

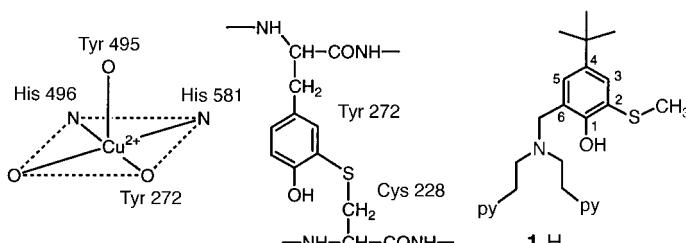
Die Oxidation von Benzylalkohol mit Cu^{II}- und Zn^{II}-Phenoxyradikal-Komplexen als Modell für die Redoxreaktion der Galactose-Oxidase**

Shinobu Itoh,* Masayasu Taki, Shigehisa Takayama, Shigenori Nagatomo, Teizo Kitagawa, Norio Sakurada, Ryuichi Arakawa und Shunichi Fukuzumi*

Elektronenverschiebungen zwischen einem Übergangsmetall-Ion und einer redoxaktiven Aminosäure-Seitenkette, wie der Phenoleinheit von Tyrosin, spielen eine entscheidende Rolle in biologisch wichtigen Prozessen.^[1] Vor wenigen Jahren wurde ein an ein Cu^{II}-Ion koordiniertes Tyrosin-Radikal im aktiven Zentrum der Galactose-Oxidase (GO, EC 1.1.3.9) nachgewiesen.^[2] GO katalysiert die Oxidation von D-Galactose und primären Alkoholen zu den entsprechenden Aldehyden unter Reduktion von O₂ zu H₂O₂ [Gl. (1)]. Die



Kristallstrukturanalyse dieses Metalloenzymes (Auflösung 1.7 Å) ergab, daß der Tyrosin-Rest (Tyr272), der in äquatorialer Position an ein Cu^{II}-Ion koordiniert ist, kovalent an das Schwefelatom des benachbarten Restes Cys228 gebunden ist (Schema 1).^[2] Die Cu^{II}-Phenoxyradikal-Gruppierung wird als aktives Zentrum von GO angesehen, die bei der Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden unter Aufnahme von zwei Elektronen in die reduzierte Form [Cu^I(phenol)] übergeht.^[3-6]



Schema 1. Darstellung der Koordination am Cu^{II}-Zentrum der Galactose-Oxidase (links; das unbeschriftete O-Atom stammt von einem Acetat-Ion oder von Wasser), des organischen Cofaktors (Mitte) und der protonierten Form des in den Modellkomplexen verwendeten Liganden 1 (rechts; py = 2-Pyridyl).

[*] Dr. S. Itoh, Prof. S. Fukuzumi, M. Taki, S. Takayama

Department of Material and Life Science
Graduate School of Engineering, Osaka University
2-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871 (Japan)
Fax: (+81) 6-6879-7370

E-mail: fukuzumi@chem.eng.osaka-u.ac.jp

Dr. S. Nagatomo, Prof. T. Kitagawa

Institute for Molecular Science
Myodaiji, Okazaki 444-8585 (Japan)

N. Sakurada, Prof. R. Arakawa

Department of Applied Chemistry
Faculty of Engineering, Kansai University
3-3-35 Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680 (Japan)

[**] Diese Arbeit wurde durch ein Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Area (Molecular Biometallics: 10129218; Electrochemistry of Ordered Interface: 10131242) und ein Grant-in-Aid for General Scientific Research (08458177) des japanischen Ministeriums für Erziehung, Wissenschaft, Kultur und Sport gefördert.

In letzter Zeit wurden viele Anstrengungen unternommen, Komplexe zu synthetisieren, die die katalytischen und spektroskopischen Eigenschaften der Cu^{II}-Phenoxyradikal-Gruppierung der nativen Enzyme aufweisen.^[7-10] Wieghardt et al. konnten ein Funktionsmodell für GO entwickeln, indem sie einen Cu^{II}-Komplex mit der Radikalform von 2,2'-Thio-bis(4,6-di-*tert*-butylphenol) (LH₂) als Liganden synthetisierten, der Alkohole unter aeroben Bedingungen oxidieren kann.^[7b] Das aktive Zentrum dieser Verbindung ist der dimere Phenoxyradikal-Komplex [Cu^{II}₂(L[•])₂]²⁺, wobei nur die Radikale als Oxidationszentren wirken und am Cu^{II}-Zentrum keine Redoxreaktion stattfindet. Somit stellt sich die Frage, welche Bedeutung dem Cu^{II}-Zentralatom bei der enzymatischen Reaktion der GO zukommt.

