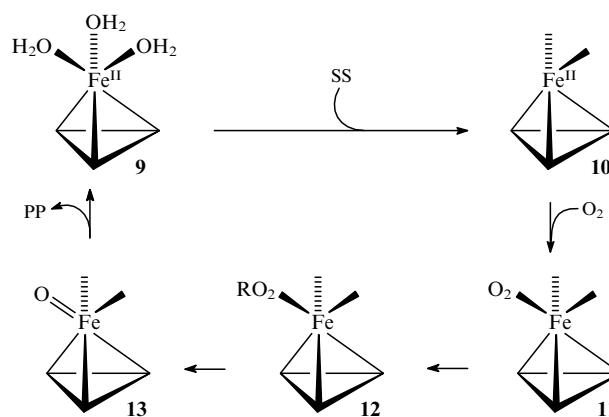
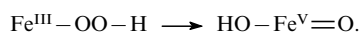


Рис. 4. Обобщенный механизм катализа N,N,O-оксигеназами. Степень окисления атома железа в интермедиатах 11–13 зависит от типа оксигеназы; SS — субстрат и кофактор, PP — продукты, R = H или остаток кофактора.

торого генерирует высоковалентный феррильный интермедиат **13** и инициирует окислительный процесс, специфичный для каждого семейства ферментов. Связывание O_2 является лимитирующей стадией всего процесса.⁹¹ Вследствие этого кислородный комплекс может рассматриваться только как короткоживущий интермедиат каталитического цикла.¹⁹ Согласно расчетам,⁹² он имеет строение $Fe^{III}O_2^-$. Полное восстановление молекулы кислорода включает две двухэлектронные стадии, которые имеют свои особенности для каждой группы ферментов. Для кетоглутарат- и птеринзависимых ферментов первое двухэлектронное восстановление O_2 приводит к мостиковому пероксидному интермедиату $Fe^{II}-OO-R$. Кристаллические структуры аналогичного интермедиата и предшествующего ему $\eta-Fe^{II}O_2$ -интермедиата были установлены недавно для 1,2-катехолдиоксигеназы, осуществляющей окислительное раскрытие ароматического кольца.⁹³ Поскольку в случае диоксигеназ Риске для первого двухэлектронного восстановления O_2 один электрон поставляется из внешнего источника, а второй из атома Fe^{II} , то образуется терминальный гидропероксид, бидентатно связанный с атомом Fe^{III} . Структура такого гидропероксида для НДО установлена на основании данных РСА.⁹⁴

Кетоглутарат- и птеринзависимые гидроксилазы имеют как общие, так и специфические свойства. Как показывают расчеты,¹⁹ в пероксидном интермедиате BH_4 -зависимых гидроксилаз молекула координированной к атому железа воды участвует в гетеролизе связи $O-O$, донируя протон к дистальному атому кислорода с образованием $HO-Fe^{IV}=O$. Диоксигеназы Риске, напротив, во многом напоминают цитохром P450. В частности, для полностью окисленного фермента возможно шунтирование каталитического цикла пероксидом водорода.⁹⁵ Пероксидный интермедиат диоксигеназы Риске, $Fe^{III}-OO-H$, согласно расчетам,¹⁹ сам способен осуществлять *цис*-дигидроксилирование связи $C=C$; однако экспериментальные данные указывают, что он превращается в высоковалентный оксоферрильный интермедиат, который и является действительным дигидроксилирующим агентом:



В пользу этого свидетельствует заметное включение атома ^{18}O в продукт при добавлении изотопно меченой воды, обмен с которой возможен только в случае феррильного интермедиата.⁹⁶ Образование диола приводит к комплексу Fe^{III} , который восстанавливается в исходное Fe^{II} -состояние под действием второго внешнего электрона от NADH.⁹⁷ Получены⁹⁸ доказательства того, что и монооксигеназные реакции НДО протекают через феррильный интермедиат. Наконец, недавно синтезированы структурно-функциональные модели моноядерных негемовых оксигеназ, которые хорошо воспроизводят N,N,O-триаду НДО и осуществляют селективное эпоксилирование или *цис*-дигидроксилирование алкенов.⁹⁹ Включение в диол меченого атома кислорода из добавленной $H_2^{18}O$ показывает, что и в этом случае активной частицей является феррильный интермедиат.

Феррильный интермедиат кетоглутаратзависимого фермента — таурин/кетоглутаратдиоксигеназы (TauD) — хорошо изучен различными спектральными методами.^{20, 100, 101} Высокий кинетический изотопный эффект (КИЭ) ($k_H/k_D = 50$) свидетельствует о его участии в реакции гидроксилирования.¹⁰² Комбинацией методов SF и RFQ в реакции фермент-субстратного комплекса с O_2 при 5°C

наряду с фермент-продуктным комплексом был впервые обнаружен высокоспиновый $Fe^{IV}=O$ -интермедиат (**J**) TauD с УФ-поглощением при ~ 318 нм.¹⁰³ Первым прямым доказательством наличия в интермедиате **J** оксогруппы было наблюдение¹⁰⁴ в резонансном спектре комбинационного рассеяния (КР) характерной полосы поглощения при 821 см^{-1} , которая смещалась в область 787 см^{-1} при использовании $^{18}O_2$. Сопоставление мёссбауэровских спектров этого интермедиата и модельных феррильных комплексов также доказывало его феррильную природу, что позже подтвердилось небольшой длиной связи $Fe-O$, согласно данным рентгеноабсорбционной спектроскопии.¹⁰⁵ Важная информация об электронной и геометрической структуре интермедиата **J** была получена путем сравнения экспериментальных мёссбауэровских параметров с рассчитанными методом DFT.^{101, 106} Показано, что интермедиат **J** является высокоспиновым ($S=2$) оксокомплексом Fe^{IV} , находящимся в искаженно-октаэдрическом лигандном окружении двух гистидиновых имидазольных циклов и двух карбоксилатных групп (остатков сукцината и Asp101) с аксиальным оксолигандом в *транс*-положении к одному и *цис*-положению к другому имидазольному циклу. При этом одна из карбоксилатных групп выступает как монодентатный лиганд, а другая — как бидентатный. Рассчитанное расстояние $Fe-O$ ($1.65\text{ \AA}$) для этого интермедиата оказалось близким к экспериментальному значению ($1.62\text{ \AA}$). Довольно высокий изомерный сдвиг в мёссбауэровском спектре ($0.3\text{ мм}\cdot\text{с}^{-1}$) является следствием слабого поля экваториальных лигандов.

Вслед за установлением структуры интермедиата **J** TauD высокоспиновые феррильные интермедиаты были обнаружены еще в двух кетоглутаратзависимых оксигеназах — пролил-4-гидроксилазе¹⁰⁷ и галогеназе CytC3.¹⁰⁸

Таким образом, в отличие от «неуловимого» Cpd I P450 интермедиат **J** TauD исследован достаточно подробно. Хотя оба интермедиата являются оксокомплексами железа, они имеют различное строение. В то время как Cpd I P450 является шестикоординационным октаэдрическим комплексом железа, в интермедиате **J** TauD пять лигандов составляют тригональную бипирамиду или искаженный октаэдр.¹⁰⁶ В результате обе системы имеют различные наборы молекулярных орбиталей и, следовательно, различную реакционную способность.¹⁰⁹ В отличие от гемового атома железа, основным электронным состоянием феррильного интермедиата в N,N,O-координационном окружении, создающем слабое лигандное поле, является наивысшее спиновое состояние, возможное для данного числа электронов, т.е. квинтет. Согласно экспериментальным данным и теоретическим расчетам, высокоспиновый $Fe^{IV}=O$ -интермедиат формально с четырьмя d-электронами на атоме железа имеет квинтетное основное состояние и после оксигенирования превращается в высокоспиновый Fe^{II} , также имеющий квинтетное основное состояние. Следовательно, реакция переноса атома O с участием этого интермедиата протекает адиабатически.²¹

Квантово-химические расчеты реакции интермедиата **J** TauD с пропеном показали, что он является сильным окислителем, способным гидроксилировать $C-H$ -связи и эпоксилировать $C=C$ -связи с более низким активационным барьером, чем Cpd I P450. Поскольку прочность образующейся связи (см.⁷⁵) $FeO-H$ в случае интермедиата **J** TauD на $10\text{ ккал}\cdot\text{моль}^{-1}$ больше, первый является значительно более реакционноспособным по сравнению с Cpd I P450.²¹

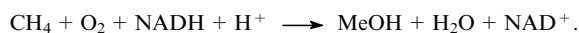
В заключение этого раздела необходимо упомянуть недавно открытые α -кетоглутаратзависимые галогеназы,⁸⁰

которые структурно подобны кетоглутаратзависимым оксигеназам, но имеют несколько измененное лигандное окружение атома железа: в активном центре вместо карбоксилатной группы фасиальной триады находится экзогенный галогенид-ион (обычно хлорид).¹¹⁰ Эти ферменты осуществляют галогенирование неактивированных алифатических связей C—H с участием феррильного интермедиата.⁸⁰

IV. Метанмонооксигеназа: невероятная активность и высокая селективность

Среди железосодержащих негемовых оксигеназ особый интерес представляет многокомпонентная растворимая метанмонооксигеназа (sMMO, далее MMO),^{22–25, 90, 111} которая найдена наряду с менее изученной медьсодержащей мембраносвязанной метанмонооксигеназой (pMMO)¹¹² в метанотрофных микроорганизмах, использующих метан как единственный источник углерода и энергии. Гидроксилазный компонент MMO работает в составе полиферментного комплекса вместе с редуктазой и небольшим, но исключительно важным для катализа сопрягающим (регуляторным) белком В.

Метанмонооксигеназа является биядерным биоконкомплексом железа и катализирует в мягких условиях окиснение простейшего и наименее реакционноспособного насыщенного углеводорода — метана:



В последние 20 лет эта беспрецедентная для химии реакция заинтересовала многих исследователей. Если бы удалось сконструировать биомиметический промышленный катализатор, воспроизводящий реакционную способность MMO, то крупномасштабное превращение метана в метанол могло бы существенно увеличить его использование как дешевого источника энергии и материала для разнообразных технологических процессов.

Кроме метана, MMO способна окисгенировать свыше 50 различных соединений, в том числе линейные алканы (вплоть до *n*-октана) по конечной метильной и соседней с ней метиленовой группам, циклические и ароматические углеводороды, алкены по связям C—H (гидроксилирование) или C=C (эпоксилирование). Однако MMO реагирует с этими углеводородами медленнее, чем с метаном, несмотря на то что C—H-связи в них менее прочные. В разветвленных алканах окисляется наиболее удаленная от разветвления часть молекулы. Все это наводит на мысль, что организация активного центра, а не прочность атакующей связи является решающим фактором в реакциях MMO.

В активном центре MMO¹¹³ (рис. 5) два атома железа связаны с белком четырьмя глутаминовыми (Glu) и двумя гистидиновыми (His) остатками. Во время каталитического цикла одна из карбоксилатных групп сохраняется как мостик между атомами железа, что важно для их согласованного функционирования. Кроме того, с атомом железа может быть связано несколько экзогенных гидроксо- или аквалигандов, часть которых вместе с карбоксилатной группой образуют максимум три мостика между атомами железа. В отличие от гемового атома железа в цитохроме P450 с одним координационным местом для образования кислородных интермедиатов, в случае MMO четыре внутренних координационных места, занятых в ферри-состоянии двумя мостиковыми HO-группами,^{23, 114, 115} могут участвовать в

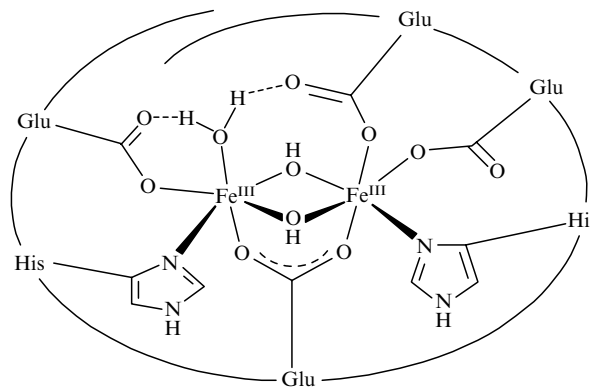


Рис. 5. Активный центр MMO.

каталитическом процессе по механизму мостиковой активации O₂ (см. ниже).

В состав активного центра также входит связывающая субстрат гидрофобная полость объемом около 185 Å³, одна сторона которой образована биядерным комплексом железа, а другая — гидрофобными аминокислотными остатками белка.^{113, 116} Связывание субстрата в этом гидрофобном «кармане» инициирует быстрое двухэлектронное восстановление атомов железа(III) до железа(II) в кластере.¹¹⁷

На основании рентгеноструктурных исследований различных форм ферри- и ферро-MMO к 2001 г. были установлены структуры 34 биоконкомплекс, которые позволяли надежно судить о деталях строения активного центра MMO в окисленном и восстановленном состоянии.²² Конформационные изменения в этих структурах могут играть важную роль на различных этапах каталитического процесса.

В окисленной MMO (см. рис. 5, ее фрагмент представлен на рис. 6, структура 14) оба атома железа находятся в искаженном октаэдрическом окружении и неэквивалентны. Атом железа FeI содержит терминальную координированную молекулу воды. Координационное окружение у атома Fe2 подвижнее, чем у атома Fe1. Кроме того, вместо мостиковой гидроксильной группы в дистальном положении к гистидиновым остаткам могут находиться другие анионные или нейтральные кислородные доноры, включая метоксильный радикал и этанол. Спектральные исследования показывают, что высокоспиновые Fe(III)-ионы антиферромагнитно свя-

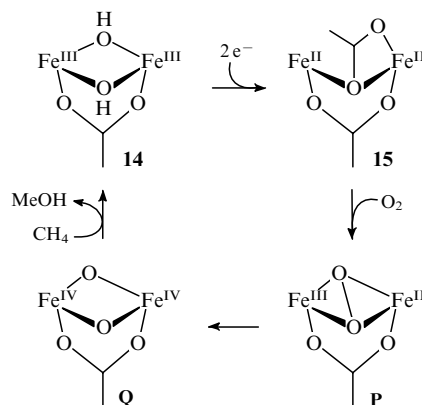


Рис. 6. Упрощенный каталитический цикл MMO.

