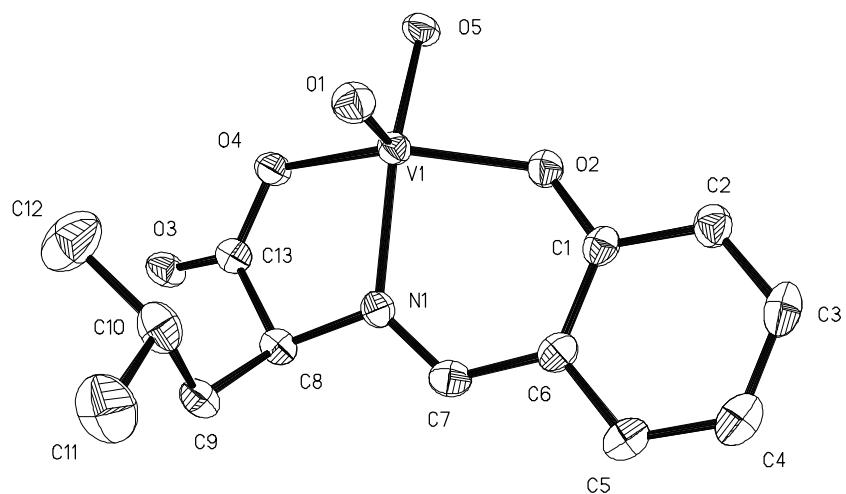


## D. Zusammenfassung

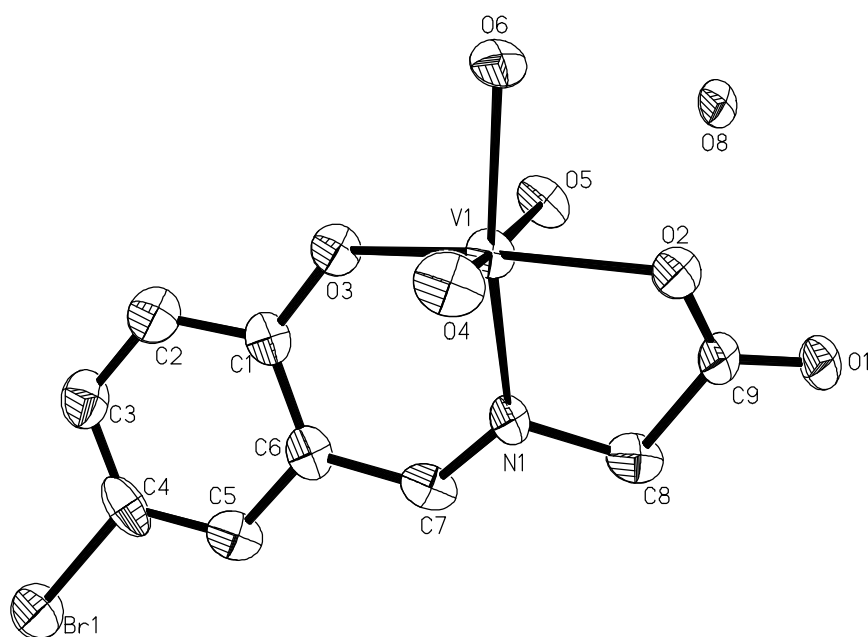
Die vielfältigen biogenen Wirkungen und Funktionen des Vanadiums sind Gegenstand einer ausgeprägten Forschungsaktivität. Zum einen wird versucht, mittels struktureller Modelle die spektroskopischen Daten der natürlich vorkommenden Vanadiumverbindungen besser zu verstehen oder diese Modelle als Wirkungsanaloga z.B. in der Medizin einsetzen zu können. Zum anderen richtet sich das Interesse auf die Wirkungsmechanismen vanadiumhaltiger Enzyme. Von generellem Interesse sind dabei unter anderem die Vanadium-Histidin-Bindung (mittels der das Vanadium häufig an Proteinseitenketten gebunden wird, wie dies auch in den Vanadium-Nitrogenasen und vanadatabhängigen Haloperoxidasen der Fall ist) die Modellierung der sauerstoff- und stickstofffunktionellen Umgebungen des Vanadiums, sowie der in der Natur vorkommenden Non-oxo-Komplexe.

