

Die Koordination von Methoxid in der Tasche von $\{Cu^{II}Tp^{Cum,Me}\}$ und ein einfaches Modell für das Cu-Zentrum der Galactose-Oxidase**

Michael Ruf und Cortlandt G. Pierpont*

Funktionalisierte Hydrotris(pyrazolyl)borat-Liganden (Tp^R) sind verwendet worden, um geschützte Koordinationsstellen bei Übergangsmetallzentren zu schaffen. Pyrazol-N-Atome ähneln dabei Histidin-Donoren, und Tp^R -Komplexe von Fe, Cu und Zn dienen als Modelle für bioanorganische Metallkoordinations-sphären sowohl im Hinblick auf deren Struktur als auch auf deren Funktion.^[1] Basische Hilfsliganden in der geschützten Tasche können durch Protonierung entfernt werden, wobei eine freie Koordinationsstelle am Metallzentrum entsteht. Bisher wurde Hydroxid dafür verwendet, doch Alkoxide bieten als stärkere Basen den Vorteil besserer Abgangsgruppen. Hier beschreiben wir Ergebnisse von Studien zur Methoxid-Koordination in der Tasche, die vom Cumenyl- und Methyl-substituierten Tp -Liganden in $\{Cu^{II}Tp^{Cum,Me}\}$ gebildet wird. Außerdem berichten wir über die Bildung eines einfachen Analogons zum Kupfer-Zentrum der Galactose-Oxidase.

Durch Zugabe einer Lösung von $Cu(ClO_4)_2$ in Methanol zu $KTp^{Cum,Me}$ in Dichlormethan wurde $[Cu\{\{Tp^{Cum,Me}\}Cu(\mu-OMe)_2\}_2]$ **1** erhalten. Der Röntgenstrukturanalyse dieses Komplexes zufolge sind die drei Cu^{2+} -Ionen linear angeordnet;^[2] ein planares $[Cu(OMe)_4]^{2-}$ -Ion im Molekülzentrum ist dabei mit weiter außen gelegenen, quadratisch-pyramidalen $[Cu(Tp^{Cum,Me})]^+$ -Ionen verbrückt (Abb. 1). Die Methoxid-O-Atome der Pyramidenbasis ermöglichen einen starken antiferromagnetischen Austausch zwischen den Metallzentren, weshalb der Komplex ein temperaturunabhängiges magnetisches Moment von $1.82 \mu_B$ hat entsprechend $S = 1/2$. Bei Raumtemperatur ist das Molekül im festen Zustand und in Toluollösung EPR-inaktiv, in glasartig erstarrtem Toluol unter 100 K registriert man ein schwaches, konturloses Signal bei $g = 2.26$. Die starke Basizität des Methoxidliganden in **1** wurde genutzt, um aus diesem Komplex durch Reaktion mit 2-(Methylsulfanyl)phenol $[Cu(Tp^{Cum,Me})\{O(MeS)C_6H_4\}]$ **2** zu erhalten.

Galactose-Oxidase (GOase) aus Pilzen katalysiert die Oxidation primärer Alkohole zu Aldehyden.^[3] Sie zählt zu einer interessanten Klasse von Metalloenzymen, die einen Zwei-Elektronen-Oxidationsschritt mit einem einzigen redoxaktiven Metallion im aktiven Zentrum katalysieren, in diesem Fall einem Kupferion. Aus einer röntgenographischen und einer Extended-X-ray-absorption-fine-structure-(EXAFS)-Analyse geht hervor, daß das Cu-Zentrum in der partiell oxidierten, inaktiven ($GOase^{SEMI}$)- und der vollständig oxidierten, aktiven ($GOase^{OX}$)-Form des Enzyms ein Cu^{II} -