Wir berichten hier über zwei Modellkomplexe, deren Strukturen und spektroskopische Eigenschaften denen des aktiven Zentrums von GO ähneln. Der eine, ein Cu^{II}-Phenoxyradikal-Komplex, kann zwei Elektronen aufnehmen, der andere, der entsprechende Zn^{II}-Komplex, dagegen nur eines. Zu unserer Überraschung oxidieren beide Komplexe Benzylalkohol zu Benzaldehyd. Die Kinetik der beiden Oxidationen ist allerdings verschieden; ihre Untersuchung liefert wertvolle Einblicke in den Katalysemechanismus von GO.

Die Bildung von [Cu^{II}(1[•])(NO₃)]⁺ wurde UV/Vis-spektroskopisch verfolgt. Die Zugabe von (NH₄)₂[Ce^{IV}(NO₃)₆] (CAN) zu einer Lösung des dimeren Kupfer(II)-Phenolat-Komplexes [Cu^{II}₂(1)₂](PF₆)₂^[11] bei 25 °C führte sofort zu einer Abnahme der Ligand-Metall-Charge-Transfer(LMCT)-Absorptionsbande des dimeren Komplexes bei 522 nm, während gleichzeitig neue Absorptionsbanden bei 415 nm ($\epsilon = 1790 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und 867 nm ($\epsilon = 550 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) auftraten (Abbildung 1). Ein ähnliches Spektrum erhielten wir bei der

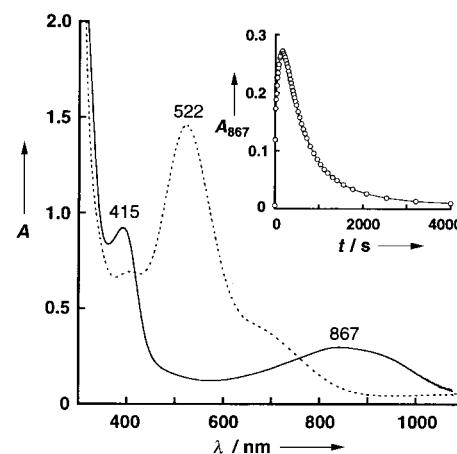


Abbildung 1. UV/Vis-Spektren von [Cu^{II}₂(1)₂](PF₆)₂ ($2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ in CH₃CN, gestrichelte Linie) und [Cu^{II}(1[•])(NO₃)]⁺ (durchgezogene Linie), das aus ersterem durch Zugabe von CAN ($5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$) bei 25 °C erzeugt wurde. Einschub: zeitlicher Verlauf der Absorptionsänderung bei 867 nm durch die Bildung und Zersetzung von [Cu^{II}(1[•])(NO₃)]⁺.

Oxidation von [Zn^{II}(1)(CH₃CN)]PF₆^[11] durch CAN unter den gleichen Versuchsbedingungen (418 nm ($\epsilon = 1250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und 887 nm ($\epsilon = 510 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in CH₃CN bei 25 °C). Die UV/Vis-Spektren ähneln denen der Radikalform von 2-Methyl-

thio-*p*-cresol ($\lambda_{\text{max}} = 400$ und 830 nm)^[12, 13] und der oxidierten Form von GO (445 und ca. 800 nm).^[3] Dies deutet darauf hin, daß die bei der CAN-Oxidation auftretenden Absorptionsbanden von dem Liganden **1** stammen. Diese Absorptionsbande im langwelligen Bereich (oberhalb 800 nm), die charakteristisch für das katalytische Zentrum der GO ist, wurde außer bei einem von Halcrow et al. beschriebenen Radikalkomplex^[10] bei keinen anderen Cu^{II}- und Zn^{II}-Phenoxyradikal-Komplexen beobachtet.