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche strukturelle Modelle insbesondere für die reduzierte Form der vanadatabhängigen Bromoperoxidase aus dem Seetang *Ascophyllum nodosum* synthetisiert und mit verschiedenen Methoden je nach Löslichkeit und Oxidationsstufe des Vanadiums charakterisiert. Es wurden Oxo-Schiffbasen-Komplexe als Modelle für die reduzierte Form der vanadatabhängigen Bromoperoxidase und Non-oxo-Schiffbasen-Komplexe von Vanadium(IV) hergestellt, z. T. mit Citrat- oder Homocitrat-Liganden analog zur Koordination in der Vanadium-Nitrogenase.

Dabei konnten von zwei prinzipiell sehr ähnlichen Oxo-Komplexen Röntgenstrukturen erhalten werden, die doch deutlich unterschiedliche Koordinationsverhältnisse aufweisen, nämlich eine tetragonal pyramidale und eine oktaedrische Koordination.



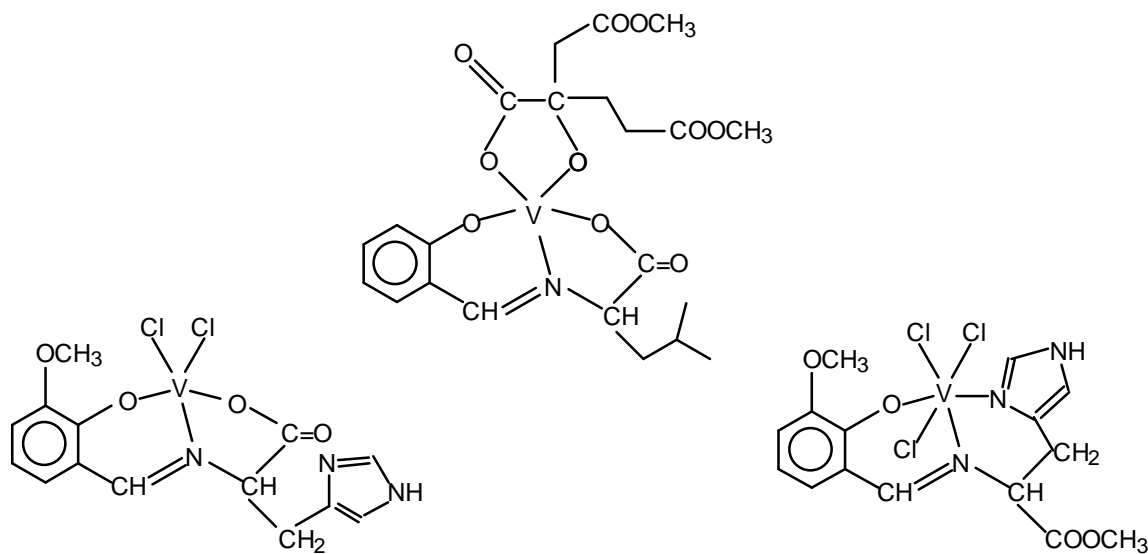
ORTEP-Zeichnung von  $\text{VO}(\text{H}_2\text{O})(\text{sal-leu})$  **1b**



ORTEP-Zeichnung von  $\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{Br-sal-gly})$  **1e**

Es wurden weiterhin Vanadium(IV)- und (V)-Verbindungen mit histidinhaltenen Schiff'schen Basen hergestellt, in denen zum Teil die Koordination des Histidins an das Vanadium über seinen Imidazolyl-Stickstoff verwirklicht ist.