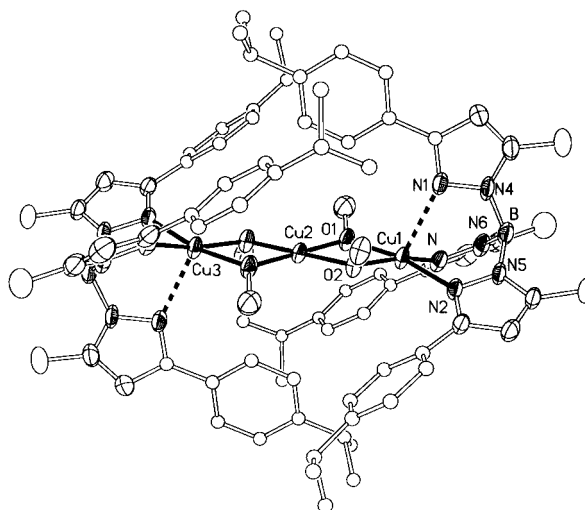
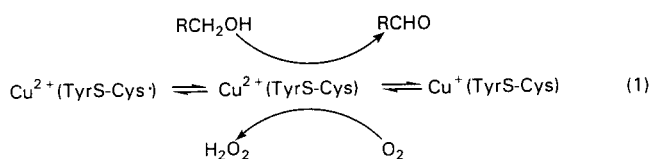


Abb. 1. Struktur von **1** im Kristall. Ausgewählte Abstände [Å] und Winkel [°]: Cu1-O1 1.948(3), Cu1-O2 1.947(3), Cu2-O1 1.922(3), Cu2-O2 1.917(3), Cu1-N2 2.030(3), Cu1-N3 2.038(3), Cu1-N1 2.486(4); O1-Cu1-N2 165.2(1), O2-Cu1-N3 168.8(1).

Zentrum mit quadratisch-planarer Umgebung ist.^[4] Ein ungewöhnliches Cysteinyltyrosin (Tyr272, Cys228) ist über das Tyrosin-O-Atom an der Pyramidenbasis an Cu koordiniert und erweitert dessen Redoxaktivität.^[5] Zwei weitere basale Koordinationsstellen sind von Histidin-N-Atomen besetzt, die apicale Stelle von einem O-Atom eines normalen Tyrosins (Tyr495). Die vierte Koordinationsstelle an der Pyramidenbasis direkt neben dem Tyr272-O-Atom ist die Substratbindungsstelle.^[6] Die Oxidation von $GOase^{SEMI}$ zur aktiven $GOase^{OX}$ findet am Cysteinyltyrosin statt. Sykes et al. bestimmten das Oxidationspotential dieses Tyrosins und stellten einen ungewöhnlich niedrigen Wert von 0.40 V (gegen die Normalwasserstoffelektrode, pH 7.5) fest,^[5] während Tyrosin und Phenolate sonst üblicherweise bei Potentialen oxidiert werden, die näher bei 1.0 V liegen.^[9] Mit der Substratoxidation geht die Reduktion von molekularem Sauerstoff einher [Gl. (1)].^[10] Die Metallkoordination und



der Cysteinylsubstituent tragen so zur Verschiebung des Oxidationspotentials von Tyr272 bei, daß eine Reoxidation durch molekularen Sauerstoff oder Superoxid im Aktivierungsschritt möglich wird.

Der Röntgenstrukturanalyse von **2** zufolge liegt ein Cu-Zentrum mit quadratisch-pyramidalen Geometrie vor, dabei besetzen ein Phenolat-O-Atom und zwei Pyrazol-N-Atome basale Koordinationsstellen (Abb. 2).^[11] An der vierten basalen Koordinationsstelle befindet sich das S-Atom des 2-(Methylsulfanyl)phenolats; die Cu-S-Bindungslänge ist mit 2.394(2) Å für einen Thioether relativ kurz.^[12] Hierin unterscheiden sich die Cu-Zentren von **2** und dem Enzym, doch

[*] Prof. C. G. Pierpont, Dr. M. Ruf
Department of Chemistry and Biochemistry
University of Colorado, Boulder, CO 80309 (USA)
Fax: (+1) 303-492-0951
E-mail: Cortlandt.Pierpont@Colorado.edu

[**] Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation und dem Cristol Fund unterstützt. M. R. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ein Postdoktoranden-Stipendium

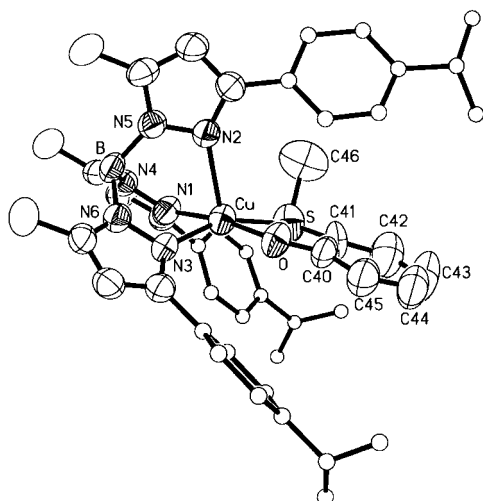
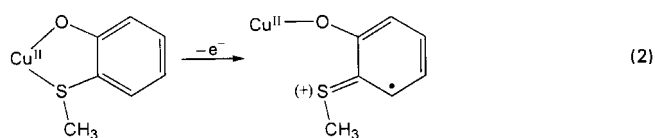