Weitere Beweise für die Bildung von $[\text{M}^{\text{II}}(\mathbf{1}^{\cdot})(\text{NO}_3)]^+$ ($\text{M} = \text{Cu, Zn}$) erhielten wir aus den Resonanz-Raman-Spektren ($\text{M} = \text{Cu}$: $\tilde{\nu} = 1512, 1589 \text{ cm}^{-1}$; $\text{M} = \text{Zn}$: $\tilde{\nu} = 1517, 1595 \text{ cm}^{-1}$), den Elektrospray-Ionisations-Massenspektren (ESI-MS)^[14] und den ESR-Lösungsspektren der mit CAN oxidierten Phenolat-Komplexe ($\text{M} = \text{Cu}$ (-196°C , CH_3CN): ESR-inaktiv; $\text{M} = \text{Zn}$ (-80°C , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CN}$): $g = 2.0052$). Die durch Computersimulation bestimmten isotropen Hyperfeinkopplungskonstanten von $[\text{Zn}^{\text{II}}(\mathbf{1}^{\cdot})(\text{NO}_3)]^+$ ($a_{2-\text{SMe}} = 3.72 \text{ G}$, $a_{3-\text{H}} = 1.15 \text{ G}$, $a_{5-\text{H}} = 0.87 \text{ G}$, $a_{\text{CH}(\text{Benzyl})} = 2.43 \text{ G}$) deuten darauf hin, daß wie bei den metallfreien Phenoxyradikalen ein erheblicher Teil der Spindichte in die Methylthio-Gruppe delokalisiert ist.^[12] Aus den nahezu identischen spektroskopischen Eigenschaften der beiden Phenoxyradikal-Komplexe schließen wir, daß sie eine ähnliche Struktur haben.

Der Cu^{II}-Komplex zersetzt sich bei Raumtemperatur allmählich in einer Reaktion erster Ordnung ($k_{\text{Zers.}(\text{Cu})} = 1.62 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, Einschub in Abbildung 1).^[15] Die Zugabe von Benzylalkohol in großem Überschuß zu einer Lösung von $[\text{Cu}^{\text{II}}(\mathbf{1}^{\cdot})(\text{NO}_3)]^+$ in CH_3CN beschleunigt den Zerfall des Komplexes. Die Bildung von $[\text{Cu}^{\text{l}}(\mathbf{1}-\text{H})]^+$ als Endprodukt war daran zu erkennen, daß a) im Spektrum des Reaktionsgemisches nach der Reaktion keine charakteristischen LMCT- und d-d-Absorptionsbanden des Cu^{II}-Komplexes auftraten und b) das Endprodukt nicht ESR-aktiv war. Zudem wurde der Ligand **1-H** nach der Aufarbeitung mit wäßrigem NH_3 fast quantitativ zurückgewonnen, was bei der Selbstersetzung nicht der Fall ist.^[15] Die quantitative Bildung von Benzaldehyd wurde durch GC-MS bestätigt.^[16] Die Oxidation von Benzylalkohol zu Benzaldehyd gehorcht einem Geschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung, und die Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung $k_{\text{beob.}(\text{Cu})}$ gegen die Konzentration des Benzylalkohols ergibt eine Gerade (Abbildung 2a). Aus der Steigung dieser Geraden wurde die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung $k_{(\text{Cu})} = 4.79 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ abgeleitet. Die Verwendung von PhCD_2OH anstatt PhCH_2OH führte zu einem starken kinetischen Isotopeneffekt ($k_{(\text{Cu})}^{\text{H}}/k_{(\text{Cu})}^{\text{D}} = 6.8$), was darauf hinweist, daß die Abstraktion des benzylischen Wasserstoffatoms Teil des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts ist.

Benzaldehyd wurde auch bei der Umsetzung von Benzylalkohol mit $[\text{Zn}^{\text{II}}(\mathbf{1}^{\cdot})(\text{NO}_3)]^+$ erhalten.^[16] Im Unterschied zur Reaktion des Cu^{II}-Komplexes ist die Reaktion des Zn^{II}-Komplexes mit Benzylalkohol zweiter Ordnung in bezug auf die Abnahme der Absorption bei 887 nm , und die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung $k_{\text{beob.}(\text{Zn})}$ zeigt eine Abhängigkeit zweiter Ordnung von der Alkoholkonzentration (Abbildung 2b).^[17] Die Ausbeute an Benzaldehyd betrug nur fast die Hälfte der Ausbeute der Reaktion des Cu^{II}-Komplexes.