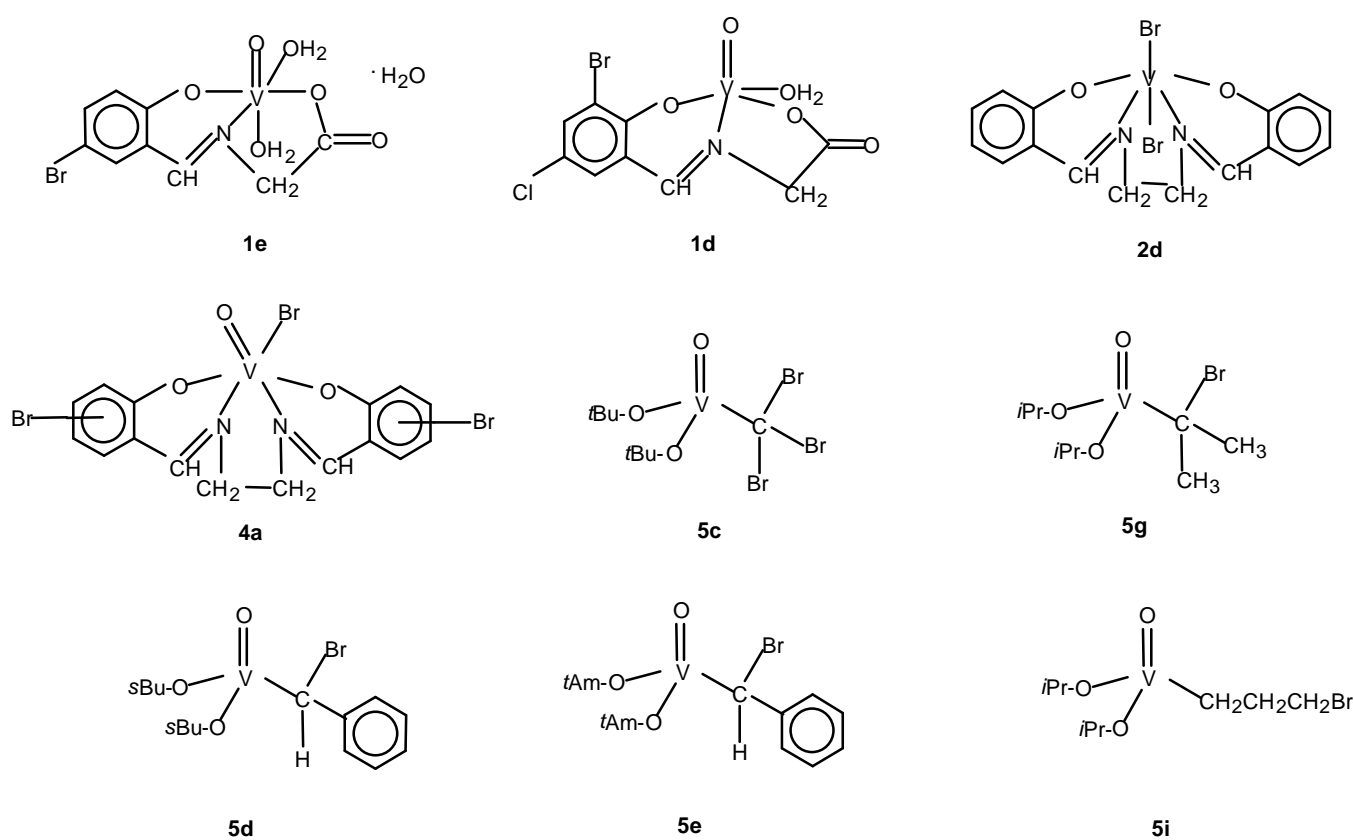
Die Histidinverbindungen zeigen im IR-Spektrum große Übereinstimmung und sind dort kaum zu unterscheiden. Im ESR-Experiment hingegen verhalten sie sich auffällig unterschiedlich, was auf eine stark abweichende Koordinationsumgebung schließen läßt. Die Hyperfeinkopplungskonstante für die Verbindung mit einem über seinen Imidazolring koordinierten Histidin ist extrem klein, im Gegensatz zum Komplex mit Carboxylat-Koordination des Histidins. Vermutlich sind im ersteren Falle drei Chloroliganden in der Koordinationasphäre des Vanadiums, was eine ausgesprochen starke Delokalisierung des ungepaarten Elektrons zur Folge hat. Den Citrat- und Homocitrat-Liganden wird aufgrund der ESR-Daten der entsprechenden Vanadiumkomplexe ein überraschend großes Delokalisierungsvermögen des ungepaarten Elektrons zugesprochen, was möglicherweise ein Hinweis auf die Bedeutung des Homocitratrestes in der Vanadium-Nitrogenase ist.



Strukturvorschläge für  $[V(IV)\{O^{\text{homocitrat-1,6-dimethylester-O}^-\}\{N-(2\text{-oxidosalicyliden})\text{-L-Leu-O}^-\}]$  **3e**,  $[VCl_2\{N-(2\text{-oxido-3-methoxysalicyliden})\text{-L-His-O}^-\}]$  **2h** and  $[VCl_3\{N-(2\text{-oxido-3-methoxysalicyliden})\text{-L-His-N}\}]$  **2i**

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit befaßt sich mit der Aufklärung des Bindungsmodus des Bromids in der vanadatabhängigen Bromperoxidase aus *Ascophyllum nodosum*.

