



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Copper complexes as biomimetic models of catechol oxidase: mechanistic studies

Koval, I.A.

Citation

Koval, I. A. (2006, February 2). *Copper complexes as biomimetic models of catechol oxidase: mechanistic studies*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4295>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4295>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Короткий зміст

Ця дисертація присвячена синтезу комплексів міді(II), що є моделями активного центру мідьвмісного ензиму типу-3 катехолоксидази, та вивченню механізму каталітичного окислення субстрату (катехолу) цими сполуками. Даний тип протеїнів також включає в себе білок гемоціанін, що є переносчиком кисню у родини молюсків та клішоногих, та ензим тирозиназу, що каталізує гідроксилування орто-положення амінокислоти L-тироzinу з утворенням сполуки, відомої під назвою L-DOPA, і її подальше окислення до відповідного бензохінону. Ця реакція є критичною стадією в процесі утворення пігменту меланіну, що відповідає за темне забарвлення шкіри та шерстяного покриву у ссавців, і за потемніння пошкоджених тканин при доступі кисню повітря у рослини.

Катехолоксидаза найчастіше зустрічається в рослинах та деяких молюсках та каталізує окислення великої кількості орто-дифенолів (катехолів) у відповідні бензохінони, що аутополімеризуються з утворенням меланіну. Остання реакція призначена захищати пошкоджені тканини від патогенних впливів. Характерною рисою протеїнів типу-3 є таким чином їх здатність активувати і зв'язувати молекулярний кисень за звичайних умов та, у випадку катехолоксидази та тирозинази, застосовувати його для селективного окислення органічних субстратів. Через цю властивість вивчення структури цих природних сполук та дослідження загальних принципів їх каталітичної дії є цікавою і важливою темою, завдяки можливому застосуванню синтетичних моделей цих протеїнів у якості промислових каталізаторів в органічних окислювальних процесах.

Кристалічна структура катехолоксидази у декількох формах (*мет*, відновленій (*деоксі*) та у комплексі з інгібітором тіосечовиною) була визначена методом рентгеноструктурного аналізу Кребсом та співробітниками декілька років тому.¹ Активний центр катехолоксидази містить два іони міді, кожен з яких оточений трьома амінокислотними залишками гістидину. У *мет* формі обидва іони міді мають ступінь окислення +2 і знаходяться на короткій відстані (2.9 Å) один від одного завдяки гідроксидному містку між ними. Наявність цього місткового ліганда є також причиною сильної антиферомагнітної взаємодії між двома іонами міді, що в результаті призводить до відсутності сигналу в спектрі електронного парамагнітного резонансу цього ензиму. Ця ознака є загалом характерною рисою спектральних властивостей протеїнів типу-3 в окисленому стані (Cu^{II}). У відновленій *деоксі* формі обидва іони міді мають ступінь окислення +1, та відстань між ними є значно довшою (4.4 Å).

Не зважаючи на те, що структура катехолоксидази відома, точний механізм дії цього ензиму є невизначеним до цього часу. Загальноприйнятий на даний момент механізм, запропонований Кребсом та співробітниками,¹ включає в себе

стехіометричне окислення одної молекули субстрату *мет* формою, та подальше зв'язування молекулярного кисню утвореною *деоксі* формою. Це призводить до утворення пероксо-мідного інтермедіату, що в свою чергу окислює другу молекулу субстрату на наступній стадії ензиматичного циклу з утворенням молекули води як побічного продукту. Проте декілька альтернативних механізмів, заснованих зокрема на вивченні механізмів каталітичної активності модельних сполук,^{2,3} та на квантово-механічних обчисленнях,⁴ було також запропоновано різними авторами. На даний момент значна увага дослідників привернута зокрема до таких аспектів каталітичного механізму, як спосіб координації субстрату до двоядерного активного центру (містковий, монодентатний, хелатний),⁵⁻⁷ роль незвичного сірковуглецевого зв'язку у активному центрі ензиму⁸ та структура проміжного мідно-кисневого аддукту.⁹⁻¹¹