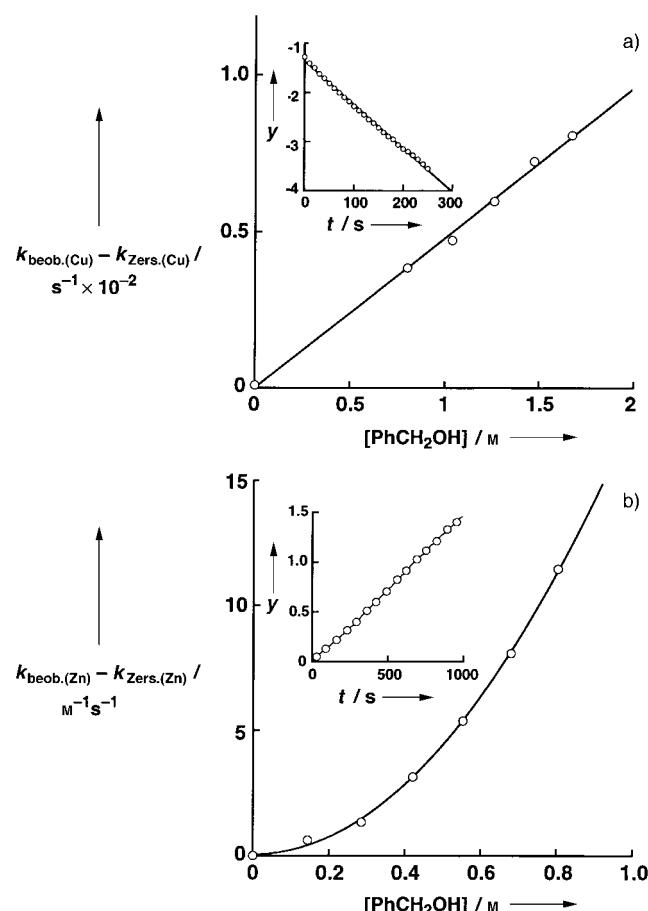
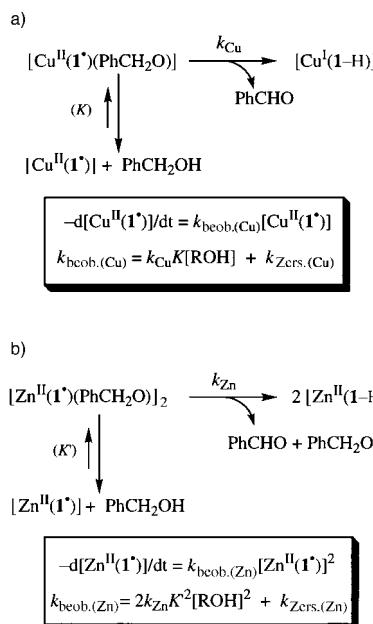


Abbildung 2. a) Auftragung von $(k_{\text{beob.}(\text{Cu})} - k_{\text{Zers.}(\text{Cu})})$ gegen die Konzentration von Benzylalkohol für die Oxidation von Benzylalkohol durch $[\text{Cu}^{\text{II}}(\mathbf{1}^{\cdot})(\text{NO}_3)]^+$ in CH_3CN bei 25°C . Einschub: graphische Darstellung der Reaktion pseudo-erster Ordnung; $y = \ln(A - A_{\infty})$. b) Auftragung von $(k_{\text{beob.}(\text{Zn})} - k_{\text{Zers.}(\text{Zn})})$ gegen die Konzentration von Benzylalkohol für die Oxidation von Benzylalkohol durch $[\text{Zn}^{\text{II}}(\mathbf{1}^{\cdot})(\text{NO}_3)]^+$ in CH_3CN bei 25°C . Einschub: graphische Darstellung der Reaktion zweiter Ordnung; $y = (A_0 - A)/[\text{Zn}(\mathbf{1}^{\cdot})]_0 (A - A_{\infty}) \times 10^{-4}$.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die Oxidation von Benzylalkohol durch $[\text{Cu}^{\text{II}}(\mathbf{1}^{\cdot})(\text{NO}_3)]^+$ über die Koordination von Benzylalkohol in monomerer Form und einen formalen $2\text{e}^-/2\text{H}^+$ -Mechanismus verläuft, wobei quantitativ Benzaldehyd und $[\text{Cu}^{\text{l}}(\mathbf{1}-\text{H})]^+$ entstehen (Schema 2a (Typ I)). Bei $[\text{Zn}^{\text{II}}(\mathbf{1}^{\cdot})(\text{NO}_3)]^+$ ist am Metallzentrum keine Redoxreaktion zu erwarten. In diesem Fall können zwei Elektronen nur von den Phenoxyradikalen in einer dimeren Form aufgenommen werden (Schema 2b (Typ II)). Die Reaktion ist somit zweiter Ordnung, und der Mechanismus ähnelt dem, der bei der Reaktion des oben genannten Komplexes von Wieghardt et al. beobachtet wurde.^[7b] Bisher wurde angenommen, daß die enzymatische Reaktion nach dem Mechanismus vom Typ I verläuft. Unsere kinetischen Experimente mit den Modellkomplexen $[\text{Cu}^{\text{II}}(\mathbf{1}^{\cdot})(\text{NO}_3)]^+$ und $[\text{Zn}^{\text{II}}(\mathbf{1}^{\cdot})(\text{NO}_3)]^+$ zeigen eindeutig, welche Bedeutung dem Redoxpaar $\text{Cu}^{\text{l}}/\text{Cu}^{\text{II}}$ und der reversiblen Umwandlung der Phenoxyradikalform in die Phenolform bei der Zweielektronenoxidation von Alkoholen am einkernigen, in der Proteinmatrix fixierten Kupferkomplex des Metalloenzymes GO zukommt.