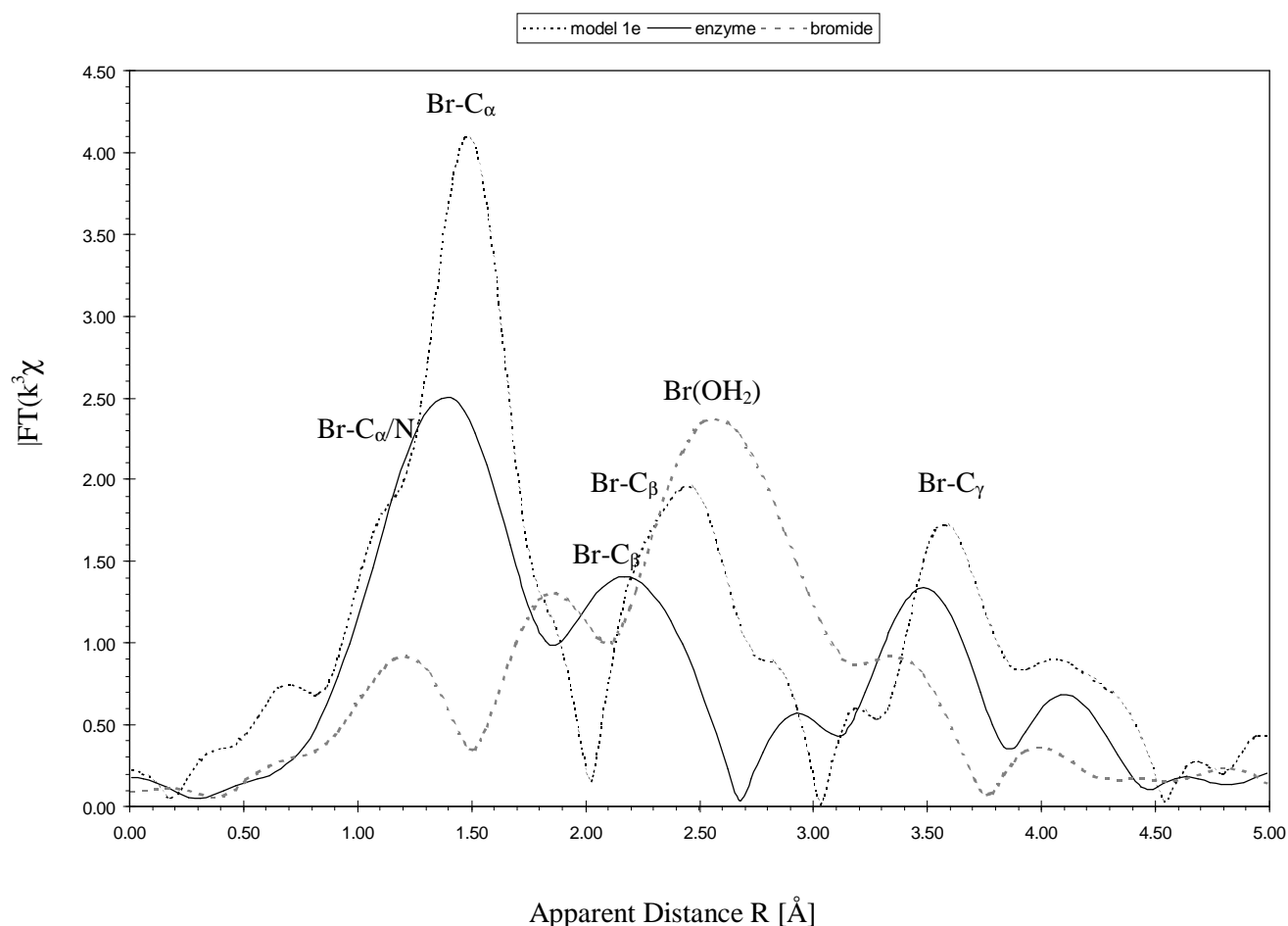
Dafür wurden Vanadium-Brom-Verbindungen mit sehr unterschiedlichen Abständen (direkte V-Br-Bindung mit 2,4 Å bis hin zu einem Abstand von 7,4 Å) dieser Atome zueinander synthetisiert. Dabei stellen die Vanadium-Komplexe mit einer Vanadium- $\sigma$ -Organyl-Bindung zu bromorganischen Liganden eine bisher nicht bekannte Substanzklasse dar. Diese labilen Verbindungen sind über Alkoxo-halogeno-oxovanadium Vorläuferverbindungen zugänglich.