Abb. 2. Struktur von **2** im Kristall. Ausgewählte Abstände[Å] und Winkel[°]: Cu-O 1.900(4), Cu-S 2.394(2), Cu-N1 2.023(5), Cu-N3 2.026(5), Cu-N2 2.319(4), C40-O 1.334(8), C41-S 1.719(6), S-C46 1.795(8), C40-C41 1.315(9), C41-C42 1.456(9), C42-C43 1.385(11), C43-C44 1.318(11), C44-C45 1.367(10), C40-C45 1.447(9); O-Cu-N1 170.9(2), S-Cu-N3 157.7(1).

können die charakteristischen Eigenschaften des Komplexes einen Einblick in die GOase^{SEMI} und die GOase^{OX} vermitteln.

Elektrochemische Messungen an **2** ergaben eine irreversible Oxidation des Phenolatliganden bei einem Potential von 0.61 V (CH₂Cl₂, gegen Ferrocen/Ferrocenium). Dieser Wert ist positiver als die Reduktionspotentiale entsprechender Phenolatliganden mit elektronenschiebenden Alkylsubstituenten.^[7, 13–15] Er ist auch trotz struktureller Ähnlichkeit zwischen dem Komplex **2** und GOase^{OX} um etwa 0.6 V positiver als das Reduktionspotential des Tyrosylrestes in der GOase^{OX}.^[5] Ein Charakteristikum im Enzym, das zum negativeren Wert für Tyr272 beitragen könnte, mag die Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes mit dem Indolring von Trp290 sein.^[6] Der Cumenylsubstituent des apicalen Pyrazols in **2** könnte eine ähnliche π -Stapelung mit dem Phenolatring eingehen.^[16] Die Struktur läßt aber erkennen, daß die Methylgruppe am S-Atom dies verhindert und daß die Bildung des Komplexisomers, bei dem sich der Methylsubstituent der Sulfanylgruppe unterhalb der Pyramidenbasis befindet, wegen ungünstiger Wechselwirkungen mit den Cumenylsubstituenten benachteiligt ist. Modellstudien ergaben, daß der Methylsulfanylschubstituent das Oxidationspotential des an Kupfer koordinierten Phenolats um ungefähr –0.2 V verschieben kann.^[15] Die beim Reduktionspotential für das Enzym festgestellte stark negative Verschiebung deutet auf einen wichtigen Beitrag hin, der aus der Wechselwirkung mit dem Tryptophan herrührt.

Die Irreversibilität der Oxidation von **2** könnte daraus resultieren, daß in der oxidierten Form des Komplexes das Thioether-S-Atom vom Cu-Zentrum abdissoziiert [Gl. (2)].



Eine Oxidation zum Radikal würde dabei die positive Ladung am S-Atom erhöhen. Charakteristisch für das (Methylsulfanyl)phenolat in **2** ist, daß selbst in dessen reduzierter Form die Ring-C-S-Bindung einen beträchtlichen Doppelbindungscharakter hat. Die S-C41-Bindungs-länge zum Ring-C-Atom ist nämlich mit 1.719(6) Å beträchtlich kürzer als die zum Methyl-C-Atom mit 1.795(8) Å, und die C40-O-Bindungs-länge von 1.334(8) Å unterscheidet sich nicht wesentlich von Werten in chelatartig gebundenen Brenzcatechinatliganden. Darüber hinaus weist der Phenolatring ein subtiles, aber signifikant ausgeprägtes Muster von kurzen und langen C-C-Bindungs-längen auf. Die C40-C41-Bindung und die ihr gegenüberliegende C43-C44-Bindung sind mit 1.315(9) und 1.318(11) Å nahezu so lang wie lokalisierte Doppelbindungen. Die unmittelbar benachbarten C40-C45- und C41-C42-Bindungen sind länger, nämlich 1.456(9) und 1.447(9) Å, und die anderen beiden Bindungs-längen im Ring liegen mit 1.367(10) und 1.385(11) Å dazwischen.