заны между собой с образованием диамагнитного основного состояния.²⁶

Согласно данным РСА, ЭПР и мёсбауэровской спектроскопии, восстановленная ММО (структура **15** на рис. 6) содержит два высокоспиновых ($S = 2$) ферромагнитно связанных атома Fe(II) с различным лигандным окружением. Расстояние между атомами железа равно $3.3 \text{ \AA}$.^{22, 111} В ферро-ММО оба атома железа становятся пятикоординированными после потери слабосвязанной мостиковой молекулы воды, находящейся в дистальном положении к гистидиновым остаткам, что позволяет молекуле O_2 образовать мостик между атомами железа.²⁵ Эта сторона биядерного комплекса примыкает к гидрофобному «карману», связывающему субстрат, и является ареной всего каталитического процесса. Подобно цитохрому P450, гидроксилазный компонент ММО содержит сеть водородных связей, которая распространяется от биядерного ядра к поверхности белка и служит каналом доставки протонов и, возможно, электронов в зону реакции. Исследование геометрических и электронных структур ферри- и ферро-ММО методом DFT показало, что белковое окружение заметно влияет на энергетику активного центра.^{114, 118}

Восстановленный дитионитом гидроксилазный компонент способен осуществлять стехиометрическое окисление метана кислородом (один цикл) в отсутствие редуктазы. В этом случае добавление метана оказывает лишь умеренное влияние на скорость поглощения кислорода.²³

Каталитические циклы ММО (см. рис. 6), N,N,O-оксигеназ (см. рис. 4) и цитохрома P450 (см. рис. 2) имеют как сходства, так и важные различия. Реакция ферро-ММО с O_2 была изучена с помощью оптической спектроскопии (метод SF).^{119, 120} Оказалось, что в отличие от цитохрома P450 в нативной системе ММО можно обнаружить и охарактеризовать ключевые интермедиаты — соединения **P** и **Q** (см. рис. 6). Несмотря на то что они накапливаются в заметной концентрации, прежде чем прореагируют,^{119, 120} их точная структура все еще остается предметом многочисленных дискуссий. Первым наблюдаемым интермедиатом стал диферрипероксид **P**. Имеются косвенные доказательства образования предшественника интермедиата **P**, которым может быть супероксидный комплекс.¹²¹ Наличие только одного квадрупольного дублета в мёсбауэровском спектре интермедиата **P** указывает на симметричное расположение пероксидной группы между атомами железа. Соединение **P** самопроизвольно превращается в интермедиат **Q**, причем скорость образования последнего не зависит от концентрации метана, а скорость исчезновения прямо пропорциональна ей. Отсюда был сделан вывод, что комплекс **Q** является частью, взаимодействующей с метаном. Исчезновение интермедиата **Q** в реакции с метаном хорошо регистрируется по уменьшению интенсивности характеристических полос в спектре поглощения.

Кинетические данные указывают на важность взаимодействия всех трех компонентов ММО, имеющих высокое сродство друг к другу и образующих полиферментный комплекс, в котором Fe_2 -кластер приобретает способность к двух-электронному восстановлению. Белок В (см. выше) играет решающую роль в осуществлении ключевых стадий: в его присутствии связывание O_2 ускоряется почти в 1000 раз, скорость образования интермедиата **Q** увеличивается в 40 раз, выход продуктов повышается от 40 до 80%, а в присутствии дополнительно редуктазы — до 100%. Белок В регулирует перенос электронов от редуктазы к гидроксилазе так, чтобы этот процесс протекал только в присутствии

субстратов, увеличивает скорость и может изменять регио-селективность окисления алкана. Предполагают, что белок В также контролирует доставку субстрата к активному центру фермента,^{122–125} открывая или расширяя гидрофобный канал, т.е. действует подобно молекулярному сити. При связывании белка В некоторые спектральные характеристики восстановленного Fe_2 -кластера изменяются, указывая на возможные изменения в координационном окружении атома железа, по-видимому Fe^{2+} .¹²³

Эффективное и субстратоспецифичное превращение метана в метанол требует одновременно наличия сильного окислителя и контроля доступа к нему более реакционно-способных субстратов. Мощный окислитель ММО — интермедиат **Q** — надежно защищен замкнутой белковой структурой, и быстрый доступ к нему метана и O_2 становится возможным только тогда, когда белок В образует комплекс с оксигеназой. При этом генерируется физический канал, специфичный к размеру молекул метана и O_2 .¹²⁵

В отсутствие субстрата в системе удается накопить интермедиат **Q** в количестве, достаточном для спектральных исследований. Мёсбауэровский спектр замороженных растворов комплекса **Q** указывает, что атомы железа в нем находятся в высокоспиновом $Fe(IV)$ -состоянии и антиферромагнитно связаны (параметр магнитного взаимодействия $J < -30 \text{ см}$) в симметричный диамагнитный кластер $Fe^{IV}-O-Fe^{IV}$ (см. ¹²⁶).

Мостиковый механизм активации O_2 и окисления метана[†] (см. рис. 6) учитывал биядерную структуру активного центра ММО. Согласно этому механизму, интермедиату **Q** приписывали структуру $Fe(IV)_2(\mu-O)_2(\mu-COO)$ -кластера, а интермедиату **P** — сходную структуру мостикового пероксида, в котором атомы кислорода связаны друг с другом и с обоими атомами железа. Активация кислорода осуществляется путем гомолитического расщепления связи $O-O$ в пероксидном интермедиате и не требует участия протона, а метан активируется атакой мостикового атома кислорода (в отличие от терминального атома кислорода феррильного интермедиата **7**), возможно, с участием второго μ -оксо-мостика.

В последующие годы этот механизм получил экспериментальное и теоретическое подтверждение.^{126, 130} Так, при анализе данных EXAFS-спектроскопии (Extended X-ray Absorption Fine Structure) для интермедиата **Q** обнаружено наличие одной короткой и одной длинной связи $Fe-O$ и необычно короткого расстояния между атомами железа.¹²⁶ Длина короткой связи $Fe-O$ ($1.8 \text{ \AA}$) оказалась больше, чем для терминальных связей $Fe=O$ в порфириновых комплексах высоковалентного железа ($1.67 \text{ \AA}$)⁵¹ и в других феррильных комплексах, но сопоставимой с величинами для связи $Fe-O$ в биядерных μ -оксокомплексах, содержащих фрагмент $Fe-O-Fe$. Были синтезированы модельные комплексы с ядром $Fe_2(\mu-O)_2$,¹³¹ и эта структура подтверждается теоретическими расчетами.¹³²

Обнаружены некоторые аномалии в реакции метана с комплексом **Q**: необычно высокий кинетический изотопный эффект (> 50) при почти полном отсутствии такового в реакциях других алканов и самая высокая скорость окисления среди алканов, плохо согласующаяся с наиболее прочной

[†] Этот механизм, впервые предложенный более 10 лет назад,^{127–129} назван так, чтобы отличать его от терминального механизма активации O_2 в мооядерном активном центре цитохрома P450.

связью C—H.²³ Зависимость константы скорости взаимодействия интермедиата **Q** с метаном от обратной температуры (график Аррениуса) оказалась нелинейной, что указывает на двухстадийный механизм этого процесса.^{119, 120} Отсутствие изотопного эффекта и нормальная температурная зависимость скорости реакции с интермедиатом **Q** для других субстратов свидетельствуют о том, что лимитирующей стадией процесса является не разрыв связи C—H, а, возможно, связывание алкана в активном центре. Лимитирующая стадия реакции с метаном зависит от температуры: при низкой температуре — это связывание субстрата, а при высокой — реакция по связи C—H. Параметры активации для превращения комплекса **P** в **Q** и для реакции интермедиата **Q** с метаном в температурной области, где лимитирующей стадией является разрыв связи C—H, удовлетворительно согласуются с рассчитанными методом DFT.^{132–134}

Оказалось, что можно воспроизвести «метаноподобную» кинетику для реакции с этаном, используя мутантный белок В, в котором аминокислотные остатки в области контакта с гидроксизлазным компонентом уменьшены в размере, что увеличивает диаметр канала и облегчает связывание более крупной молекулы этана в активном центре.¹²⁵ В этом случае активный центр ММО одинаково хорошо доступен для метана и этана, константы скорости реакции этих алканов с интермедиатом **Q** отличаются на 3 порядка в соответствии с различием величин энергии связи в них на 4 ккал·моль^{–1} и наблюдается нормальный КИЭ. Показано также, что эффект квантового туннелирования протона (подбарьерного перехода атома Н), предложенный для объяснения необычно большого изотопного эффекта, существует только в случае окисления метана, но не этана.

Выполненные в последние годы квантово-химические исследования с использованием гибридного метода DFT и достаточно больших моделей (до 100 атомов) выявили важные детали, относящиеся к структуре интермедиатов **P** и **Q** и их реакциям.^{24, 27, 130, 132–134} Надежность этих методов продемонстрирована достаточно точным воспроизведением установленных методом РСА структур ферро- и ферри-ММО, включая периферическую сеть Н-связей.¹³³ Сеть водородных связей необходима для стабилизации интермедиатов **P** и **Q**, причем именно перестройки в Н-связывании контролируют расстояние между атомами железа и превращение одного интермедиата в другой. Оказалось, что молекула воды, координированная к атому Fe1 и включенная в сеть водородных связей, играет ключевую роль в сохранении структур **P** и **Q**.¹³³ Вычисленные параметры мессбауэровских спектров хорошо согласуются с экспериментальными данными, и расчеты подтверждают высокоспиновое состояние интермедиата **Q**.¹³⁵ Расчеты каталитического процесса активации молекулы кислорода показывают,^{24, 130} что при связывании O₂ с восстановленной ММО сначала происходит перенос электрона от одного атома железа и образуется супероксидный комплекс, который, получая электрон от другого атома железа, превращается в μ - η^2 , η^2 -пероксид. Экспериментальные данные косвенно подтверждают наличие супероксидного интермедиата как предшественника интермедиата **P**.¹²¹

Использование достаточно большой модели в квантово-химических расчетах позволило вычислить энергии переходных состояний и константы скорости элементарных реакций, которые хорошо согласуются с известными экспериментальными данными, подтверждая тем самым правильность предложенного механизма окисления. Было обнаружено сильное

влияние белкового окружения на структуру и энергетику активных интермедиатов.^{136, 137} Белок способствует химическому процессу в его движении от реагентов к продуктам путем большего напряжения структуры интермедиатов, образующихся в начале каталитического цикла, так что снятие напряжения в последующих стадиях уменьшает их энергетические барьеры.^{137, 138} Электронная структура биядерного центра интермедиата **Q** оказалась промежуточной между Fe(IV)—Fe(IV) и Fe(III)—Fe(V).^{132, 137} При реакции с метаном асимметрия в геометрии комплекса **Q** увеличивается, и это структурное искажение играет важную роль в активации метана, поскольку существенно увеличивает электрофильность мостикового атома О, придавая ему радикалоподобный характер.^{24, 139} Стадией, определяющей скорость реакции гидроксирования метана, является отрыв атома Н от метана с образованием радикалоподобного интермедиата (перенос протона к атому О и акцептирование электрона от связи C—H атомом Fe2). После прохождения первого переходного состояния процесс осуществляется по двум маршрутам с различными механизмами^{115, 132} — связанно-радикальным и согласованным. Оба маршрута имеют сходное второе переходное состояние, приводящее после поворота группы ОН к метанольному комплексу.¹⁴⁰ По второму маршруту стадия перегруппировки протекает с сохранением тесной связи метильного фрагмента с гидроксогруппой. В этом случае при гидроксировании хирального алкана его конфигурация сохраняется, тогда как по первому маршруту происходит частичная рацемизация, степень которой зависит от времени жизни радикального интермедиата. Вклад того или иного маршрута зависит от природы субстрата, и реальный процесс является суперпозицией двух крайних случаев. Так, сохранение конфигурации при гидроксировании этана, содержащего атомы Н, D и Т в каждой метильной группе, согласно расчету,¹⁴¹ должно составлять 69–84%, что находится в хорошем согласии с экспериментальным значением 72%, полученным для *R*-энантиомера этана.¹⁴²

Известны другие негемовые оксигеназы, которые подобно ММО содержат биядерный комплекс железа в активном центре и катализируют окисление неактивированных связей C—H:²⁸ алканмонооксигеназа (AlkB), толуолмонооксигеназа (ТМО), ксиллмонооксигеназа, алкенмонооксигеназа и др. Эти ферменты способны оксигенировать различные углеводороды: алканы (за исключением метана), алкены и арены.¹⁴³ Среди таких оксигеназ наиболее изучено семейство ТМО, региоселективно гидрокселирующее толуол в *para*-, *meta*- или *ortho*-положение к метильной группе,^{144, 145} и негемовое семейство AlkB. Результаты структурных и спектральных исследований показывают большое сходство биядерного ядра активного центра ТМО с активным центром ММО. Однако, в отличие от цепочки небольших гидрофобных полостей, ведущих к активному центру ММО,¹⁴⁶ большой гидрофобный «карман» делает биядерный центр ТМО более доступным для субстрата.¹⁴⁷ Спектральные исследования при низких температурах позволили обнаружить пероксоинтермедиат ТМО, который отличается по структуре от интермедиата **P** ММО.¹⁴⁸