В першому розділі цієї дисертації представлений загальний огляд модельних сполук катехолоксидази, описаних в літературі, та розглянуті методи, які використовувалися різними авторами з метою вивчення механізму каталітичної реакції. Другий розділ розглядає синтез фенолвмісного ліганду Нру3asym, що був синтезований з метою моделювання асиметричного оточення двох іонів міді у активному центрі ензиму, і структуру та властивості двоядерного комплексу $[\text{Cu}_2(\text{py3asym})(\text{H}_2\text{O})_{1.5}(\text{NO}_3)_{2.5}](\text{NO}_3)_{0.5}$. Ліганд Нру3asym містить тридентатний та дводентатний замісники у відповідно 2 та 6 положеннях фенольного кільця і таким чином може потенційно забезпечити асиметрію координаційних чисел двох іонів міді у відповідних двоядерних комплексах. Розроблена стратегія синтезу цього ліганду може бути успішно застосована для синтезу споріднених фенолвмісних лігандів.¹²

Розділ 3 описує структури та властивості шести нових комплексів міді(II), кобальту(II) та мангану(II) з фенолвмісним лігандом Нру2ald, що містить тридентатний піридинвмісний замісник та альдегідну групу в двох орто-положеннях по відношенню до фенольної групи ароматичного кільця. За рахунок присутності слабого донора (альдегідної групи) в цьому ліганді структури вищезгаданих комплексів значною мірою залежать від донорних властивостей аніонів. Таким чином, використання солей металів з такими слабо координуючимися аніонами, як перхлорат і тетрафтороборат, призводить до утворення двоядерних комплексів зі співвідношенням металу до ліганду 2:2, у яких два іони металу з'єднані двома містковими кисневими атомами депротонованих фенольних груп двох лігандів. В той же час, присутність сильних донорів на зразок нітрату, броміду або хлориду перешкоджає координації слабого донора альдегідної групи, що призводить до утворення комплексів з зовсім іншими структурними властивостями, у яких альдегідна група не координована до іону металу.

Розділ 4 описує синтез симетричного фенолвмісного ліганду Нру2th2s, що містить піридинову та тіофенову функціональні групи. Цей ліганд був синтезований з метою моделювання незвичного сірковуглецевого зв'язку в активному центрі катехолоксидази, що призводить до присутності некоординованого атому сірки поблизу одного з двох атомів міді у активному центрі.¹ Два комплекси міді(II) з цим лігандом $[\text{Cu}_2(\text{py}2\text{th}2\text{s})(\mu\text{-Cl})\text{Cl}_2]$ і $[\text{Cu}_2(\text{py}2\text{th}2\text{s})(\mu\text{-Br})\text{Br}_2]$ були синтезовані та вивчені методом рентгеноструктурного аналізу. Обидва іони міді в цих комплексах пентакоординовані і зв'язані кисневим атомом депротонованої фенольної групи ліганду та іоном галогену. Обидва комплекси не проявляють каталітичних властивостей, що може бути викликано присутністю сильного донора (іону галогена) в якості місткового ліганду між двома іонами металу. Вивчення взаємодії комплексів з модельним субстратом тетрахлорокатехолом у розчині показали, що ці місткові ліганди дійсно не можуть бути заміщеними на субстрат, хоча у випадку хлоридного комплексу один з апікально розташованих іонів хлору заміщується на катехол. Ці результати підкреслюють важливість впливу місткових лігандів на каталітичні властивості двоядерних мідних комплексів, оскільки здатність місткового ліганду заміщуватися на субстрат є однією з необхідних умов для каталітичної активності.

Розділ 5 розглядає синтез асиметричного фенолвмісного ліганду Нру2th1as, що містить тіофеновий замісник в 6 позиції ароматичного кільця. Два комплекси міді(II) з цим лігандом $[\text{Cu}_2(\text{H}2\text{py}2\text{th}1)\text{Cl}_2](\text{CuCl}_4)_2$ і $[\text{Cu}_2(\text{H}2\text{py}2\text{th}1)\text{Cl}_2](\text{ClO}_4)_4 \cdot 6\text{CH}_3\text{OH}$ було синтезовано і охарактеризовано методом монокристалного рентгеноструктурного аналізу. Не зважаючи на велику подібність цих сполук, основною відмінністю яких є різні аніони, кристалічні упаковки цих комплексів суттєво різняться. Зокрема, нехарактерна π -стекингова взаємодія між ароматичними кільцями тіофенових замісників та містковими іонами хлору спостерігається в першому з комплексів, в той час як в перхлоратному комплексі тіофенові групи є акцептором водневих зв'язків.