Schema 2. Mechanismus vom Typ I (a) und vom Typ II (b) der Oxidation von Benzylalkohol durch den Kupfer- bzw. Zink-Modellkomplex. (Auf die Angabe von Ladungen wurde verzichtet.)

Experimentelles

Kinetische Experimente und Produktanalyse: Die Cu^{II} - und Zn^{II} -Phenoxyradikal-Komplexe wurden *in situ* erzeugt, indem man eine äquimolare Menge $(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}^{\text{IV}}(\text{NO}_3)_6]$ (CAN, $5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$) bei 25°C zu einer entgasten CH_3CN -Lösung von $[\text{M}_2^{\text{II}}(\mathbf{1})_2](\text{PF}_6)_2$ ($\text{M} = \text{Cu}, \text{Zn}$,^[11] $2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$) in einer UV-Küvette gab (1 cm Dicke, mit einem Silicostopfen dicht verschlossen). Die Geschwindigkeitskonstanten der Selbstzersetzung ($k_{\text{Zers.}}$) der Phenoxyradikal-Komplexe wurden bestimmt, indem man die Abnahme der vom Phenoxyradikal stammenden Absorptionsbande verfolgte.

Die Oxidation von Benzylalkohol durch die *in situ* erzeugten Komplexe wurde bei 25°C durch Zugabe von Benzylalkohol im Überschuss zur CH_3CN -Lösung eingeleitet, nachdem die Absorptionsbanden der Phenoxyradikal-Komplexe ein Maximum erreicht hatten (wenige Minuten nach der Zugabe von CAN zur Lösung des Phenolat-Komplexes). Die Geschwindigkeitskonstanten ($k_{\text{beob.}}$) der Redoxreaktion wurden ebenfalls anhand der Abnahme der Phenoxyradikal-Absorption bestimmt. Die Ausbeute an Benzaldehyd wurde durch GC-MS mit Mesitylen als internem Standard bestimmt.

Eingegangen am 1. Februar,

veränderte Fassung am 13. April 1999 [Z12979]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2774–2776

Stichwörter: Alkohole · Galactose-Oxidase · Kinetik · Kupfer · Phenoxyradikal-Komplexe

- [1] J. Stubbe, W. A. van der Donk, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 705–762, zit. Lit.
- [2] a) 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*, 87–90; b) N. Ito, S. E. V. Phillips, K. D. S. Yadav, P. F. Knowles, *J. Mol. Biol.* **1994**, *238*, 794–814.
- [3] M. M. Whittaker, D. P. Ballou, J. W. Whittaker, *Biochemistry* **1998**, *37*, 8426–8436, zit. Lit.
- [4] R. M. Wachter, M. P. Montague-Smith, B. P. Branchaud, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7742–7749, zit. Lit.
- [5] a) K. Clark, J. E. Penner-Hahn, M. M. Whittaker, J. W. Whittaker, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6433–6434; b) K. Clark, J. E. Penner-Hahn, M. M. Whittaker, J. W. Whittaker, *Biochemistry* **1994**, *33*, 12553–12557.
- [6] Das Kupfer-Phenoxyradikal-Motiv wurde auch als katalytisches Zentrum in der Glyoxal-Oxidase von *Phanerochaete chrysosporium*