Наиболее интересна для химиков алканмонооксигеназа из *Pseudomonas oleovorans*, называемая иногда *o*-гидроксилазой, которая имеет биядерный активный центр с карбоксилатным мостиком, катализирует гидроксирование *n*-алканов (C₅–C₁₂) по концевой метильной группе.¹⁴⁹ Описанная недавно бутанмонооксигеназа гидрокселирует бутан по концевой метильной группе с региоселективностью, превосходя-

щей 80%.¹⁵⁰ Так как стехиометрия реакций окисления с участием ω -гидроксилазы, цитохрома P450 и ММО одинаковая, предполагают, что активным интермедиатом первой также является оксокомплекс высоковалентного железа.¹⁵¹ Важным отличием структуры ω -гидроксилазы от ММО является преобладание донорных атомов азота в координационной сфере AlkB и наличие оксомостики между атомами железа.^{149, 152, 153} Несмотря на это, результаты работ^{154, 155} показывают, что механизм гидроксилирования алканов ТМО и ω -гидроксилазой имеет много общего с механизмом действия ММО. Все эти оксигеназы для эффективного катализа требуют участия регуляторного белка В, в присутствии которого их активность увеличивается в 30–150 раз.²⁸ Предполагают, что белок В облегчает доступ O_2 и метана к активному центру¹²⁵ и/или присоединение O_2 по мостиковому механизму за счет диссоциации связанной с атомом железа молекулы воды²⁸ либо изменения геометрии биядерного центра.¹²³

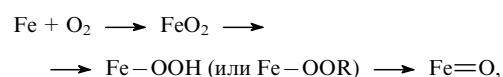
Таким образом, в последние годы наблюдаются существенные сдвиги в понимании природы сильнейшего окислителя в биологии — активного интермедиата ММО, обладающего исключительной способностью в мягких условиях осуществлять селективное окисление такой инертной молекулы, как метан. Важное различие между гемовыми и негемовыми оксигеназами состоит в том, что в первых атом железа находится в низкоспиновом состоянии, тогда как в последних он всегда высокоспиновый. Это, как будет показано ниже, приводит к большей реакционной способности негемовых оксигеназ. Несмотря на существенные различия в структуре активных центров, гемовые и негемовые монооксигеназы имеют много общего в механизмах активации O_2 и окисления алканов.

V. Стратегия Природы в окислении неактивированных C—H- и C=C-связей

Как уже отмечалось выше, различные оксигеназы имеют как сходства, так и различия. Все эти ферменты используют общую схему активации кислорода на комплексах железа с образованием по сути единого активного окислителя и однотипное взаимодействие последнего с углеводородами. Металлоцентр удерживает реакционноспособные кислородные интермедиаты в своей координационной сфере и позволяет избежать неконтролируемых радикальных реакций с их участием. Выдающаяся роль железа в метаболизме молекулярного кислорода, вероятно, обусловлена, с одной стороны,

его распространенностью в земной коре, а с другой — большим сродством к кислородным донорам и благоприятными редокс-характеристиками. Поэтому оксигеназный путь функционализации наиболее инертных неактивированных C—H- и C=C-связей в ходе эволюции был естественным образом встроен в общий метаболизм O_2 с участием соединений железа. Отсюда определенное сходство структуры активных центров железосодержащих оксигеназ с активными центрами соответствующих оксидаз, каталаз, пероксидаз и т.д.

В реакции с участием оксигеназ процесс восстановления молекулы O_2 включает перенос на нее четырех электронов. Этот процесс можно разделить на две двухэлектронные стадии: 1) активация O_2 с образованием окислительного агента — оксокомплекса высоковалентного железа (оксоферрильного, или феррильного, реагента) и 2) активация субстрата, сопровождаемая переносом атома O от окислительного агента на субстрат. Механизм активации O_2 включает связывание с атомом Fe(II), образование пероксоинтермедиата и последующее гомолитическое или гетеролитическое расщепление связи O—O с образованием феррильного комплекса железа, который и осуществляет оксигенирование углеводорода:



R — остаток кофактора.

Феррильные интермедиаты являются электрофильными агентами. Их первоначальное взаимодействие с C—H- и C=C-связями протекает по механизму, сходному для различных оксигеназ, — отрыв атома H от алканов или присоединение к ненасыщенной системе с образованием в обоих случаях радикального интермедиата $[\text{FeOH} \cdot \text{R}]$. Этот процесс приводит к активации углеводорода. На следующей стадии происходит рекомбинация радикала с $\text{HO}^\cdot$, приводящая к конечным продуктам. В табл. 2 представлены основные характеристики некоторых оксигеназ и строение их интермедиатов.

Структуры активных центров различных оксигеназ отличаются, что приводит к различиям в структуре их активных интермедиатов. Различна и активность оксигеназ: только ММО способна окислять метан. Для связывания O_2 необходим атом Fe(II), который присутствует только в «покоящемся» состоянии моноядерных негемовых оксигеназ. Поскольку цитохром P450 и ММО в «покоящемся» состоянии содержат атом Fe(III), для них процесс начинается с

Таблица 2. Характеристики основных типов оксигеназ.

Характеристика	Цитохром P450	Оксигеназа Риске	Гидроксилаза	ММО
Состояние Fe в «покоящемся» ферменте	Fe ^{III}	Fe ^{II}	Fe ^{II}	(Fe ^{III}) ₂
Стационарные лиганды ^a	N ₄ (S...H)	N ₂ O ₂	N ₂ O	2 NO ₃
Число лабильных лигандов ^b	1	2	3	4
Количество электронов в редокс-процессе	1	2	2	2
Источник электронов	NAD(P)H	NADH	RH ₂	NADH
Конфигурация атомов O в пероксидном интермедиате	$\eta^1\text{-OOH}$	$\eta^2\text{-OO(H)}$	$\eta^1\text{-OOR}$	$\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2^{\cdot-}$
Тип разрыва связи O—O	Гетеролитический	Гетеролитический	Гомолитический	Гомолитический
Феррильный интермедиат	P ⁺ Fe ^{IV} =O (PFe ^V =O)	Fe ^V =O(OH)	Fe ^{IV} =O	Fe ^{IV} —(μ-O) ₂ —Fe ^{IV} (O=Fe ^V —O—Fe ^{III})

^a Показаны координированные с металлом атомы, нижний индекс — их количество; ^b означает также число координационных мест, доступных для катализа.

переноса электрона. Важным отличием является источник и характер переноса электронов на координированную с металлом молекулу O_2 (см. табл. 2). Из четырех электронов, необходимых для полного восстановления O_2 , два электрона обычно поставляются субстратом (в случае диоксигеназ — все 4), а два других — биологическим восстановителем-донором электронов (или кофактором). В случае цитохрома P450, ММО и диоксигеназы Риске электроны поэтапно поставляются от NAD(P)H с образованием Fe(III)-пероксо- и Fe(V)-оксоинтермедиатов. В случае ряда моноядерных негемовых оксигеназ, требующих кофактора (например, 2-кетокислоты или тетрагидробиоптерина), два электрона поставляются от кофактора и одновременно, при этом образуются Fe(II)-пероксо- и Fe(IV)-оксоинтермедиаты.

Анализ литературы по оксигеназам показывает, что, несмотря на ряд структурных и функциональных отличий, между ними имеется много общего. Наиболее существенно, что в качестве основного и универсального окислителя для разнообразных реакций с участием различных оксигеназ выступают оксокомплексы высоковалентного железа.¹³

Представление о феррильном интермедиате перешло в биологию из химии в ходе длительной дискуссии о природе активного окислителя в системе Фентона ($Fe^{II} + H_2O_2$).¹⁵⁶ Данная система обладает большой окислительной силой, активируя довольно прочные связи C—H в различных соединениях. Общепринятым является представление, что это связано с участием радикала $HO^\bullet$, высокая реакционная способность которого хорошо известна. Однако высокая регио- и стереоселективность окисления циклогексанола в системе Фентона в ацетонитриле с образованием *цис*-циклогексан-1,3-диола предполагает участие в окислении феррильного интермедиата, поскольку такой результат в принципе невозможен для свободно диффундирующего радикала $HO^\bullet$ (см.⁷⁰).

Реакционная способность феррильных частиц обусловлена их электронной структурой, которую обычно рассчитывают методами квантовой химии или определяют из спектральных характеристик этих короткоживущих интермедиатов. Феррильная частица может быть простой (моноядерной) или сложной (бизидерной, как в ММО, или связанной с радикальным центром, как в цитохроме P450) и содержать атом железа в разных степенях окисления (IV, V, VI) и нескольких спиновых состояниях. Анализ экспериментальных и теоретических данных показывает, что прочность и длины связи Fe—O приблизительно одинаковы для всех моноядерных феррильных комплексов независимо от природы лигандов (гемовые или негемовые) степени окисления и спинового состояния. Это находит свое объяснение в значительном сходстве $d_\pi(Fe)$ — $p_\pi(O)$ -орбитальных взаимодействий, приводящих для всех этих частиц к довольно прочной ковалентной связи Fe—O.^{157, 158} На рис. 7 показана качественная картина связывания в ионе $[Fe=O]^{2+}$ ($S = 1$).¹⁵⁹ В симметричном октаэдрическом поле пять вырожденных 3d-орбиталей атома Fe образуют две группы: $t_{2g}(d_{xy}, d_{xz}, d_{yz})$ и $e_g(d_{x^2-y^2}, d_{z^2})$. Низкоэнергетические орбитали t_{2g} взаимодействуют с атомом O, образуя π -связи, тогда как высокоэнергетические орбитали включены в образование σ -связей. Взаимодействие d_{z^2} -орбитали атома Fe с одной из 2p-орбиталей атома кислорода приводит к связывающей и разрыхляющей (антисвязывающей) σ -орбиталям феррильной группы. Две другие 2p-орбитали атома O комбинируются с двумя $t_{2g}(d_{xz}, d_{yz})$ -орбиталями, образуя две связывающие и две антисвязывающие π -орбитали феррильной группы. Таким образом, частица $[Fe=O]$ содержит одну σ - и две

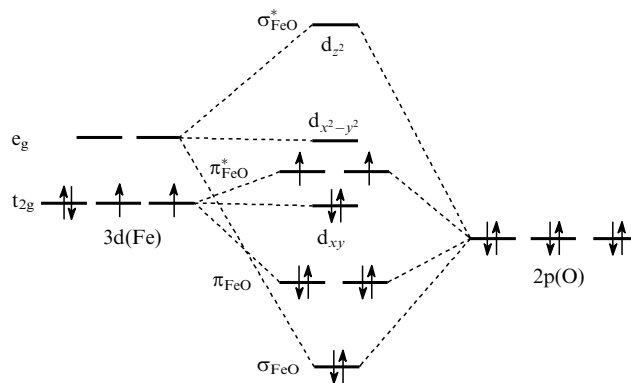


Рис. 7. Электронная структура и связывание в $Fe^{IV}=O$ -комплексах ($S = 1$).

половинные π -связи и имеет порядок связи Fe—O, равный 2. Прочная ковалентная π -связь во всех феррильных комплексах приводит к высокой плотности неспаренного электрона на атоме кислорода. Орбитали d_{xy} и $d_{x^2-y^2}$ являются несвязывающими, так как не принимают участия в образовании связи Fe—O. Десять электронов соответственно занимают низкоэнергетические орбитали, образуя электронную конфигурацию $(d_{xy})^2(d_{xz}, d_{yz})^2$ феррильного комплекса с ионом $[Fe=O]^{2+}$ ($S = 1$).

На рис. 8 приведены электронные конфигурации различных моноядерных феррильных комплексов, включающие только ключевые орбитали. Для комплексов $Fe^{IV}=O$ спиново-е основное состояние определяется силой лигандного поля в экваториальной плоскости (перпендикулярной связи Fe—O), поскольку экваториальные донорные атомы изменяют относительную энергию орбитали $d_{x^2-y^2}$. Низкоспиновому основному состоянию благоприятствуют сильные σ -донорные экваториальные лиганды, например амины. Высокоспиновому состоянию благоприятствуют слабополюные экваториальные лиганды, такие как кислородные доноры, а также удлинение связи Fe—N.¹⁵⁸

Рассмотрение особенностей электронной структуры феррильных комплексов целесообразно начать с экспериментально и теоретически наиболее изученных моноядерных комплексов $Fe^{IV}=O$. Хотя активные центры негемовых оксигеназ содержат атом железа в высокоспиновом состоянии, почти все синтезированные феррильные комплексы являются низкоспиновыми. Единственным исключением является аквакомплекс $[FeO(H_2O)_5]^{2+}$, который был получен обработкой озонном водного раствора соли Fe(II) (см.¹⁶⁰) и является единственным синтетическим высокоспиновым оксокомплексом железа, полностью охарактеризованным химически и спектроскопически.¹⁶¹ В кислом водном рас-

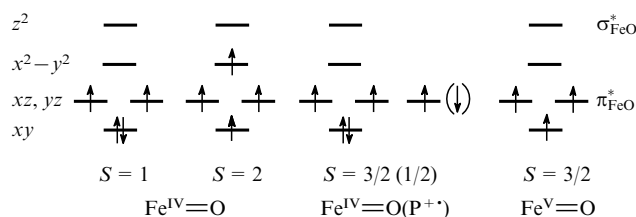


Рис. 8. Качественные орбитальные диаграммы электронной структуры феррильных комплексов.