Розділи 6-8 розглядають синтез, структуру та фізико-хімічні властивості комплексів міді(II) і міді(I) з двома азотовмісними макроциклічними лігандами $[\text{22}]\text{py}4\text{pz}$ і $[\text{22}]\text{pr}4\text{pz}$, що містять відповідно 8 і 6 донорних атомів азоту, і розглядають механізм каталітичного окислення катехолу комплексами міді(II) з цими лігандами. Розділ 6 також описує детальне вивчення парамагнітного двоядерного комплексу міді(II) з гідроксидним містковим лігандом $[\text{Cu}_2([\text{22}]\text{py}4\text{pz})(\mu\text{-OH})(\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ методом протонного ядерного магнітного резонансу, та магнітні і спектральні властивості даної сполуки.

Механізм окислення 3,5-ди-*терт*-бутилкатехолу (DTBCH_2), який здебільшого застосовується як модель субстрату в лабораторних дослідженнях, двоядерним мідним комплексом $[\text{Cu}_2([\text{22}]\text{py}4\text{pz})(\mu\text{-OH})(\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ було вивчено

шляхом окремого дослідження кожної стадії каталітичного циклу. На першій стадії стехіометрична реакція комплексу з субстратом, яка не потребує участі кисню, призводить до утворення одного молярного еквіваленту хінону та відновленого двоядерного комплексу міді(I). Цей комплекс було також охарактеризовано методом монокристалного рентгеноструктурного аналізу. Реакція останньої сполуки з киснем призводить до утворення транс- μ -1,2-пероксо-мідного аддукту,¹³ що окислює другу молекулу катехолу, утворюючи вихідний двоядерний комплекс міді(II) з гідроксидним містком між двома іонами міді. Ця реакція протікає у дві послідовні стадії: спочатку протон однієї з фенольних груп субстрату зв'язується з мідно-кисневим аддуктом, призводячи до утворення дуже активного проміжного комплексу, який на наступній стадії власне окислює субстрат. Вивчення цього проміжного продукту методами Раман, ультрафіолетової та видимої спектроскопії, та методом електронного парамагнітного резонансу дозволило припустити, що він є двоядерним гідропероксидним комплексом міді(II) складу $[\text{Cu}_2([\text{22}]\text{py}4\text{pz})(\text{OOH})]^{3+}$. Окислення молекули субстрату цим інтермедіатом призводить до відновлення гідропероксидної групи до води. Загальний механізм каталітичної реакції таким чином нагадує раніше запропонований Кребсом та співавторами¹ механізм каталітичного циклу катехолоксидази. Основною відмінністю між двома механізмами є структура пероксо-мідного аддукту: в той час як μ - η^2 : η^2 -пероксо-мідний комплекс був запропонований для ензиму,¹ в даному випадку реакція молекулярного кисню з відновленим комплексом міді(I) призводить до утворення транс- μ -1,2-пероксо-мідного інтермедіату. Даний випадок також є першим прикладом окислення катехолу транс- μ -1,2-пероксо-мідним комплексом.

Розділ 8 розглядає механізм каталітичного окислення катехолу комплексом міді(II) $[\text{Cu}_2([\text{22}]\text{pr}4\text{pz})(\text{CO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2(\text{CF}_3\text{SO}_3)_4 \cdot 2\text{CH}_3\text{CN} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ у метанолі. Цей тетраядерний кластер за високої концентрації ($\gg 14$ ммоль/л) є стабільним у розчині, проте дисоціює з утворенням двох двоядерних фрагментів при розведенні. Два іони міді в макроциклічному кільці зв'язані між собою карбонатним містком і розташовані на відстані 4.5427(18) Å один від одного.