sowie im prokaryotischen FbfB-Protein gefunden: a) P. J. Kersten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 2936–2940; b) M. M. Whittaker, P. J. Kersten, N. Nakamura, J. Sanders-Loehr, E. S. Schweizer, J. W. Whittaker, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 681–687; c) P. Bork, R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* **1994**, *236*, 1277–1282.

- [7] a) A. Sokolowski, J. Müller, T. Weyhermüller, R. Schnepf, P. Hildebrandt, K. Hildengrand, E. Bothe, K. Wieghardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8889–8900; b) P. Chaudhuri, M. Hess, U. Florke, K. Wieghardt, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2340–2343; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 2217–2220.
- [8] a) J. A. Halfen, V. G. Young, Jr., W. B. Tolman, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1832–1835; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1687–1690; 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*, 8217–8227.
- [9] a) Y. Wang, T. D. P. Stack, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13097–13098; b) Y. Wang, J. L. DuBois, B. Hedman, K. O. Hodgson, T. D. P. Stack, *Science* **1998**, *279*, 537–540.
- [10] M. A. Halcrow, L. M. L. Chia, X. Liu, E. J. L. McInnes, L. J. Yellowlees, F. E. Mabbs, J. E. Davies, *Chem. Commun.* **1998**, 2465–2466.
- [11] Einzelheiten zur Synthese des Liganden und der Komplexe sowie zu den Kristallstrukturen und physikochemischen Eigenschaften werden an anderer Stelle veröffentlicht werden. Die Struktur und die physikochemischen Daten eines verwandten Cu^{II} -Phenolat-Komplexes wurden in Lit. [12] beschrieben.
- [12] S. Itoh, S. Takayama, R. Arakawa, F. Furuta, M. Komatsu, A. Ishida, S. Takamuku, S. Fukuzumi, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 1407–1416.
- [13] M. M. Whittaker, Y.-Y. Chuang, J. W. Whittaker, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10029–10035.
- [14] Die Koordination von NO_3^- , das aus CAN stammt, wurde durch ESI-MS bestätigt.
- [15] Die Selbstzersetzung der Phenoxyradikal-Komplexe ergab ein kompliziertes Produktgemisch. Das ESI-Massenspektrum zeigte die Bildung einiger S-oxygenter und N-desalkylierter Produkte an.
- [16] Das einzige durch GC-MS nachgewiesene Produkt war Benzaldehyd; C-C-Verknüpfungsprodukte wie Hydrobenzoin [$\text{PhCH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{Ph}$] wurden nicht beobachtet.
- [17] Die Selbstzersetzung von $[\text{Zn}^{\text{II}}(\mathbf{1}^{\bullet})(\text{NO}_3)]^+$ ist ebenfalls eine Reaktion zweiter Ordnung.

Das Konzept der Andock-/Schutzgruppen, eine neue Strategie für die Biohydroxylierung**

Gerhart Braunegg, Anna de Raadt,
Sabine Feichtenhofer, Herfried Griengl,*

Irene Kopper, Antje Lehmann und Hansjörg Weber

Die Anwendung von Enzymen und Mikroorganismen in der organischen Synthese wurde innerhalb der letzten zehn bis fünfzehn Jahre ein wertvolles und unverzichtbares Werkzeug der Synthesechemie.^[1] Da im allgemeinen nicht die

[*] Prof. Dr. H. Griengl, Dr. G. Braunegg, Dr. A. de Raadt, S. Feichtenhofer, I. Kopper, Dr. A. Lehmann, Dr. H. Weber
Spezialforschungsbereich F01 Biokatalyse
Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Graz
Stremayrgasse 16, A-8010 Graz (Österreich)
Fax: (+43) 316-873-8740
E-mail: Sekretariat@orgc.tu-graz.ac.at

- [**] Wir danken Prof. K. Kieslich für die Durchführung des Screenings, C. Illaszewicz für die Aufnahme der NMR-Spektren und M. Kaube für die Unterstützung bei der Manuskriptgestaltung.
-  Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.