Vanadium-Bromverbindungen, die als Modelle für die XAS-Experimente verwendet wurden

Die Modelle, bromidbeladene Enzymproben und eine wäßrige Rubidiumbromid-Lösung wurden mit der XAS-Spektroskopie an der K-Kante von Brom, die Modelle auch an der K-Kante von Vanadium untersucht, wobei vor allem die besondere Ähnlichkeit sowohl im XANES- als auch im EXAFS-Bereich zwischen den Spektren von Enzym und Modell **1e**, von dem zusätzlich noch die Röntgenstruktur bestimmt werden konnte (siehe oben),

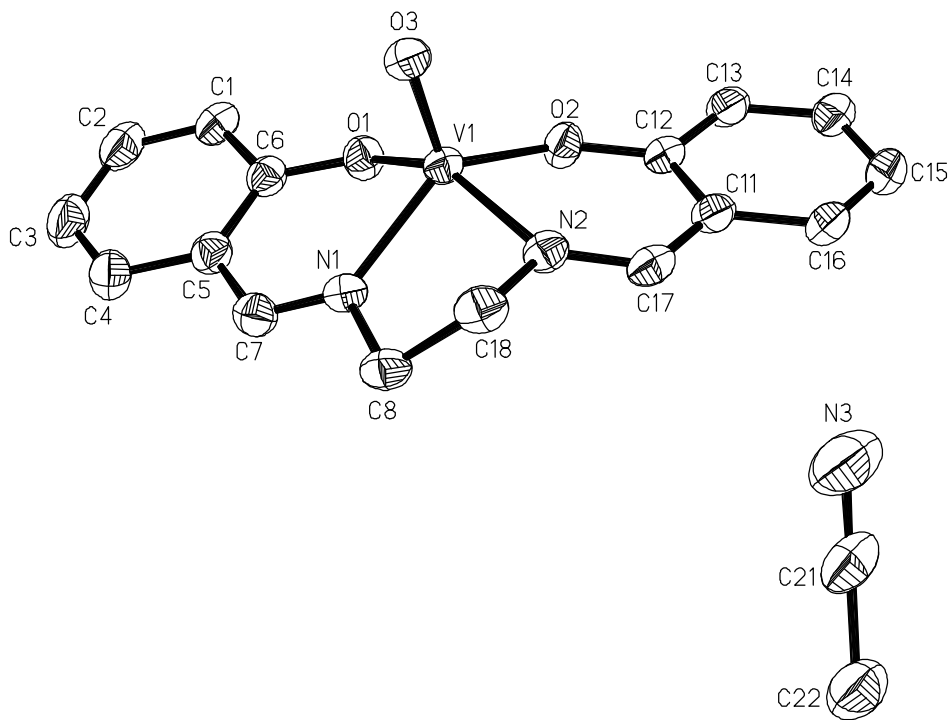
bemerkenswert ist. Der Hauptpeak im EXAFS-Spektrum, bei 1,87 Å, sollte einer Bindung des Br an einen  $sp^2$ -hybridisierten Kohlenstoff oder an Stickstoff entsprechen.



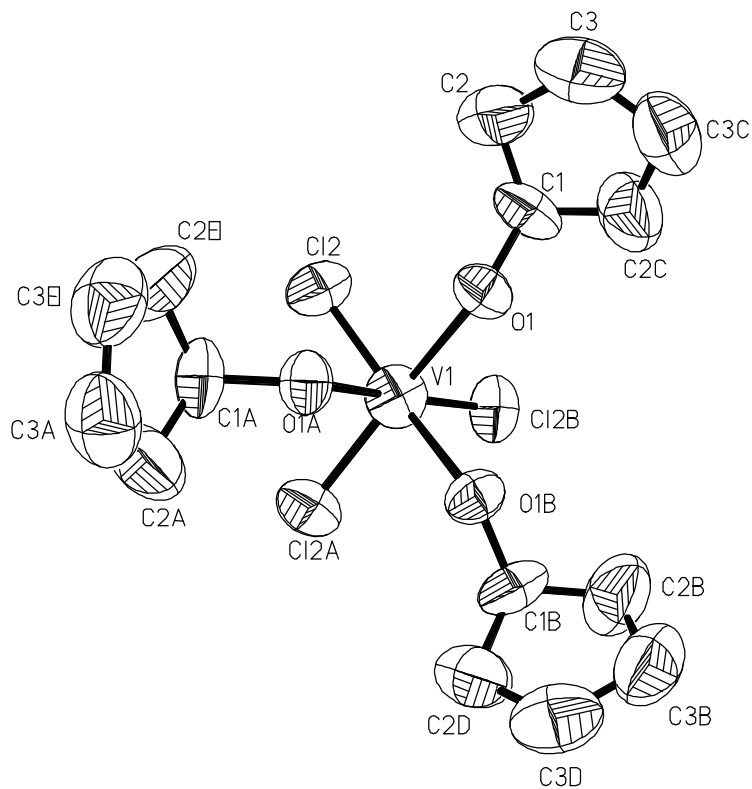
#### Fourier-transformierte-EXAFS-Spektren der Br-K-Kante von Enzym, Bromid und Modell **1e**