Протягом перших хвилин каталітичної реакції окислення субстрату супроводжується утворенням пероксиду водню як побічного продукту, проте зростання концентрації цієї сполуки швидко припиняється. Слід відзначити, що відновлення молекулярного кисню до пероксиду водню у каталітичній реакції було описано в декількох випадках,^{2,3,14,15} проте причина цього явища є досі невизначеною. Вивчення стехіометричної взаємодії комплексу з субстратом в анаеробних умовах показало, що на відміну від двоелектронного відновлення двоядерного комплексу міді(II) до відповідного комплексу міді(I), згідно механізму, запропонованого для природнього ензиму,¹ лише один з двох іонів міді(II) у комплексі відновлюється до міді(I). Це призводить до утворення

семіхінонного радикалу та змішановалентного двоядерного комплексу міді(II/I), що було підтверджено методами ЕПР та ультрафіолетової та видимої спектроскопії у розчині. Оскільки лише один з іонів міді зазнає відновлення, подальше окислення реакційної суміші киснем призводить до утворення проміжного супероксидно-мідного аддукту $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-O}_2^{\cdot-}$,¹³ що окислює семіхінонний радикал з утворенням одного молярного еквіваленту хінону та одного молярного еквіваленту пероксиду водню. Таким чином, не зважаючи на двоядерну структуру комплексу, лише один з двох іонів міді приймає участь у окислювально-відновлюваному процесі, в той час як інший іон відіграє лише структурну роль. Причиною такої незвичної поведінки може бути велика відстань між двома іонами міді (4.5427(18) Å) у комплексі, що перешкоджає одночасній координації субстрату до обох іонів металу і призводить натомість до його зв'язування лише з одним з них. В свою чергу, це призводить до відновлення лише одного з двох іонів міді двоядерного каталітичного центру.

Проте, оскільки концентрація пероксиду водню перестає збільшуватися вже через декілька хвилин, можна припустити, що на пізніших стадіях каталітична реакція протікає за іншим механізмом. Ця гіпотеза також підтверджується інгібуючим ефектом продукту реакції, 3,5-ди-*терт*-бутилбензохінону (DTBQ), на каталітичну реакцію, що означає, що дана сполука не просто акумулюється в реакційній суміші, а ще і приймає участь у каталітичному процесі. Дослідження показали, що DTBQ здатний швидко реагувати з двоядерним комплексом міді(I), окислюючи його до змішановалентного комплексу міді(II/I) та семіхінону. Оскільки двоядерний комплекс міді(I) є єдиною сполукою, здатною реагувати з DTBQ, цей факт може служити поясненням інгібуючого впливу хінону на каталітичний процес. В свою чергу, присутність у реакційній суміші двоядерного комплексу міді(I) можна пояснити лише за припущення, що реакція протікає за механізмом, подібним до запропонованого Кребсом та ін.¹ Таким чином, можна зробити висновок, що в даному випадку реакція протікає за двома різними механізмами: 1) через утворення семіхінону і змішановалентного комплексу і утворенням одної молекули продукту за каталітичний цикл, який супроводжується утворенням пероксиду водню як побічного продукту, і 2) через двоелектронне відновлення двоядерного комплексу міді(II) до відповідного комплексу міді(I), із подальшим окисленням катехолу за механізмом, подібним до того, що спостерігався для комплексу $[\text{Cu}_2([\text{22}]py_4pz)(\mu\text{-OH})(\text{ClO}_4)_3\cdot\text{H}_2\text{O}]$. Причиною цього явища може бути зміна координаційного оточення іонів міді, зокрема, дисоціація карбонатного містка, під час каталітичного циклу, що в свою чергу призводить до зменшення відстані між ними. Попередні дослідження двоядерних комплексів міді зі спорідненими макроциклічними лігандами показали, що ліганди цього типу є дуже гнучкими, і відстань між двома іонами металу в їх комплексах може

змінюватися в досить широких межах, зокрема в залежності від наявності між ними місткового ліганда.¹⁶ Зменшення міжіонної відстані в свою чергу робить можливою одночасну координацію субстрату до обох металічних центрів, і відповідно до зміни механізму каталітичної реакції..