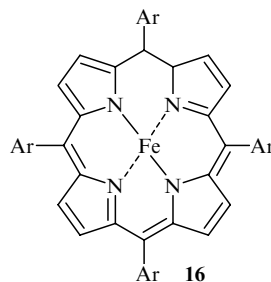
творе при комнатной температуре он устойчив в течение 10 с и ведет себя как сильный окислитель, отрывая атом Н от алканов и окисляя спирты до кетонов. Теоретический интерес к этому комплексу был связан в первую очередь с дискуссией о его роли в системе Фентона.¹⁶² Электронная структура^{161, 163, 164} катиона $[\text{FeO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ близка к электронной структуре несольватированного иона $[\text{Fe}=\text{O}]^{2+}$ вследствие слабых донорных свойств молекулы воды. Основное состояние частицы $[\text{FeO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ является высокоспиновым ($S = 2$): четыре орбитали содержат по одному электрону (квинтетное основное состояние, см. рис. 8). $3\sigma^*$ -Орбиталь является наинижней вакантной орбиталью и важной граничной орбиталью для взаимодействия с углеводородами. Высокоспиновое состояние должно быть более реакционно-способным вследствие понижения энергетического уровня наинижней незанятой σ^* -орбитали в результате сильной обменной стабилизации неспаренных электронов в этом состоянии. Такие выводы согласуются с высокой каталитической активностью негемовых оксигеназ, в координационном окружении которых преобладают кислородные доноры и феррильные интермедиаты которых находятся в высокоспиновом основном состоянии.

Как указывалось выше, группа $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ($S = 1$) входит в состав интермедиата Cpd I P450 и вместе с катион-радикалом порфирина ($S = 1/2$) образует почти вырожденное основное состояние из двух близко расположенных спиновых состояний — квартетного ($S = 3/2$) и дублетного ($S = 1/2$) (см. рис. 8). Кроме того, в отличие от негемовых систем большой набор орбиталей порфирина обуславливает плотный набор возбужденных состояний в Cpd I P450. Расчеты показывают, что электронный характер Cpd I P450 определяется степенью водородного связывания и полярностью окружения тиолатного лиганда.¹¹ В газовой фазе Cpd I имеет преимущественно S-радикальный характер вследствие значительной примеси р-орбитали атома серы к a_{2u} -орбитали порфирина, тогда как при учете водородного связывания и полярного окружения тиолатного лиганда это смешивание уменьшается и неспаренный электрон преимущественно локализуется на порфирине. Эти изменения влияют на реакционную способность интермедиата Cpd I и на относительную селективность гидроксирования и эпоксидирования пропена. Показано, что внешнее электростатическое поле вдоль оси связей $\text{S}-\text{Fe}-\text{O}$ приводит к изменению рассчитанного распределения спина между тиолатом и порфирином и одновременно к изменению региоселективности окисления. За это свойство изменять свою электронную структуру в зависимости от белкового окружения интермедиат Cpd I P450 получил название «химический хамелеон».¹⁶⁵

Относительно хорошо изучены только наиболее устойчивые $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}$ -комплексы с гемовыми или негемовыми лигандами и атомом железа в низкоспиновом состоянии ($S = 1$).²⁹ Сравнение экспериментальных и расчетных характеристик этих комплексов позволяет калибровать соответствующие квантово-химические расчеты и экстраполировать их на высокоспиновые интермедиаты природных оксигеназ.^{166, 167} Теоретическое исследование спектральных характеристик короткоживущих активных интермедиатов может облегчить их обнаружение.^{166, 168}

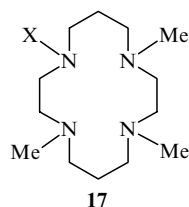
При низких температурах получены модельные шестикординатные феррильные комплексы типа $\text{P}^+ \text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ с тетраарилпорфириновым лигандом **16**, строение которых доказано различными спектральными методами, включая спектроскопию ЭПР и ЯМР ^1H , резонансную

спектроскопию КР, мёссбауэровскую и рентгеноабсорбционную спектроскопию.^{169, 170}



Ar = Ph (TPP) и др.

Моноядерный негемовый $[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]$ -комплекс был получен в реакции озона с комплексом железа, содержащим тетраметилцикламовый лиганд (**17**, $\text{X} = \text{CH}_2\text{CO}_2^-$), при -80°C и охарактеризован в растворе методом мёссбауэровской спектроскопии.¹⁷¹



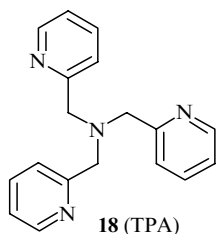
$\text{X} = \text{CH}_2\text{CO}_2^-$, Me (TMC), $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}^-$ (TMCS), CH_2Py .

Подобный комплекс с лигандом TMC (**17**, $\text{X} = \text{Me}$) удалось выделить в кристаллическом виде и установить его структуру с помощью РСА.¹⁷² В последние годы был синтезирован ряд биомиметических шестикординатных $[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]$ -комплексов с негемовыми лигандами, многие из которых были охарактеризованы структурными и спектральными методами.^{30, 31, 173} Хотя пока не удалось получить модельного гемового $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}$ -комплекса с тиолатным лигандом, был синтезирован и спектрально охарактеризован негемовый аналог интермедиата Cpd I P450 — комплекс $[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}(\text{TMCS})]^+$ (TMCS — лиганд **17**, $\text{X} = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}^-$).¹⁷⁴ В этом комплексе тиолатная группа стабилизирована благодаря ковалентной пришивке к триметилцикламу в пентадентатном лиганде TMCS.

Несмотря на огромные усилия, до настоящего времени не удалось зафиксировать и спектрально охарактеризовать высокоактивных короткоживущих феррильных интермедиатов некоторых оксигеназ, содержащих группировку с атомом железа в еще более высокоокисленном состоянии — $[\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}]$ (см. рис. 8). В известной степени это относится и к интермедиату Cpd I P450, который формально является соединением $[\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}]$. Недавно в экспериментах с использованием лазерного флэш-фотолиза коррозийного комплекса железа (аналога порфиринового комплекса) и CYP119 (см.³²) наблюдаемые спектры (см. табл. 1) были приписаны короткоживущим $[\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}]$ -интермедиатам. Однако проведенные QM/MM-расчеты (Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Calculations) для камфорного цитохрома P450_{cam} не подтвердили включения в реакцию $[\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}]$ -интермедиата, хотя и не исключали возможности участия других возбужденных состояний с более низким барьером отщепления атома Н.¹⁷⁵ Поскольку обнаружение таких интермедиатов возможно только с использованием тех или иных спектраль-

ных методов, надежные предсказания спектров этих интермедиатов на основании квантово-химических расчетов имеют огромное значение.¹⁶⁸ К сожалению, расчетов $[\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}]$ -интермедиатов пока очень мало.^{168, 176}

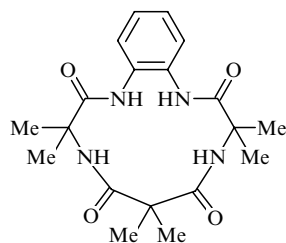
Теоретические расчеты были выполнены для интермедиата $[\text{HO}(\text{TPA})\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}]$ (TPA — трис(2-пиридилметил)-амин, лиганд **18**).



18 (TPA)

Образование последнего в модельных системах предполагается на основании включения меченого атома кислорода из воды в продукт окисления благодаря возможности быстрого обмена феррильного атома кислорода с водой.¹⁷⁷ Согласно расчету, модельная частица имеет квартетное ($S = 3/2$) основное состояние с довольно короткой связью $\text{Fe}-\text{O}$ (1.64 Å) и более длинной связью $\text{Fe}-\text{OH}$ (1.77 Å).^{178, 179} Длина связи $\text{Fe}-\text{O}$ и распределение спиновой плотности в основном состоянии близки к рассчитанным для интермедиата Cpd I P450 и родственных модельных комплексов. Однако, в отличие от Cpd I P450, TPA-лиганд не окисляется, и оба электрона для образования $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$ в этом случае передаются от атома железа.

Недавно удалось синтезировать и спектрально охарактеризовать первый модельный $[\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}]$ -комплекс со стойким к окислению тетраамидным макроциклическим лигандом TAML (**19**).¹⁸⁰



19 (TAML)

Стабилизация группы $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$ в относительно долгоживущем комплексе $[(\text{TAML})\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}]^-$ (несколько часов при -60°) возможна благодаря наличию в депротонированной форме лиганда четырех исключительно сильных доноров — амидных атомов азота. Спектроскопические данные и DFT-расчеты показывают, что этот комплекс является низкоспиновым ($S = 1/2$). Его наименьшее возбужденное состояние — Fe^{IV} — катион-радикал TAML ($S = 3/2$) — подобно соответствующему состоянию интермедиата Cpd I P450. Этот комплекс способен оксигенировать неактивированные связи $\text{C}-\text{H}$ и $\text{C}=\text{C}$, как и Cpd I P450.

Реакционная способность феррильной группы определяется наименьшими (незанятыми или полузанятыми) граничными МО, в качестве которых выступают $3\sigma^*$ - и $2\pi_{x,y}^*$ -орбитали. Относительный вклад этих акцепторных орбиталей во взаимодействие с донорной орбиталью субстрата определяется как их относительной энергией, так и степенью перекрывания с донорной орбиталью субстрата, причем перекрывание зависит от геометрических

факторов.¹⁸¹ Различие в активности высокоспиновых и низкоспиновых феррильных частиц обусловлено относительным вкладом таких орбиталей во взаимодействие с субстратом.¹⁸¹

При расчете процесса переноса атома O от $[\text{FeO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ на молекулу метана с образованием метанола установлено,¹⁸² что реакция следует механизму отщепления — рекомбинации. Первая стадия, включающая перенос атома водорода от метана к оксолиганду и образование комплекса $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OH}$ со связанным радикалом CH_3 , протекает относительно легко, так как одновременно с разрывом $\text{C}-\text{H}$ -связи образуется связь $\text{O}-\text{H}$. Радикал CH_3 связан с комплексом трехцентровой двухэлектронной связью, прочность которой промежуточная между прочностью водородной связи и обычной ковалентной связи. При удлинении $\text{C}-\text{H}$ -связи ее полярность сильно увеличивается, что стабилизирует переходное состояние реакции. Вторая стадия, приводящая к образованию связанного с комплексом метанола, также имеет низкий активационный барьер и является сильно экзотермической. Теория валентных связей¹⁸³ дает рациональное объяснение механизму отщепления — рекомбинации и позволяет с достаточной надежностью предсказать активационные барьеры стадии отрыва атома H для различных алканов.¹⁸⁴

Заслуживает внимания вопрос о возможной связи активности феррильных комплексов с примесью в их электронной структуре окисленных возбужденных состояний — $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}^\bullet$ и $\text{Fe}^{\text{IV}}-\text{O}^\bullet$ (см.^{185, 186}). Участие этих форм признано важным в переходном состоянии реакций феррильных интермедиатов.^{151, 181} Окислительная структура предполагается для феррильных частиц в железосодержащих цеолитах, способных окислять метан при комнатной температуре.¹⁸⁷ В отличие от хорошо разделенных низколежащих состояний молекулы O_2 , в случае иона $[\text{Fe}=\text{O}]^{2+}$ возбужденное состояние $^5\text{B}_2$ по энергии достаточно близко к основному.¹⁸⁸ По мнению авторов работы¹⁸⁸, в этом состоянии радикальные свойства иона $[\text{Fe}=\text{O}]^{2+}$ усиливаются, так как атом кислорода становится σ -радикалом, что предопределяет активность феррильного интермедиата по отношению к отрыву атома H. Однако большинство исследователей рассматривает высокую спиновую заселенность на оксолиганде как следствие ковалентной делокализации π -связей феррильного фрагмента.¹⁵⁸

Наблюдение, что реакции цитохрома P450 протекают так, как если бы в них участвовало несколько окислителей, привело к развитию концепции двухмаршрутной и многомаршрутной реактивности (Multi-State Reactivity, MSR),³³ истоки которой лежат в изучении газофазных реакций $\text{Fe}=\text{O}^+$ с H_2 .¹⁸⁹ Суть этой концепции в применении к оксокомплексам высококовалентных металлов состоит в возможности одновременного развития процесса по нескольким маршрутам (поверхностям потенциальной энергии, ППЭ), соответствующим различным спиновым состояниям. При этом различные состояния совместно дают набор различных интермедиатов и продуктов. В случае цитохрома P450 оксокомплекс в дублетном состоянии реагирует по согласованному механизму (безбарьерное оксигенирование), тогда как в квартетном состоянии — по постадийному механизму (с высоким барьером оксигенирования). Поскольку в области пересечения ППЭ энергии различных спиновых состояний близки, возможен переход с одной поверхности на другую (spin crossing). Такой переход на безбарьерную поверхность приводит к существенному ускорению процесса и его высокой стереоспецифичности.

Гидроксирование метана и пропана интермедиатом $[\text{HO}(\text{TPA})\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}]$, согласно расчетам, протекает на ППЭ квартетного состояния.¹⁷⁸ Однако, так как время жизни радикального интермедиата очень мало, этот процесс оказался эффективно согласованным, что объясняет преимущественно стереоспецифическое гидроксирование алканов, наблюдаемое экспериментально.¹⁷⁷ Расчет эффекта заместителей в пиридинных кольцах лиганда¹⁹⁰ показал, что электроноакцепторные группы снижают активационный барьер гидроксирования, тогда как электронодонорные — увеличивают. Введение в лиганд **18** шести NO_2 -групп понижает энергию активации до $12 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ (см.¹⁹⁰).

На реакционную способность гемовых и негемовых синтетических феррильных комплексов значительное влияние оказывают *цис*-экваториальные и *транс*-аксиальные лиганды.³⁴ Как показали расчеты,¹⁹¹ аксиальные лиганды регулируют активность высокоспиновых феррильных комплексов в активации субстрата, изменяя энергетический уровень акцепторной $3\sigma^*$ -орбитали. Активность увеличивается в ряду: $\text{NH}_3 < \text{MeCN} < \text{H}_2\text{O} \approx \text{H}_2\text{S} < \text{BF}_3 < 0$ (цифра 0 означает отсутствие аксиального лиганда). В последнем случае взаимодействие с метаном протекало бы без активационного барьера.