In einem Punkt unterscheidet sich der Komplex **2** deutlich vom aktiven Zentrum des Enzyms, und das ist die Koordinationsstelle für das S-Atom, an die beim Enzym das Substrat bindet. **2** bildet sich dadurch, daß Methanol aus dieser Koordinationsstelle verdrängt wird. Bei aus Methanol erhaltenen Proben des Komplexes zeigte sich, daß der Alkohol den S-Liganden nicht vom Metallzentrum verdrängen kann. Die Ringe-bene des Tyr272-Phenylrings in der GOase^{SEMI} und die tetragonale Ebene des Cu-Zentrums stehen senkrecht zueinander.^[6] Eine Drehung des Cys228-S-Atoms in die Substratbindungsstelle hinein würde das Enzym wahrscheinlich deaktivieren. Es wird aber an seinem Platz gehalten durch die Einbindung des Cysteins in das Protein und ebenso durch die π -Stapelung mit Trp290.

Das vorrangige Interesse bei der Galactose-Oxidase galt bisher der Kupfer-(Cysteiny-Tyrosin)-Wechselwirkung, für die Funktionsbereitschaft des aktiven Zentrums ist allerdings Trp290 von wesentlicher Bedeutung. Trp290 bildet nämlich, wie aus Molecular-Modeling-Studien hervorgeht, eine H-Brücke zum Ring-O-Atom der D-Galactose und trägt so zur Substratspezifität bei,^[8] und es verhindert eine Drehung des ungewöhnlichen Cysteinytyrosins, so daß eine irreversible Koordination von Schwefel an das aktive Zentrum unmöglich wird. Außerdem führt seine Charge-Transfer-Wechselwirkung mit dem Ring von Tyr272 zu einem günstigen Reduktionspotential, das eine Oxidation durch Superoxid ermöglicht.

Experimentelles

1: Cu(ClO₄)₂ · 6H₂O (429 mg, 15 mmol) in 20 mL Methanol wurde zu einer Lösung von KTp^{Cum,Me} (500 mg, 0.77 mmol)^[17] in 15 mL Dichlormethan gegeben. Die Mischung wurde gerührt und der dabei entstandene grüne Niederschlag durch Filtration abgetrennt. Das Produkt erhielt man als hellgrünen, mikrokristallinen Feststoff in 78 % Ausbeute (460 mg). Durch langsames Verdampfen einer gesättigten Lösung in Dichlormethan/Methanol wurden für eine Röntgenstrukturanalyse geeignete Kristalle gezüchtet, die man dabei als instabile Dichlormethansolvate der Formel **1** · 2CH₂Cl₂ erhielt.

2: **1** (100 mg, 0.065 mmol) wurde zu einer Lösung von 2 Äquiv. 2-(Methylsulfanyl)phenol in Dichlormethan/Methanol gegeben. Die grünbraune Mischung wurde zur Entfernung des polymeren Cu(OMe)₂ filtriert. Beim langsamen Eindampfen des Filtrats erhielt man Kristalle von tief blaugrüner Farbe in 50 % Ausbeute (53 mg). C,H,N-Analyse: ber.: C 68.0,

H 6.5, N 10.3; gef.: C 67.8, H 6.9, N 10.2; UV/Vis (Toluol): λ_{max} (ϵ) = 485 nm (1530), 756 (510); magnetisches Moment (292 K): 1.81 μ_B .

Eingegangen am 5. Januar 1998 [Z11318]

Stichwörter: Bioanorganische Chemie • Galactose-Oxidase • Koordinationschemie • Kupfer • Metalloenzyme