Ці результати свідчать, що механізм окислення субстрату модельними сполуками катехолоксидази є досить складним. Очевидно, важливий вплив на механізм каталітичної реакції справляє відстань між двома іонами міді у двоядерному комплексі. Мала відстань сприяє зв'язуванню субстрату з обома іонами міді у вигляді місткового дводентатного ліганда, що в свою чергу дозволяє одночасне відновлення обох іонів міді до ступеню окислення +1. З іншого боку, велика відстань між двома іонами дозволяє зв'язування субстрату лише з одним із двох іонів міді. Подальша каталітична реакція таким чином протікає через утворення семіхінонного радикалу. Ці результати дозволяють також зробити висновок, що пероксид водню у якості побічного продукту утворюється, коли велика відстань між двома іонами міді у двоядерному комплексі перешкоджає одночасній координації субстрату до обох іонів.

Слід також зазначити, що на даний момент у літературі відсутні дані про можливість утворення пероксиду водню або семіхінону у випадку катехолоксидази, проте деякі автори відзначили утворення обох цих сполук під час каталітичного окислення сполуки L-DOPA спорідненим ензимом тирозиназою в гемолімфі деяких молюсків.^{17,18} Таким чином, подальші дослідження мають надати відповідь на питання про можливість протікання каталітичної реакції за обома механізмами, описаними для модельних сполук, у випадку природнього ензиму.

Література

- (1) Klabunde, T.; Eicken, C.; Sacchettini, J. C.; Krebs, B. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 1084-1090.
- (2) Kodera, M.; Kawata, T.; Kano, K.; Tachi, Y.; Itoh, S.; Kojo, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2003**, *76*, 1957-1964.
- (3) Kaizer, J.; Pap, J.; Speier, G.; Parkanyi, L.; Korecz, L.; Rockenbauer, A. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 190-198.
- (4) Siegbahn, P. E. M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 577-590.
- (5) Plenge, T.; Dillinger, R.; Santagostini, L.; Casella, L.; Tuzcek, F. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2003**, *629*, 2258-2265.
- (6) Börzel, H.; Comba, P.; Pritzkow, H. *Chem. Commun.* **2001**, 97-98.
- (7) Torelli, S.; Belle, C.; Hamman, S.; Pierre, J. L.; Saint-Aman, E. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 3983-3989.
- (8) Merkel, M.; Möller, N.; Piacenza, M.; Grimme, S.; Rempel, A.; Krebs, B. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1201-1209.
- (9) Berreau, L. M.; Mahapatra, S.; Halfen, J. A.; Houser, R. P.; Young, V. G.; Tolman, W. B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 207-210.
- (10) Mahadevan, V.; Hou, Z. G.; Cole, A. P.; Root, D. E.; Lal, T. K.; Solomon, E. I.; Stack, T. D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11996-11997.
- (11) Santagostini, L.; Gulotti, M.; Monzani, E.; Casella, L.; Dillinger, R.; Tuzcek, F. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 519-522.
- (12) Huisman, M.; Koval, I. A.; Gamez, P.; Reedijk, J. *Inorg. Chim. Acta* **2005**, in press.

- (13) Mirica, L. M.; Ottenwaelder, X.; Stack, T. D. P. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1013-1045.
- (14) Ackermann, J.; Meyer, F.; Kaifer, E.; Pritzkow, H. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 247-258.
- (15) Selmeczi, K.; Reglier, M.; Giorgi, M.; Speier, G. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *245*, 191-201.
- (16) Schuitema, A. M.; Aubel, P. G.; Koval, I. A.; Engelen, M.; Driessen, W. L.; Reedijk, J.; Lutz, M.; Spek, A. L. *Inorg. Chim. Acta* **2003**, *355*, 374-385.
- (17) Komarov, D. A.; Slepneva, I. A.; Glupov, V. V.; Khramtsov, V. V. *Free Radic. Res.* **2005**, *39*, 853-858.
- (18) Slepneva, I. A.; Komarov, D. A.; Glupov, V. V.; Serebrov, V. V.; Khramtsov, V. V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *300*, 188-191.