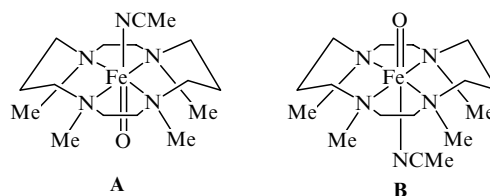
Теоретические расчеты дали вероятное объяснение влияния аксиальных лигандов на реакционную способность гемовых феррильных комплексов: ослабление донорными лигандами связи $\text{Fe}-\text{O}$ в переходном состоянии¹⁹² и изменение спинового состояния этих активных частиц.¹⁹³ Для негемовых оксокомплексов железа показано,¹⁹⁴ что, как и в случае порфириновых комплексов,¹⁹⁵ электроноакцепторные заместители в *цис*-положении увеличивают электрофильность $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ -центра. Эффект аксиальных лигандов в этих комплексах оказался более сильным и прямо противоположным: окислительная активность усиливалась электронодонорными заместителями. В отличие от гемовых оксигеназ, имеющих относительно жесткое порфирин-тиолатное координационное окружение, в случае негемовых оксигеназ различные лиганды могут занимать как *цис*-, так и *транс*-положения по отношению к оксогруппе, что предоставляет более широкие возможности в варьировании окислительных свойств нативных оксигеназ.

Концепция TSR применима также к негемовым низкоспиновым комплексам.¹⁹⁶ Экспериментальное и теоретическое исследование реакционной способности негемовых модельных комплексов $[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}(\text{TMC})\text{L}]^{2+(1+)}$, где $\text{L} = \text{MeCN}, \text{CF}_3\text{CO}_2^-, \text{N}_3^-, \text{RS}^-$, позволяют понять природу высокой реакционной способности цитохрома P450. Оказалось, что в то время как активность при переносе атома O на фосфин, в соответствии с ожиданием, увеличивается с ростом электрофильности феррильного комплекса, последовательность увеличения активности при отрыве атома H от C—H-связей неожиданно становится противоположной: $\text{MeCN} < \text{CF}_3\text{CO}_2^- < \text{N}_3^- < \text{RS}^-$, т.е. электронодонорный лиганд усиливает активность окислителя.^{197, 198} Такой результат удалось понять на основе концепции TSR.¹⁹⁹ Согласно этой концепции, все реакции включают два соседних спиновых состояния фрагмента $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$: основное — триплетное, имеющее высокий барьер, и возбужденное — квинтетное с более низким барьером реакции. На каждой из ППЭ барьеры уменьшаются с ростом электрофильности феррильного комплекса. Объяснение необычного ряда увеличения активности при отщеплении атома H состоит в том, что ППЭ квинтетного состояния «прорезается» через барьер триплетного состояния путем

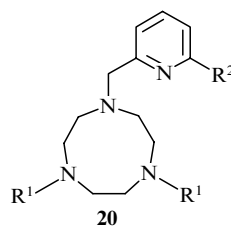
инверсии спина из триплетного состояния в квинтетное, обеспечивая тем самым низкоэнергетический маршрут для реакции. Увеличение электронодонорного характера аксиального лиганда уменьшает разность энергий триплетного и квинтетного состояний, облегчает инверсию и, следовательно, повышает роль более реакционноспособного квинтетного состояния в реакции. Это объясняет усиление тиолатным лигандом активности интермедиата Cpd I P450 в реакции отрыва атома H от алканов. Таким образом, в случае высших организмов Природа использует менее агрессивный реагент, который, однако благодаря присутствию аксиального цистеинового остатка обеспечивает низкоэнергетический, наиболее эффективный путь реакции.

Электрофильность феррильной группы в интермедиате Cpd I понижена вследствие ярко выраженных донорных свойств порфирина и тиолат. Экспериментально и теоретически было показано, что тиолатный лиганд увеличивает основность феррильного комплекса.^{46, 76} Предполагают, что высокая основность является стратегией Природы, обеспечивающей отщепление атома H от алканов при более низком редокс-потенциале, который защищает белковое окружение от окислительной деструкции.⁷⁷

Большие возможности воздействовать на феррильный центр, изменяя его ближайшее окружение, продемонстрированы недавно на моделях феррильного комплекса с цикламмовым лигандом.²⁰⁰ Показано, что даже небольшие изменения в координационной сфере атома железа могут оказывать сильное влияние на реакционную способность феррильного комплекса. Например, изменение расположения аксиальных лигандов, оксогруппы и ацетонитрила, существенно увеличивает окислительную силу комплекса **A** по сравнению с комплексом **B**.



Подобным образом небольшие вариации R^1 и R^2 в лиганде **20** оказывают сильное влияние на селективность и стереоспецифичность окисления циклогексана при катализе соответствующим комплексом железа.²⁰¹



$\text{R}^1 = \text{Me}, \text{Pr}^i; \text{R}^2 = \text{H}, \text{Me}.$

Как показывают QM/MM-расчеты и многочисленные экспериментальные наблюдения, белковое окружение сильно влияет на скорость и селективность реакций феррильных интермедиатов.^{202, 203} Большой энтропийный вклад в свободную энергию активации отрыва атома H от субстрата, связанный с потерей поступательных и вращательных степеней свободы, фермент компенсирует на стадии связывания субстрата путем гидрофобных взаимодействий. За счет этого, например, свободная энергия активации для гидр-

оксилирования камфоры с участием $P450_{cam}$ уменьшается на величину порядка $10 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ (см.²⁰⁴). Изменение положения и динамики соседних аминокислотных остатков белковой молекулы вблизи активного центра позволяет снизить активационный барьер не только путем стабилизации переходного состояния, но и увеличением вклада эффекта туннелирования,²⁰⁵ которое играет большую роль во взаимодействии феррильного комплекса с соединениями, содержащими C—H-связи.²⁰⁶

Недавно с помощью направленных мутаций была достигнута химическая эволюция некоторых форм цитохрома P450 с целью «настройки» на окисление простых углеводов, не являющихся их естественными субстратами.²⁰⁷ Получение новых, значительно более эффективных форм моделирует процесс эволюции этой оксигеназы в природе и показывает, что «настройка» на субстрат состоит в поиске наиболее оптимальной конфигурации фермент-субстратного комплекса.

Несмотря на то что моноядерные оксигеназы, включая цитохром P450, способны окисгенировать прочные связи C—H, для окисления метана Природа выбрала биядерный центр. Предполагается, что активной частицей является интермедиат, содержащий фрагмент $Fe^V=O-Fe^{III}$ (см.^{132, 208}), и что роль второго льюисовского центра состоит в усилении электрофильности феррильного комплекса¹⁹¹ для атаки на очень прочную C—H-связь метана. Впрочем, природу исключительно высокой активности ММО еще предстоит установить.

Большинство оксигеназ являются многокомпонентными ферментами, и взаимодействие между белковыми компонентами часто является решающим в «настройке» активности. Особенно это относится к так называемым «эффекторным» белкам. Хотя в настоящее время имеется ряд гипотез, структурные основы эффекторной функции этих белков окончательно еще не установлены.^{28, 209}

Таким образом, Природа применяет самую разнообразную тактику в общей стратегии окислительной активации C—H- и C=C-связей на основе феррильных интермедиатов. Высокая активность и исключительная селективность оксигеназ достигается на разных уровнях их иерархической организации, начиная от иона металла и его ближайшего координационного окружения и вплоть до многокомпонентных взаимодействий в ферментной системе. Для решения задачи конструирования катализатора окислительной функционализации самых инертных связей, включая C—H-связи в метане, необходимо было примирить два взаимоисключающих требования: создать агент исключительной реакционной способности и обеспечить возможность оперировать им селективно и без ущерба для молекул, составляющих основу живых систем. Природа успешно справилась с этой задачей. Изучение различных оксигеназ, создание и исследование их химических моделей и квантово-химические расчеты процессов, протекающих с участием ферментов и моделей, позволяют понять стратегию Природы в окислении неактивированных C—H- и C=C-связей и использовать ее опыт в человеческой практике.

VI. Перспективы биомиметического окисления

Инертность углеводов существенно ограничивает их использование. В то же время отсутствие эффективных методов селективного окисления неактивированных C—H- и C=C-связей в сложных многофункциональных молекулах составляет серьезную проблему в тонком органическом син-

тезе. Обе проблемы успешно решены созданием за миллиарды лет эволюции эффективных и селективных природных катализаторов — железосодержащих оксигеназ. Все это вдохновляет химиков на разработку аналогичных катализаторов, например, на основе высоковалентных оксокомплексов металлов, подобных активным интермедиатам оксигеназ. Высокая активность и селективность таких систем достигаются путем дизайна первой и второй координационной сферы металлокомплексов на основе биомиметических лигандов, по необходимости закрепленных на относительно жестком каркасе (scaffold), так как особенно важна организация активного центра. В биомиметических катализаторах можно соединить преимущества биологических и химических систем. Химики не ограничены в выборе материала и могут использовать другие переходные металлы (Mn, Ru, Co, Cu, Ni и др.) и любые лиганды. Задача состоит в том, чтобы при минимальном дизайне достичь конечной цели — создания химических катализаторов, не уступающих оксигеназам по своей эффективности и селективности. Поскольку такие катализаторы важны как для синтетической химии, так и для химической промышленности, в последние годы биомиметическое окисление с участием синтетических комплексов вызывает большой интерес.^{6, 7, 35, 210}

Первыми простыми моделями цитохрома P450, позволившими осуществить перенос атома O к двойным связям алкенов и связям C—H алканов, были тетраарилпорфириновые комплексы железа **16** — $Fe(TPP)Cl$ и др., — использовавшиеся в качестве катализаторов гидроксирования алканов и эпексидирования алкенов иодозобензолом.^{211, 212}

Впоследствии эти модели были существенно улучшены введением электроноакцепторных заместителей в фенильные группы порфирина, а затем и полным галогенированием порфиринового макроцикла, что уменьшило окислительное разрушение лиганда и усилило реакционную способность интермедиата.^{36, 213} На основе таких электронодефицитных порфиринов созданы весьма эффективные катализаторы, обеспечивающие высокий выход продуктов при высоких скоростях окисления углеводов, в том числе инертных *n*-алканов.^{214, 215} Наибольшего развития достигли модели с использованием доноров атома O, таких как H_2O_2 , $PhIO$, $NaOCl$ и др., тогда как создание моделей на основе O_2 тормозилось трудностью устранения конкуренции между субстратом и восстановителем за активный кислород.

Биомиметическое окисление сохраняет многие замечательные черты биокаталитического окисления. Селективность образования основного продукта обычно выше 80%, а в большинстве случаев достигает 90–100%. При этом скорость окисления может быть очень высокой. Так, скорость селективного гидроксирования третичной связи C—H в адамантане при 65°C составляет 1000 оборотов катализатора в минуту.²¹⁶ Наблюдается высокая регио- и стереоселективность процесса.^{37, 170, 177} Эффективность использования окислителя в большинстве случаев выше 60%. Особенно привлекательным для биомиметического окисления углеводов является применение H_2O_2 как дешевого и экологически чистого окислителя.³⁴ В последние годы было показано, что биомиметическое окисление алканов пероксидом водорода может быть достигнуто с удовлетворительной эффективностью при использовании негемовых комплексов,^{37, 177} а в случае моделей цитохрома P450 — комплексов с электронодефицитными порфиринами.^{214, 217, 218}

Модификация ближайшего окружения у атома O, связанного с металлом, например путем введения объемных или

хиральных групп в *орто*-положения фенильных колец ТРР, позволяет влиять на регио- и энантиоселективность окисления. С использованием Fe- и Mn-комплексов бинафтилзамещенного порфирина было осуществлено каталитическое асимметрическое моноокиснирование алканов, алкенов и алкилсульфидов.²¹⁹ Введение объемных заместителей в порфирин изменяет региоселективность окисления *n*-алканов в сторону увеличения доли продуктов окисления по концевой (ω) метильной группе и/или соседней с ней метиленовой ($\omega-1$) группе,²²⁰ причем селективность образования первичных спиртов достигает 26–30%.^{221, 222} Возможность образования первичных спиртов из *n*-алканов приближает эти системы к ω -гидроксилазе.

При переходе от простых стерически затрудненных металлопорфиринов к системам с гидрофобными полостями, построенными либо путем ковалентной «привязки» молекул с полостями (циклодекстринов, циклофанов), либо путем самосборки в организованные молекулярные ансамбли с использованием нековалентных взаимодействий, были созданы весьма совершенные модели цитохрома P450.³⁸ Однако большинство таких моделей предназначено для эпоксирирования алкенов — задачи, несомненно, более простой, чем гидроксилирование алканов.