- [1] a) K. Weis, H. Vahrenkamp, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 5589; b) N. Kitajima, W. B. Tolman, *Prog. Inorg. Chem.* **1995**, *43*, 419.
- [2] Kristallstrukturanalyse von **1**:^[18] triklin, Raumgruppe $P\bar{1}$, $a = 11.8856(4)$, $b = 13.9361(5)$, $c = 14.5955(5)$ Å, $\alpha = 72.265(1)$, $\beta = 68.873(1)$, $\gamma = 74.359^\circ$, $V = 2112.9(1)$ Å³ für $Z = 1$ bei $T = 168(2)$ K. Die Verfeinerung konvergierte mit $R(F) = 0.059$ und $R_w(F^2) = 0.147$.
- [3] a) J. W. Whittaker in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 30 (Hrsg.: H. Sigel, A. Sigel), Dekker, New York, **1994**, S. 315; b) B. P. Branchaud, M. P. Montague-Smith, D. J. Kosman, F. R. McLaren, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 798.
- [4] a) N. Ito, S. E. V. Phillips, K. D. S. Yadav, P. F. Knowles, *J. Mol. Biol.* **1994**, *238*, 794; b) N. Ito, S. E. V. Phillips, C. Stevens, Z. B. Ogel, M. J. McPherson, J. N. Keen, K. D. S. Yadav, P. F. Knowles, *Nature* **1991**, *350*, 87; c) P. F. Knowles, R. D. Brown III, S. H. Koenig, S. Wang, R. A. Scott, M. A. McGuirl, D. E. Brown, D. M. Dooley, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 3895.
- [5] C. G. Sellsell, C. D. Borman, A. J. Baron, M. J. McPherson, A. G. Sykes, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 4520.
- [6] Darstellungen der Koordinationssphäre des Cu-Zentrums einschließlich Trp290 basierend auf kristallographischen Koordinaten wurden von Wieghardt et al.^[7a] und Branchaud et al. (Stereobild)^[8] veröffentlicht.
- [7] a) A. Sokolowski, J. Müller, T. Weyhermüller, R. Schnepf, P. Hildenbrandt, K. Hildenbrand, E. Bothe, K. Wieghardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8889; b) B. Adam, E. Bill, E. Bothe, B. Goerdts, G. Haselhorst, K. Hildenbrand, A. Sokolowski, S. Steenken, T. Weyhermüller, K. Wieghardt, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 308.
- [8] R. M. Wachter, B. P. Branchaud, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2782.
- [9] a) K. E. Silva, T. E. Elgreen, L. Que, Jr., M. T. Stankovich, *Biochemistry* **1995**, *34*, 14093; b) D. P. Goldberg, S. J. Lippard, *Adv. Chem. Ser.* **1995**, *246*, 61.
- [10] Details zur Substratoxidation: a) R. M. Wachter, M. P. Montague-Smith, B. P. Branchaud, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7743; b) Y. Wang, J. L. DuBois, B. Hedman, K. O. Hodgson, T. D. P. Stack, *Science* **1998**, *279*, 537.
- [11] Kristallstrukturanalyse von **2**:^[18] monoklin, Raumgruppe $C2/c$, $a = 35.0680(15)$, $b = 11.4263(5)$, $c = 22.8923(10)$ Å, $\alpha = 106.677(1)^\circ$, $V = 8787.1(7)$ Å³ für $Z = 8$ bei $T = 295(2)$ K. Die Verfeinerung konvergierte mit $R(F) = 0.068$ und $R_w(F^2) = 0.165$.
- [12] Whittaker et al. beschreiben $[\text{Cu}(\text{pmdt})\{(\text{Methylthio})\text{kresol}\}]^+$ (pmdt = Pentamethyldiethylentriamin) als ein mögliches Modell für die Umgebung des Cu-Zentrums der GOase^{SEMI}. Die Koordinationsgeometrie ist trigonal-bipyramidal, die Cu-S-Bindungslänge ist mit 2.55 Å relativ lang. M. M. Whittaker, Y.-Y. Chuang, J. W. Whittaker, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10029.
- [13] a) J. A. Halfen, V. G. Young, W. B. Tolman, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1832; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1687; b) J. A. Halfen, B. A. Jazdzewski, S. Mahapatra, L. M. Berreau, E. C. Wilkinson, L. Que, Jr., W. B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8217.
- [14] M. M. Whittaker, W. R. Duncan, J. W. Whittaker, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 382.
- [15] S. Itoh, S. Takayama, R. Arakawa, A. Furuta, M. Komatsu, A. Ishida, S. Takamuku, S. Fukuzumi, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 1407.
- [16] Siehe hierzu z. B. die Struktur von $[\text{Cu}(\text{Tp}^{\text{Ph}})(\text{pterin})]$: J. Perkinson, S. Brodie, K. Yoon, K. Mosny, P. J. Carroll, T. V. Morgan, S. J. Nietzer Burgmayer, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 719.
- [17] M. Ruf, H. Vahrenkamp, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 6571.
- [18] Messung mit einem Siemens-SMART-Diffraktometer, ausgerüstet mit einem CCD-Detektionssystem. Strukturlösung mit Direkten Methoden. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturfaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Strukturen wurden als „supplementary publication no. CCDC-101243“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).