Von den beiden bisher diskutierten möglichen Bindungsstellen für das Bromid, Serin und Histidin, erscheint aufgrund der hier durchgeführten Untersuchungen das Histidin als die wahrscheinlichere. Es ist mittels dieser EXAFS-Experimente also gelungen, eine mehr als nur flüchtige direkte Bindung des Broms an das Vanadium, sowie eine ionische Bindung auszuschließen.

Weitere mittels Röntgenstrukturanalyse charakterisierte Verbindungen sind  $[VO(\text{salen})]\cdot\text{CH}_3\text{CN}$  und  $[VCl_3(\text{OR})(\text{HOR})_2]$ , R = cyclopentyl.



ORTEP-Zeichnung von VO(salen)·CH<sub>3</sub>CN

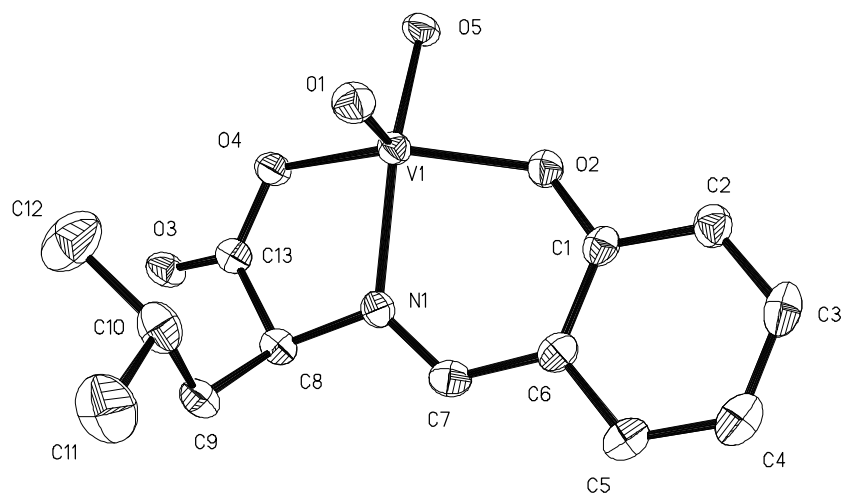


ORTEP-Zeichnung von VCl<sub>3</sub>(O-cyclopentyl)(HO-cyclopentyl)<sub>2</sub>

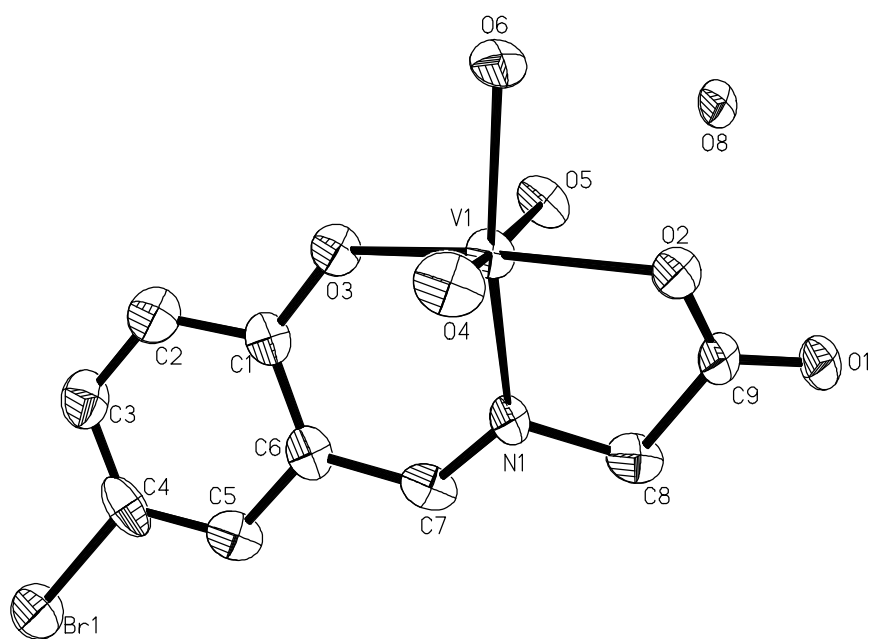
## Summary

A multitude of biogenic effects and functions of vanadium are presently subject of intense research activities. This includes efforts towards a better understanding of spectroscopic characteristics of naturally occurring vanadium compounds through structural models or compounds designed as functional analogues so as to be employed for, e.g. medicinal applications. Further interest is directed towards the mechanism of the function of vanadium containing enzymes. Of general interest in this