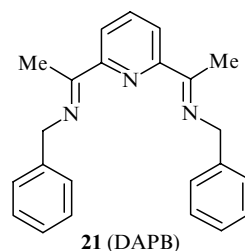
Синтезировано большое число негемовых биомиметических комплексов, способных катализировать окисление неактивированных связей C—H и C=C пероксидом водорода.^{37, 177, 223–225} На основе негемовых комплексов железа и других переходных металлов предложен ряд систем для селективного окиснирования алкенов.^{224–227} В отличие от порфириновых комплексов эти соединения оказались способными также катализировать *цис*-дигидроксилирование алкенов пероксидом водорода, подобно негемовым оксигеназам Риске. При их использовании отношение диол:эпоксид определяется природой лигандного окружения и изменяется в пределах 0.1–14, а эффективность использования окислителя достигает 85%.²²⁶ Соответствующий дизайн лиганда позволяет осуществить с этими комплексами асимметрическое *цис*-дигидроксилирование с 97%-ным энантиомерным избытком.²²⁸

В присутствии комплексов железа с лигандом **20** циклогексан окисляется пероксидом водорода с эффективностью (*N*) до 64 оборотов катализатора и до 74% использования реагента. При окислении олефинов с образованием смеси эпоксида и диола *N* достигает 252.²⁰¹

Марганцевый комплекс с лигандом **20** селективно эпоксирует *цис*-олефины перуксусной кислотой, осуществляя более 1000 оборотов при конверсии > 98% и селективности > 99%.²²⁹ Комплекс Mn с тридентатным азотным лигандом (триазациклононаном) и хиральным карбоксилатом катализирует энантиоселективное *цис*-дигидроксилирование олефинов пероксидом водорода с *N* > 2000.²³⁰

Большой интерес представляют комплексы железа с тетрадентатными азотными лигандами **17–20** и др., позволяющие осуществить стереоспецифическое (вплоть до 100%) окисление алканов пероксидом водорода.¹⁷⁷ Проведено эффективное и селективное гидроксилирование алканов *m*-хлорпероксибензойной кислотой при катализе Ni(II)(TPA) и родственными комплексами.²³¹ При комнатной температуре катализатор делает около 600 оборотов в час, образуя почти исключительно спирт (отношение спирт:кетон $\approx$ 40). При окислении циклогексана пероксидом водорода в атмосфере аргона при 50°C в присутствии каталитической системы Fe(ClO₄)₃—DAPB—MeCN (DAPB — лиганд **21**)²³² получен 93%-ный суммарный выход спирта и кетона

(в пересчете на углеводород) при 100%-ной селективности процесса. Эффективное каталитическое окисление алканов различными пероксидными соединениями с *N* до 7500 оборотов достигнуто с катализатором на основе системы Os^{VI}—кислота Льюиса.²³³



21 (DAPB)

Специально приготовленные железосодержащие цеолиты оказались эффективными биомиметическими катализаторами прямого окисления бензола в фенол оксидом азота(I) (N₂O) с селективностью, близкой к 100%, при 50%-ной конверсии бензола.²³⁴

В последние годы появилось несколько работ^{235–237}, в которых успешно использована стратегия молекулярного узнавания для направленного каталитического окисления определенных C—H-связей в сложной молекуле в присутствии более реакционноспособных связей. Например, высокоселективное гидроксилирование стероидных молекул в положение 9 удалось осуществить в водной среде с помощью биомиметического Mn-порфиринового катализатора с пришитыми к нему несколькими молекулами циклодекстрина. Последние должны обеспечивать гидрофобное связывание субстрата и точную ориентацию C—H-связи при атоме C(9) по отношению к атакующему ее активному кислороду. Подобно цитохрому P450, этот катализатор обладает хорошей субстратной селективностью, превосходной регио- и стереоселективностью и позволяет осуществлять до 3000 каталитических оборотов.²³⁵ Селективное гидроксилирование стероидов в положение 9 имеет большой практический интерес для фармацевтической химии.

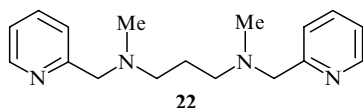
В работе²³⁶ был описан биядерный комплекс марганца с двумя тридентатными азотными лигандами, содержащими жестко закрепленные COOH-группы. Каждая из этих групп может взаимодействовать посредством водородных связей с карбоксилатной группой субстрата, такого как ибупрофен, ориентируя его таким образом, чтобы только одна C—H-связь была доступна для окиснирования. Этот катализатор позволил осуществить окисление субстратов, способных принимать различные конформации, с *N* до 700 и очень высокой (> 98%) регио- и стереоселективностью.^{236, 237}

Сделаны первые шаги в биомиметическом окислении метана. Прежде всего следует упомянуть высокоселективное (100%-ное) стехиометрическое окисление метана до метанола оксидом азота(I) при комнатной температуре с участием биядерного комплекса железа на поверхности цеолита FeZSM-5.^{238, 239} При исследовании методом мёссбауэровской спектроскопии обнаружено участие в этом процессе двух долгоживущих интермедиатов, подобных интермедиатам **P** и **Q** ММО.²⁴⁰ Пероксидный интермедиат был охарактеризован также с помощью электронной спектроскопии и спектроскопии КР.²⁴¹ Показано, что при обработке бензолом полосы поглощения интермедиата исчезают, а появляется спектр фенола, координированного к атому железа. Аналогичные Si-содержащие цеолиты катализируют селективное окисление молекулярным кислородом метана и других низших алканов до спиртов при 125°C.²⁴² Получены спектральные

доказательства участия в этом процессе бис-μ-оксокомплексов меди,²⁴³ структурно сходных с предполагаемым активным окислителем ММО.

Наконец, недавно проведено²⁴⁴ каталитическое окисление метана пероксидом водорода в воде до MeOH, CH₂O и HCOOH при 25–60° с участием биядерного фталоцианинового комплекса железа, содержащего фрагмент Fe^{III}–N=Fe^{IV}. Максимальное общее число оборотов, которое было достигнуто в этой реакции, равно 438, а выход продуктов в пересчете на пероксид составил 30–50%. Спектральные и изотопные исследования указывают на участие в этом процессе пероксидного и/или феррильного (O=Fe^V–N=Fe^{IV}) интермедиатов.²⁴⁴

Создание биомиметических систем для окисления углеводородов молекулярным кислородом²⁴⁵ является более сложной задачей, поскольку требует высокой степени организации катализатора, в частности, для устранения конкуренции между субстратом и восстановителем за активный кислород. Тем не менее в последнее время появились определенные надежды на создание таких систем. Например, пиридиламинный комплекс Fe(III) [L³₄Fe^{III}(Cl)(μ-O)Fe^{III}Cl₃] (L³₄ — лиганд **22**) катализирует селективное гидроксирование *n*-гексана в системе O₂–восстановитель–донор протонов с *N* до 50.²⁴⁶ В цитируемой работе в качестве восстановителя использован триметилгидрохинон, и авторы предполагают участие в окислении феррильного интермедиата.



22

Каталитическое окисление молекулярным кислородом и образование из O₂ феррильного комплекса, стабилизированного цикламным лигандом, были проведены в присутствии источника электронов и протонов — спиртов,²⁴⁷ аскорбиновой кислоты или системы BPh₄[–]–HClO₄.²⁴⁸ И если в условиях исследования²⁴⁷ предполагается механизм активации O₂ с участием двух атомов железа, как в ММО, то авторы работы²⁴⁸ представили серьезные доказательства необходимости для этих процессов источника протонов и электронов. Это согласуется с промежуточным образованием пероксидного интермедиата, предшествующего феррильному комплексу, и моделирует механизм активации O₂ цитохромом P450 и диоксигеназой Риске.

В последние годы появляется все больше работ, посвященных препаративному биомиметическому окислению углеводородов. Негемные комплексы железа позволили осуществить 90%-ное превращение алкена в эпоксид с затратой всего 1.5 экв. пероксида водорода.²⁴⁹ Доступный и дешевый фенантролиновый комплекс железа оказался эффективным катализатором препаративного эпоксирирования алкенов с использованием в качестве окислителя перуксусной кислоты.²⁵⁰ Наконец, почти 100%-ное превращение алкена в эпоксид было достигнуто с использованием H₂O₂ и 0.5 мол.% комплекса железа с тетраденатным азотным лигандом (TPA) в смеси ацетонитрила с уксусной кислотой,²⁵¹ которая ингибирует образование диола.

Исследования в области биомиметического окисления заложили также основы для создания препаративных мето-

дов селективного окисления неактивированных С–Н- и С=C-связей в сложных многофункциональных молекулах. Кроме упомянутых выше примеров направленного окисления стероидов²³⁵ и ибупрофена,²³⁶ можно отметить эффективное одностадийное окисление одной из С–Н-связей многофункциональной молекулы артемизинина без введения защитных или активирующих групп.²⁵² Под действием пероксида водорода из артемизинина образуется стереохимически чистый продукт (выход 45%) с сохранением лабильных функциональных групп.

Таким образом, в результате усилий химиков сконструированы лиганды и получены активные биомиметические катализаторы для окисления самых прочных связей с эффективностью до сотен и тысяч оборотов. Показана возможность достижения высокой хемо-, регио-, стерео- и энантиоселективности при достаточно большой конверсии субстрата и экономном использовании окислителя. Эти исследования исключительно важны для развития «зеленой химии». Хотя применение биомиметических катализаторов для многоотонной функционализации углеводородов с целью более рационального использования нефтегазового сырья пока еще представляет отдаленную перспективу, такие катализаторы уже сейчас могут быть востребованы для создания инновационных окислительных процессов в тонком органическом синтезе и фармацевтической химии. В соответствии с уроками Природы и используя огромный арсенал средств химической науки, на пути дальнейшего дизайна и синтеза более организованных и устойчивых к окислению лигандов можно ожидать новых интересных результатов.²⁵³

Литература

1. A.E.Shilov, G.B.Shul'pin. *Chem. Rev.*, **97**, 2879 (1997)
2. B.L.Conley, W.J.Tenn III, K.J.H.Young, S.K.Ganesh, S.K.Meier, V.R.Ziatdinov, O.Mironov, J.Oxgaard, J.Gonzales, W.A.Goddard III, R.A.Periana. *J. Mol. Catal. A*, **251**, 8 (2006)
3. *Active Oxygen in Biochemistry*. (Eds J.S.Valentine, C.S.Foote, A.Greenberg, J.F.Liebman). Chapman and Hall, London, 1995
4. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*. (Ed. P.R.Ortiz de Montellano). Plenum, New York, 1995
5. P.E.M.Siegbahn. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **11**, 695 (2006)
6. A.E.Shilov. *Metal Complexes in Biomimetic Chemical Reactions*. CRC Press, New York, 1997
7. Е.И.Карасевич, В.С.Куликова, А.Е.Шилов, А.А.Штейнман. *Успехи химии*, **67**, 376 (1998)
8. M.Sono, M.P.Roach, E.D.Coulter, J.D.Dawson. *Chem. Rev.*, **96**, 2841 (1996)
9. I.G.Denisov, T.M.Makris, S.G.Sligar, I.Schlichting. *Chem. Rev.*, **105**, 2253 (2005)
10. B.Meunier, S.P.de Visser, S.Shaik. *Chem. Rev.*, **104**, 3947 (2004)
11. S.Shaik, D.Kumar, S.P.de Visser, A.Altun, W.Thiel. *Chem. Rev.*, **105**, 2279 (2005)
12. G.H.Loew, D.L.Harris. *Chem. Rev.*, **100**, 407 (2000)
13. J.M.Bollinger Jr., C.Krebs. *J. Inorg. Biochem.*, **100**, 586 (2006)
14. J.M.Mayer. *Acc. Chem. Res.*, **31**, 441 (1998)
15. M.Costas, M.P.Mehn, M.P.Jensen, L.Que Jr. *Chem. Rev.*, **104**, 939 (2004)
16. M.M.Abu-Omar, A.Loaiza, N.Hontzeas. *Chem. Rev.*, **105**, 2227 (2005)
17. R.P.Hausinger. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **39**, 21 (2004)
18. T.J.Kappock, J.P.Caradonna. *Chem. Rev.*, **96**, 2659 (1996)
19. A.Bassan, T.Borowski, P.E.M.Siegbahn. *Dalton Trans.*, 3153 (2004)
20. C.Krebs, D.G.Fujimori, C.T.Walsh, J.M.Bollinger Jr. *Acc. Chem. Res.*, **40**, 484 (2007)

21. A.Bassan, M.R.A.Blomberg, T.Borowski, P.E.M.Siegbahn. *J. Inorg. Biochem.*, **100**, 727 (2006)
22. M.Merkx, D.A.Kopp, M.H.Sazinsky, J.L.Blazyk, J.Müller, S.J.Lippard. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **40**, 2783 (2001)
23. B.J.Wallar, J.D.Lipscomb. *Chem. Rev.*, **96**, 2625 (1996)
24. M.-H.Baik, M.Newcomb, R.A.Friesner, S.J.Lippard. *Chem. Rev.*, **103**, 2385 (2003)
25. K.E.Liu, S.J.Lippard. In *Advances in Inorganic Chemistry. Vol. 42*. (Ed. A.G.Sykes). Academic Press, San Diego, CA, 1995. P. 263
26. E.I.Solomon, T.C.Brunold, M.I.Davis, J.N.Kemsley, S.-K.Lee, N.Lehnert, F.Neese, A.J.Skulan, Y.-S.Yang, J.Zhou. *Chem. Rev.*, **100**, 235 (2000)
27. R.A.Friesner, M.-H.Baik, B.F.Gherman, V.Guallar, M.Wirstam, R.B.Murphy, S.J.Lippard. *Coord. Chem. Rev.*, **238–239**, 267 (2003)
28. M.H.Sazinsky, S.J.Lippard. *Acc. Chem. Res.*, **39**, 558 (2006)
29. J.T.Groves, Y.Z.Han. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*. (Ed. P.R.Ortiz de Montellano). Plenum, New York, 1995. P. 3
30. X.Shan, L.Que Jr. *J. Inorg. Biochem.*, **100**, 421 (2006)
31. L.Que Jr. *Acc. Chem. Res.*, **40**, 493 (2007)
32. R.Zhang, M.Newcomb. *Acc. Chem. Res.*, **41**, 468 (2008)
33. S.Shaik, H.Hirao, D.Kumar. *Acc. Chem. Res.*, **40**, 532 (2007)
34. W.Nam. *Acc. Chem. Res.*, **40**, 522 (2007)
35. *Biomimetic Oxidations Catalyzed by Transition Metal Complexes*. (Ed. B.Meunier). Imperial College Press, London, 2000
36. D.Dolphin, T.G.Traylor, L.Y.Xie. *Acc. Chem. Res.*, **30**, 251 (1997)
37. Y.Mekmouche, C.Duboc-Toia, S.Menage, C.Lambeaux, M.Fontecave. *J. Mol. Catal. A*, **156**, 85 (2000)
38. M.C.Feeters, A.E.Rowan, R.J.M.Nolte. *Chem. Soc. Rev.*, **29**, 375 (2000)
39. S.Tanase, E.Bouwman. *Adv. Inorg. Chem.*, **58**, 29 (2006)
40. M.J.Coon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 378 (2005)
41. I.Schlichting, C.Jung, H.Schulze. *FEBS Lett.*, **415**, 253 (1997)
42. N.L.Poulos, B.C.Finzel, P.J.Howard. *J. Mol. Biol.*, **195**, 687 (1987)
43. E.E.Scott, Y.A.He, M.R.Wester, M.A.White, C.C.Chin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13196 (2003)
44. D.E.Benson, K.S.Suslick, S.G.Sligar. *Biochemistry*, **36**, 5104 (1997)
45. I.Schlichting, J.Berendzen, K.Chu, A.M.Stock, S.A.Maves, D.A.Benson, R.M.Sweet, D.Ringe, G.A.Petsko, S.G.Sligar. *Science*, **287**, 1615 (2000)
46. F.Ogliaro, S.P.de Visser, S.Shaik. *J. Inorg. Biochem.*, **91**, 554 (2002)
47. K.P.Vatsis, H.-M.Peng, M.J.Coon. *J. Inorg. Biochem.*, **91**, 542 (2002)
48. D.L.Harris, G.H.Loew, L.Waskell. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 4308 (1998)
49. A.R.Groenhorst, A.W.Ehlers, K.Lammertsma. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 6204 (2007)
50. D.L.Harris, G.H.Loew. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8941 (1998)
51. H.P.Hersleth, U.Ryde, P.Rydberg, C.H.Görbitz, K.K.Andersson. *J. Inorg. Biochem.*, **100**, 460 (2006)
52. M.Sundaramoorthy, J.Terner, T.L.Poulos. *Chem. Biol.*, **5**, 461 (1998)
53. A.Zaks, D.R.Dodds. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 10419 (1995)
54. D.G.Kellner, S.C.Hung, K.E.Weiss, S.G.Sligar. *J. Biol. Chem.*, **277**, 9641 (2002)
55. Y.Urano, T.Higuchi, M.Hirobe, T.Nagano. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 12008 (1997)
56. N.Suzuki, T.Higuchi, Y.Urano, K.Kikuchi, H.Uekusa, Y.Ohashi, T.Uchida, T.Kitagawa, T.Nagano. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 11571 (1999)
57. T.Ueno, Y.Kousumi, K.Yoshizawa-Kumagaye, K.Nakajima, N.Ueyama, T.Okamura, A.Nakamura. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 12264 (1998)
58. P.M.Champion. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3433 (1989)
59. M.Filatov, N.Harris, S.Shaik. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 399 (1999)
60. R.Davydov, T.M.Makris, V.Kofman, D.E.Werst, S.G.Sligar, B.M.Hoffman. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1403 (2001)
61. M.Newcomb, R.E.P.Chandrasena. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 394 (2005)
62. T.Spolitak, J.H.Dawson, D.P.Ballou. *J. Biol. Chem.*, **280**, 20300 (2005)
63. T.M.Makris, K.von Koenig, I.Schlichting, S.G.Sligar. *J. Inorg. Biochem.*, **100**, 507 (2006)
64. X.Sheng, J.H.Horner, M.Newcomb. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 13310 (2008)
65. S.H.Kim, R.Perera, L.P.Hager, J.H.Dawson, B.M.Hoffman. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 5598 (2006)
66. A.Dey, A.Ghosh. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 3206 (2002)
67. R.Zhang, N.Nagraj, D.S.P.Lansakara, L.P.Hager, M.Newcomb. *Org. Lett.*, **8**, 2731 (2006)
68. Z.Pan, R.Zhang, M.Newcomb. *J. Inorg. Biochem.*, **100**, 524 (2006)
69. S.Jin, T.A.Bryson, J.H.Dawson. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **9**, 644 (2004)
70. J.T.Groves. *J. Inorg. Biochem.*, **100**, 434 (2006)
71. R.E.P.Chandrasena, K.P.Vatsis, M.J.Coon, P.F.Hollenberg, M.Newcomb. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 115 (2004)
72. E.Derat, D.Kumar, H.Hirao, S.Shaik. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 473 (2006)
73. S.P.de Visser, F.Ogliaro, S.Shaik. *Chem. Commun.*, 2322 (2001)
74. S.Shaik, S.P.de Visser, F.Ogliaro, H.Schwarz, D.Schroder. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **6**, 556 (2002)
75. J.M.Mayer. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **55**, 363 (2004)
76. R.K.Behan, L.M.Hoffart, K.L.Stone, C.Krebs, M.T.Green. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 11471 (2006)
77. M.T.Green, J.H.Dawson, H.B.Gray. *Science*, **304**, 1653 (2004)
78. M.L.Neidig, E.I.Solomon. *Chem. Commun.*, 5843 (2005)
79. K.D.Koehn, J.P.Emerson, L.Que Jr. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **10**, 87 (2005)
80. V.Purpero, G.R.Moran. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **12**, 587 (2007)
81. C.J.Schofield, Z.Zhang. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 722 (1999)
82. P.F.Fitzpatrick. *Biochemistry*, **42**, 14083 (2003)
83. D.T.Gibson, R.E.Parales. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 235 (2000)
84. B.Kauppi, K.Lee, E.Carredano, R.E.Parales, D.T.Gibson. *Structure (London)*, **6**, 571 (1998)
85. D.R.Boyd, T.D.H.Bugg. *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 181 (2006)
86. E.L.Hegg, L.Que Jr. *Eur. J. Biochem.*, **250**, 625 (1997)
87. E.I.Solomon, A.Decker, N.Lehnert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 3589 (2003)
88. A.Beck, A.Barth, E.Hubner, N.Burzlaff. *Inorg. Chem.*, **42**, 7182 (2003)
89. P.D.Oldenburg, A.A.Shteinman, L.Que Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 15673 (2005)
90. E.I.Solomon. *Inorg. Chem.*, **40**, 3656 (2001)
91. P.K.Grzycka, M.J.Ryle, G.R.Monterosso, J.Liu, D.P.Ballou, R.P.Hausinger. *Biochemistry*, **44**, 3845 (2005)
92. G.Schenk, M.Y.M.Pau, E.I.Solomon. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 505 (2004)
93. E.G.Kovaleva, J.D.Lipscomb. *Science*, **316**, 453 (2007)
94. A.Karlsson, J.V.Parales, R.E.Parales, D.T.Gibson, H.Eklund, S.Ramaswamy. *Science*, **299**, 1039 (2003)
95. M.D.Wolfe, J.D.Lipscomb. *J. Biol. Chem.*, **278**, 829 (2003)
96. L.P.Wackett, L.D.Kwart, D.T.Gibson. *Biochemistry*, **27**, 1360 (1988)
97. M.D.Wolfe, J.V.Parales, D.T.Gibson, J.D.Lipscomb. *J. Biol. Chem.*, **276**, 1945 (2001)
98. S.Chakrabarty, R.N.Austin, D.Deng, J.T.Groves, J.D.Lipscomb. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 3514 (2007)

99. P.D.Oldenburg, C.-Y.Ke, A.A.Tipton, A.A.Shteinman, L.Que Jr. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 7975 (2006)
100. J.M.Bollinger Jr., J.C.Price, L.M.Hoffard, E.W.Barr, C.Krebs. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 4245 (2005)
101. C.Krebs, J.C.Price, J.Baldwin, L.Saleh, M.T.Green, J.M.Bollinger Jr. *Inorg. Chem.*, **44**, 742 (2005)
102. J.C.Price, E.W.Barr, T.E.Glass, C.Krebs, J.M.Bollinger Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 13008 (2003)
103. J.C.Price, E.W.Barr, B.Tirupati, J.M.Bollinger Jr., C.Krebs. *Biochemistry*, **42**, 7497 (2003)
104. D.A.Proshlyakov, T.F.Henshaw, G.R.Monterosso, M.J.Ryle, R.P.Hausinger. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 1022 (2004)
105. P.J.Riggs-Gelasco, J.C.Price, R.B.Guyer, J.H.Brehm, E.W.Barr, J.M.Bollinger Jr., C.Krebs. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8108 (2004)
106. S.Sinnecker, N.Svensen, E.W.Barr, S.Ye, J.M.Bollinger Jr., F.Neese, C.Krebs. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 6168 (2007)
107. L.M.Hoffard, E.W.Barr, R.B.Guyer, J.M.Bollinger Jr., C.Krebs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 14738 (2006)
108. D.P.Halonić, E.W.Barr, C.T.Walsh, J.M.Bollinger Jr., C.Krebs. *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 113 (2007)
109. S.P.de Visser. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 9813 (2006)
110. L.C.Błasiak, F.H.Vaillancourt, C.T.Walsh, C.L.Drennan. *Nature (London)*, **440**, 368 (2006)
111. D.A.Kopp, S.J.Lippard. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **6**, 568 (2002)
112. R.L.Lieberman, A.C.Rosenzweig. *Dalton Trans.*, 3390 (2005)
113. D.A.Whittington, S.J.Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 827 (2001)
114. T.Lovell, J.Li, L.Noodleman. *Inorg. Chem.*, **40**, 5267 (2001)
115. D.J.Rudd, M.H.Sazinsky, M.Merkx, S.J.Lippard, B.Hedman, K.O.Hodgson. *Inorg. Chem.*, **43**, 4579 (2004)
116. B.F.Gherman, S.J.Lippard, R.A.Friesner. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1025 (2005)
117. A.C.Rosenzweig, P.Nordlund, P.M.Takahara, C.A.Frederick, S.J.Lippard. *Chem. Biol.*, **2**, 409 (1995)
118. T.Lovell, J.Li, L.Noodleman. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **7**, 799 (2002)
119. B.J.Brazeau, J.D.Lipscomb. *Biochemistry*, **39**, 13503 (2000)
120. A.M.Valentine, S.S.Stahl, S.J.Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 3876 (1999)
121. S.S.Stahl, W.A.Francisco, M.Merkx, J.P.Klinman, S.J.Lippard. *J. Biol. Chem.*, **276**, 4549 (2001)
122. B.J.Brazeau, B.J.Wallar, J.D.Lipscomb. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 10421 (2001)
123. J.K.Schwartz, P.Wei, K.H.Mitchell, B.G.Fox, E.I.Solomon. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 7098 (2008)
124. B.J.Brazeau, J.D.Lipscomb. *Biochemistry*, **42**, 5618 (2003)
125. H.Zheng, J.D.Lipscomb. *Biochemistry*, **45**, 1685 (2006)
126. L.Shu, J.C.Nesheim, K.Kauffmann, E.Münck, J.D.Lipscomb, L.Que Jr. *Science*, **275**, 515 (1997)
127. A.A.Shteinman. *FEBS Lett.*, **362**, 5 (1995)
128. A.A.Штейнман. *Изв. АН. Сер. хим.*, 1676 (1997)
129. A.A.Shteinman. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **4**, 325 (1998)
130. B.F.Gherman, M.-H.Baik, S.J.Lippard, R.A.Friesner. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 2978 (2004)
131. L.Que Jr. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3933 (1997)
132. P.E.M.Siegbahn. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **6**, 27 (2001)
133. B.D.Dunietz, M.D.Beachy, Y.Cao, D.A.Whittington, S.J.Lippard, R.A.Friesner. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2828 (2000)
134. H.Busch, K.Mogi, D.G.Musaev, K.Morokuma. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 7249 (1999)
135. T.Lovell, W.-G.Han, T.Liu, L.Noodleman. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 5890 (2002)
136. M.Torrent, T.Vreven, D.G.Musaev, K.Morokuma, O.Farkas, H.B.Schlegel. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 192 (2002)
137. D.Rinaldo, D.M.Philipp, S.J.Lippard, R.A.Friesner. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 3135 (2007)
138. M.Hoffmann, I.V.Khavrutskii, D.G.Musaev, K.Morokuma. *Int. J. Quantum Chem.*, **99**, 972 (2004)
139. M.-H.Baik, B.F.Gherman, R.A.Friesner, S.J.Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 14608 (2002)
140. E.A.Ambundo, R.A.Friesner, S.J.Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 8770 (2002)
141. V.Guallar, B.F.Gherman, W.H.Miller, S.J.Lippard, R.A.Friesner. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 3377 (2002)
142. A.M.Valentine, B.Wilkinson, K.E.Liu, S.Komar-Panicucci, N.D.Priestley, P.G.Williams, H.Morimoto, H.G.Floss, S.J.Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 1818 (1997)
143. E.Notomista, A.Lahm, A.Di Donato, A.Tramontano. *J. Mol. Evol.*, **56**, 435 (2003)
144. J.D.Pikus, J.M.Studts, C.Achim, K.E.Kauffmann, E.M.Münck, R.J.Steffan, K.McClay, B.G.Fox. *Biochemistry*, **35**, 9106 (1996)
145. J.D.Pikus, K.H.Mitchell, K.McClay, R.J.Steffan, B.G.Fox. *J. Inorg. Biochem.*, **74**, 236 (1999)
146. M.H.Sazinsky, J.Bard, A.Di Donato, S.J.Lippard. *J. Biol. Chem.*, **279**, 30600 (2004)
147. D.A.Whittington, A.C.Rosenzweig, C.A.Frederick, S.J.Lippard. *Biochemistry*, **40**, 3476 (2001)
148. L.J.Murray, R.Garcia-Serres, S.Naik, B.H.Huynh, S.J.Lippard. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7458 (2006)
149. J.Shanklin, C.Achim, H.Schmidt, B.Fox, E.Münck. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2981 (1997)
150. B.L.Dubbels, L.A.Sayavedra-Soto, D.J.Arp. *Microbiology*, **153**, 1808 (2007)
151. A.G.Katopodis, K.Wimalasena, J.Lee, S.W.May. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7928 (1984)
152. J.Shanklin, E.Whittle. *FEBS Lett.*, **545**, 188 (2003)
153. J.B.van Beilen, T.H.M.Smits, F.Z.Roos, T.Brunner, S.B.Balada, M.Röthlisberger, B.Witholt. *J. Bacteriol.*, **187**, (2005)
154. L.Moe, Z.Hu, D.Deng, R.N.Austin, J.T.Groves, B.G.Fox. *Biochemistry*, **43**, 15688 (2004)
155. E.Bertrand, R.Sakai, E.Rozhkova-Novosad, L.Moe, B.G.Fox, J.T.Groves, R.N.Austin. *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 1998 (2005)
156. C.Walling. *Acc. Chem. Res.*, **31**, 155 (1998)
157. A.Ghosh, E.Tangen, H.Ryeng, P.R.Taylor. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 4555 (2004)
158. F.Neese. *J. Inorg. Biochem.*, **100**, 716 (2006)
159. W.A.Nugent, J.M.Mayer. *Metal-Ligand Multiple Bonds*. Wiley, New York, 1988
160. O.Pestovsky, A.Bakac. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 13757 (2004)
161. O.Pestovsky, S.Stoian, E.L.Bominaar, X.Shan, E.Münck, L.Que Jr., A.Bakac. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **44**, 6871 (2005)
162. F.Buda, B.Ensing, M.C.M.Gribnau, E.J.Baerends. *Chem. – Eur. J.*, **7**, 2775 (2001)
163. M.J.Louwse, E.J.Baerends. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **9**, 156 (2007)
164. F.Buda, B.Ensing, M.C.M.Gribnau, E.J.Baerends. *Chem. – Eur. J.*, **9**, 3436 (2003)
165. F.Ogliaro, S.P.de Visser, J.T.Groves, S.Shaik. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **40**, 2874 (2001)
166. J.C.Schöneboom, F.Neese, W.Thiel. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 5840 (2005)
167. A.Decker, J.-U.Rohde, L.Que Jr., E.I.Solomon. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 5378 (2004)
168. J.F.Berry, S.D.George, F.Neese. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **10**, 4361 (2008)
169. T.Wolter, W.Meyer-Klaucke, M.Muther, D.Mandon, H.Winkler, A.X.Trautwein, R.Weiss. *J. Inorg. Biochem.*, **78**, 117 (2000)
170. J.T.Groves, J.Lee, S.S.Maria. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 6269 (1997)
171. C.A.Grappnerhaus, B.Mienert, E.Bill, T.Weyhermüller, K.Wieghardt. *Inorg. Chem.*, **39**, 5306 (2000)
172. J.-U.Rohde, J.H.In, M.H.Lim, W.W.Brennessel, M.R.Bukowski, A.Stubna, E.Münck, W.Nam, L.Que Jr. *Science*, **299**, 1037 (2003)