context is, inter alia, the vanadium-histidine bond (by means of which vanadium is often co-ordinated to protein side-chains, examples being vanadium nitrogenases and vanadate-dependent haloperoxidases), modelling of the oxygen- and nitrogen-functional environment of vanadium, and naturally occurring non-oxo complexes.

In the present work, differing structural models chiefly for the reduced form of vanadate-dependent bromoperoxidase from the sea-weed *Ascophyllum nodosum* were synthesised and characterised by various methods, depending on the solubility properties and oxidation state of vanadium. Schiff-base oxo- and non-oxovanadium(IV) complexes were prepared, containing, in part citrate or homocitrate as additional ligands in analogy to the co-ordination mode of vanadium in vanadium-nitrogenases. Two oxo complexes have been structurally established by X-ray diffraction spectrometry. Although similar in principal, the two compounds exhibit different co-ordination in that one is tetragonal-bipyramidal while the other is octahedral.



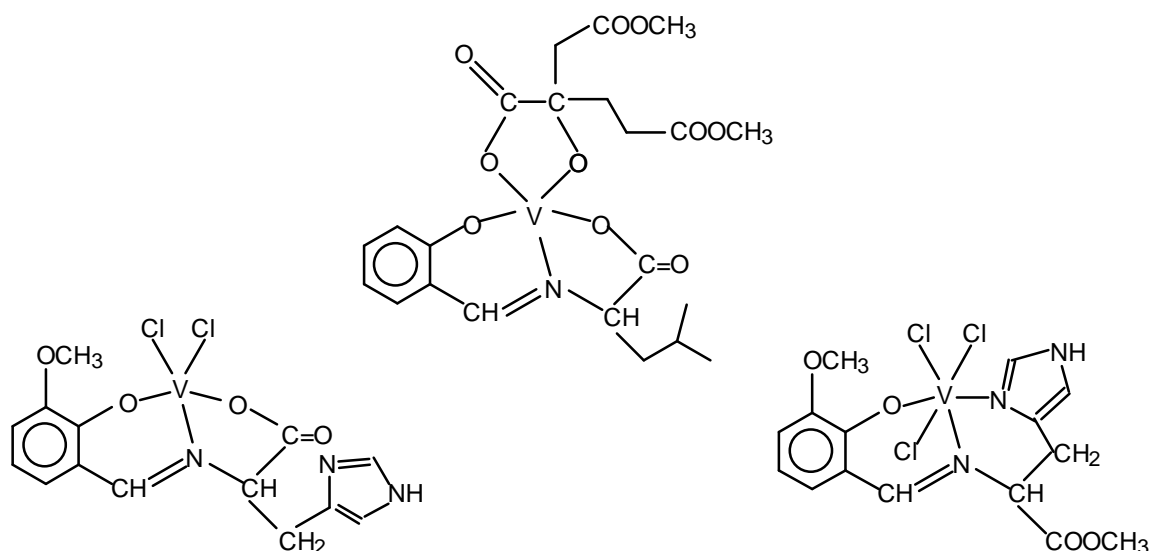
ORTEP drawing of  $\text{VO}(\text{H}_2\text{O})(\text{sal-leu})$  **1b**



ORTEP drawing of  $\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{Br-sal-gly})$  **1e**