173. T.A.Jackson, J.-U.Rohde, M.S.Seo, C.V.Sastri, R.DeHont, T.Ohta, A.Stubna, T.Kitagawa, E.Münck, W.Nam, L.Que Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 12394 (2008)
174. M.R.Bukowski, K.D.Koehntop, A.Stubna, E.L.Bominaar, J.A.Halfen, E.Münck, W.Nam, L.Que Jr. *Science*, **310**, 1000 (2005)
175. A.Altun, S.Shaik, W.Thiel. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 8978 (2007)
176. S.P.de Visser, D.Kumar, R.Newmann, S.Shaik. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **43**, 5661 (2004)
177. K.Chen, L.Que Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 6327 (2001)
178. A.Bassan, M.R.A.Blomberg, P.E.M.Siegbahn, L.Que Jr. *Chem. – Eur. J.*, **11**, 692 (2005)
179. A.Bassan, M.R.A.Blomberg, P.E.M.Siegbahn, L.Que Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 11056 (2002)
180. F.T.de Oliveira, A.Chanda, D.Banerjee, X.Shan, S.Mondal, L.Que Jr., E.L.Bominaar, E.Münck, T.J.Collins. *Science*, **315**, 835 (2007)
181. M.L.Neidig, A.Decker, O.W.Choroba, F.Huang, M.Kawana, G.R.Moran, J.B.Spencer, E.I.Solomon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12966 (2006)
182. B.Ensing, F.Buda, M.C.M.Gribnau, E.J.Baerends. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 4355 (2004)
183. S.Shaik, P.C.Hiberty. *A Chemist's Guide to Valence Bond Theory*. Wiley-Interscience, New York, 2007
184. S.Shaik, D.Kumar, S.P.de Visser. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 10128 (2008)
185. V.Balland, M.-F.Charlot, F.Banse, J.-J.Girerd, T.A.Mattioli, E.Bill, J.-F.Bartoli, P.Battioni, D.Mansuy. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 301 (2004)
186. A.V.Nemukhin, I.A.Topol, R.E.Cachau, S.K.Burt. *Theor. Chem. Acc.*, **115**, 348 (2006)
187. G.D.Pirngruber, J.-D.Grunwaldt, P.K.Roy, J.A.Van Bokhoven, O.Safonova, P.Glatsel. *Catal. Today*, **126**, 127 (2007)
188. S.Malykhin, I.Zilberberg, G.M.Zhidomirov. *Chem. Phys. Lett.*, **414**, 434 (2005)
189. D.Schröder, S.Shaik, H.Schwarz. *Acc. Chem. Res.*, **33**, 139 (2000)
190. Y.Ma, P.B.Balbuena. *J. Phys. Chem. B*, **111**, 2711 (2007)
191. L.Bernarsconi, M.J.Louwerse, E.J.Baerends. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 3023 (2007)
192. T.Kamachi, T.Kouno, W.Nam, K.Yoshizawa. *J. Inorg. Biochem.*, **100**, 751 (2006)
193. S.P.de Visser. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **11**, 168 (2006)
194. Y.Zhou, X.Shan, R.Mas-Balleste, M.R.Bukowski, A.Stubna, M.Chakrabarti, L.Slominski, J.A.Halfen, E.Münck, L.Que Jr. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **47**, 1896 (2008)
195. Y.M.Goh, W.Nam. *Inorg. Chem.*, **38**, 914 (1999)
196. H.Hirao, D.Kumar, L.Que Jr., S.Shaik. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 8590 (2006)
197. C.V.Sastri, J.Lee, K.Oh, Y.J.Lee, J.Lee, T.A.Jackson, K.Ray, H.Hirao, W.Shin, J.A.Halfen, J.Kim, L.Que Jr., S.Shaik, W.Nam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19181 (2007)
198. J.-U.Rohde, L.Que Jr. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **44**, 2255 (2005)
199. H.Hirao, L.Que Jr., W.Nam, S.Shaik. *Chem. – Eur. J.*, **14**, 1740 (2008)
200. K.Ray, J.England, A.T.Fiedler, M.Martinho, E.Münck, L.Que Jr. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **47**, 8068 (2008)
201. A.Company, L.Gómez, X.Fontrodona, X.Ribas, M.Costas. *Chem. – Eur. J.*, **14**, 5727 (2008)
202. J.C.Schöneboom, S.Cohen, H.Lin, S.Shaik, W.Thiel. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 4017 (2004)
203. V.Guallar, R.A.Friesner. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8501 (2004)
204. S.P.de Visser, F.Ogliaro, P.K.Sharma, S.Shaik. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 11809 (2002)
205. A.Kohen, J.P.Klinman. *Acc. Chem. Res.*, **31**, 397 (1998)
206. Z.Pan, J.H.Horner, M.Newcomb. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 7776 (2008)
207. R.Fasan, M.M.Chen, N.C.Crook, F.H.Arnold. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **46**, 8414 (2007)
208. G.T.Rowe, E.V.Rybak-Akimova, J.P.Caradonna. *Inorg. Chem.*, **46**, 10594 (2007)
209. B.J.Brazeau, B.J.Wallar, J.D.Lipscomb. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**, 143 (2003)
210. A.A.Штейнман. *Изв. АН. Сер. хим.*, 1712 (2001)
211. J.T.Groves, T.E.Nemo. *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 6243 (1983)
212. D.Mansuy, J.F.Bartoli, M.Momenteau. *Tetrahedron Lett.*, **23**, 2781 (1982)
213. B.Meunier. *Chem. Rev.*, **92**, 1411 (1992)
214. J.F.Bartoli, P.Battioni, W.R.DeFoor, D.Mansuy. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 23 (1994)
215. M.J.Nappa, C.A.Tolman. *Inorg. Chem.*, **24**, 4711 (1985)
216. J.T.Groves, M.Bonchio, N.Carofiglio, K.Shalyaev. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 8961 (1996)
217. D.Mansuy. *C.R. Chimie*, **10**, 392 (2007)
218. W.Nam, M.H.Lim, S.-Y.Oh, J.H.Lee, H.J.Lee, S.K.Woo, C.Kim, W.Shin. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **39**, 3646 (2000)
219. J.T.Groves, P.J.Viski. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8537 (1989)
220. А.М.Хенкин, А.А.Штейнман. *Кинетика и катализ*, **30**, 7 (1989)
221. B.R.Cook, T.J.Reinert, K.S.Suslick. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 7281 (1986)
222. А.Б.Сорокин, А.М.Хенкин, С.А.Маракушев, А.Е.Шилов, А.А.Штейнман. *Докл. АН СССР*, **279**, 939 (1984)
223. K.Chen, M.Costas, L.Que Jr. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 672 (2002)
224. M.Klopstra, G.Roelfes, R.Hage, R.M.Kellogg, B.L.Feringa. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 846 (2004)
225. J.Bautz, P.Comba, C.L.de Laorden, M.Menzel, G.Rajaraman. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **46**, 8067 (2007)
226. P.D.Oldenburg, L.Que Jr. *Catal. Today*, **117**, 15 (2006)
227. A.Murphy, G.Dubois, T.D.P.Stack. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 5250 (2003)
228. K.Suzuki, P.D.Oldenburg, L.Que Jr. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **47**, 1887 (2008)
229. I.Garcia-Bosch, A.Company, X.Fontrodona, X.Ribas, M.Costas. *Org. Lett.*, **10**, 2095 (2008)
230. J.W.de Boer, W.R.Browne, S.R.Harutyunyan, L.Bini, T.D.Tiemersma-Wegman, P.L.Alsters, R.Hage, B.L.Feringa. *Chem. Commun.*, 3747 (2008)
231. T.Nagataki, K.Ishii, Y.Tachi, S.Itoh. *Dalton Trans.*, 1120 (2007)
232. B.Retcher, J.S.Costa, J.Tang, R.Hage, P.Gamez, J.Reedijk. *J. Mol. Catal. A*, **286**, 1 (2008)
233. S.-M.Yiu, W.-L.Man, T.-C.Lau. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 10821 (2008)
234. G.I.Panov, A.K.Uriarte, M.A.Rodkin, V.I.Sobolev. *Catal. Today*, **41**, 365 (1998)
235. J.Yang, B.Gabriele, S.Belvedere, Y.Huang, R.Breslow. *J. Org. Chem.*, **67**, 5057 (2002)
236. S.Das, C.D.Incarvito, R.H.Crabtree, G.W.Brudvig. *Science*, **312**, 1941 (2006)
237. S.Das, G.W.Brudvig, R.H.Crabtree. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 1628 (2008)
238. G.I.Panov, V.I.Sobolev, K.A.Dubkov, V.N.Parmon, N.S.Ovanesyan, A.E.Shilov, A.A.Shteinman. *React. Kinet. Catal. Lett.*, **61**, 251 (1997)
239. K.A.Dubkov, N.S.Ovanesyan, A.A.Shteinman, E.V.Starokon, G.I.Panov. *J. Catal.*, **207**, 341 (2002)
240. N.S.Ovanesyan, K.A.Dubkov, A.A.Pyalling, A.A.Shteinman. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **246**, 149 (2000)
241. H.Xia, Keq.Sun, Kej.Sun, Z.Feng, W.X.Li, C.Li. *J. Phys. Chem. C*, **112**, 9001 (2008)
242. P.J.Smeets, M.H.Groothaert, R.A.Schoonheydt. *Catal. Today*, **110**, 303 (2005)
243. M.H.Groothaert, P.J.Smeets, B.F.Sels, P.A.Jacobs, R.A.Schoonheydt. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1394 (2005)

244. A.B.Sorokin, E.V.Kudrik, D.Bouchu. *Chem. Commun.*, 2562 (2008)
245. G.B.Shul'pin. *C.R. Chimie*, **6**, 163 (2003)
246. N.Raffard-Pons, Y.Moll, F.Banse, K.Miki, M.Nierlich, J.-J.Girerd. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1941 (2002)
247. S.O.Kim, C.V.Sastri, M.S.Seo, J.Kim, W.Nam. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4178 (2005)
248. A.Thibon, J.England, M.Martinho, V.G.Young Jr., J.R.Frisch, R.Guillot, J.-J.Girerd, E.Münck, L.Que Jr., F.Banse. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **47**, 7064 (2008)
249. M.C.White, A.G.Doyle, E.N.Jacobsen. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 7194 (2001)
250. G.Dubois, A.Murphy, T.D.P.Stack. *Org. Lett.*, **5**, 2469 (2003)
251. R.Mas-Balleste, L.Que Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 15964 (2007)
252. M.S.Chen, M.C.White. *Science*, **318**, 783 (2007)
253. D.-L.Popescu, A.Chanda, M.J.Stadler, S.Mondal, J.Tehranchi, A.D.Ryabov, T.J.Collins. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 12260 (2008)

IRON-CONTAINING OXYGENASES: STRUCTURE, MECHANISM OF ACTION AND MODELLING

A.A.Shteinman

Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences

1, Prosp. Akad. Semenova, 142432 Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation,

Fax +7(496)522–3507

The most recent advances in the studies of the structure and mechanism of action of iron-containing oxygenases are considered. Examples of chemical modelling of these enzymes are given, which is of great importance for the design of effective mimetic catalysts for selective hydrocarbon oxidation and directed oxygenation of non-activated C–H and C=C bonds in complex multifunctional molecules.

Bibliography — 253 references.

Received 28th May 2008