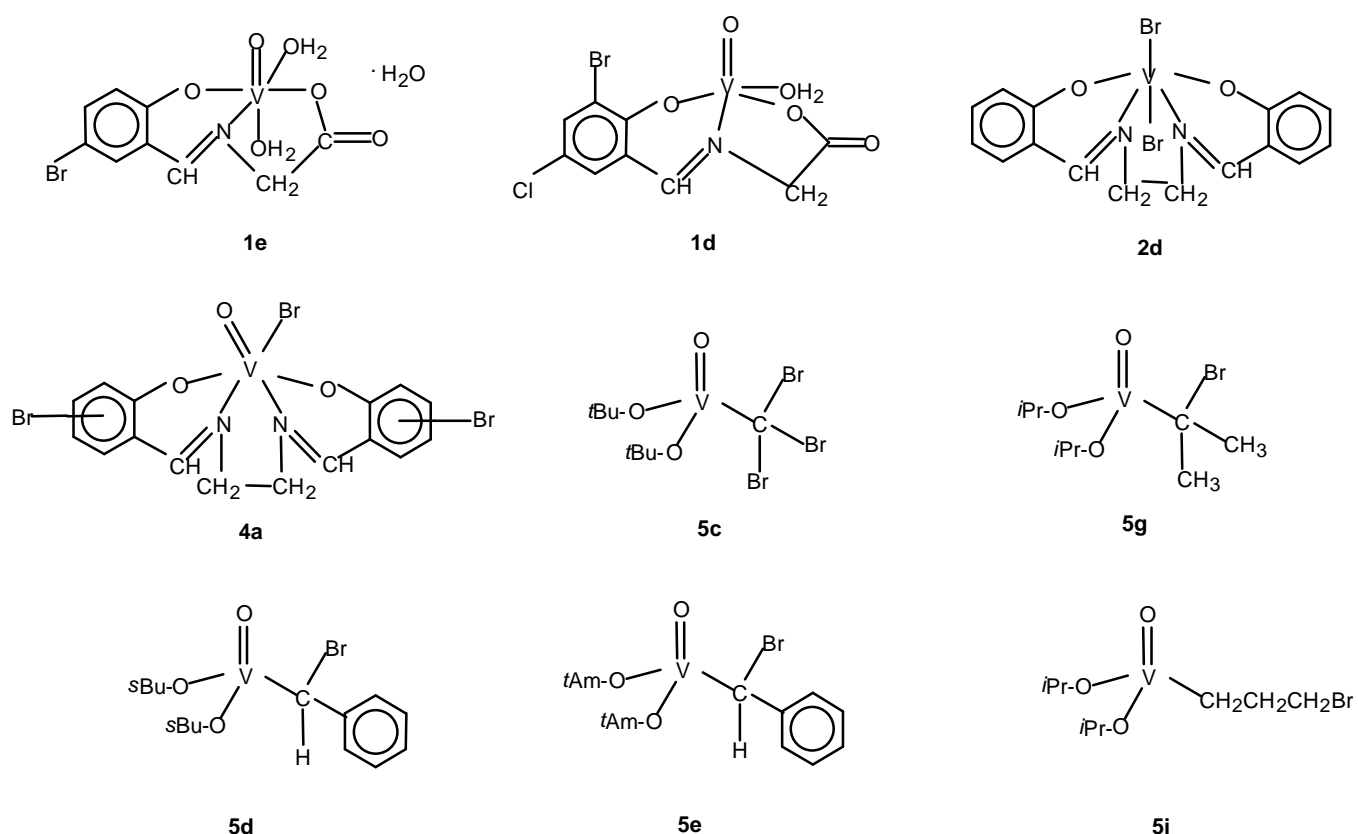


In addition, vanadium(IV) and –(V) compounds with histidine containing Schiff bases were prepared, in which, in several cases, histidine co-ordinating to vanadium via the imidazolyl nitrogen is realised. The histidine complexes show very similar IR spectra and are thus hardly distinguishable by this method. In contrast, they behave greatly different in the EPR experiment, pointing towards strongly differentiated co-ordination spheres. The hyperfine coupling constant for one of the compounds with imidazol co-ordination is rather small, contrasting the complex with carboxylate co-ordination of the histidine. In the former complex, there are presumably three chloro ligands directly attached to vanadium, resulting in effective delocalisation of the unpaired electron. Strong delocalisation of unpaired electron density is also going along with the citrate and homocitrate complexes, and this finding might be of some importance for the role of homocitrate in vanadium-nitrogenase.



Proposed structures for  $[V(IV)\{O^{\cdot-}\text{homocitrate-1,6-dimethylester-O}^{\cdot-}\}\{N-(2\text{-oxidosalicylidene})\text{-L-Leu-O}^{\cdot-}\}]$  **3e**,  $[VCl_2\{N-(2\text{-oxido-3-methoxysalicylidene})\text{-L-His-O}^{\cdot-}\}]$  **2h** and  $[VCl_3\{N-(2\text{-oxido-3-methoxysalicylidene})\text{-L-His-N}\}]$  **2i**

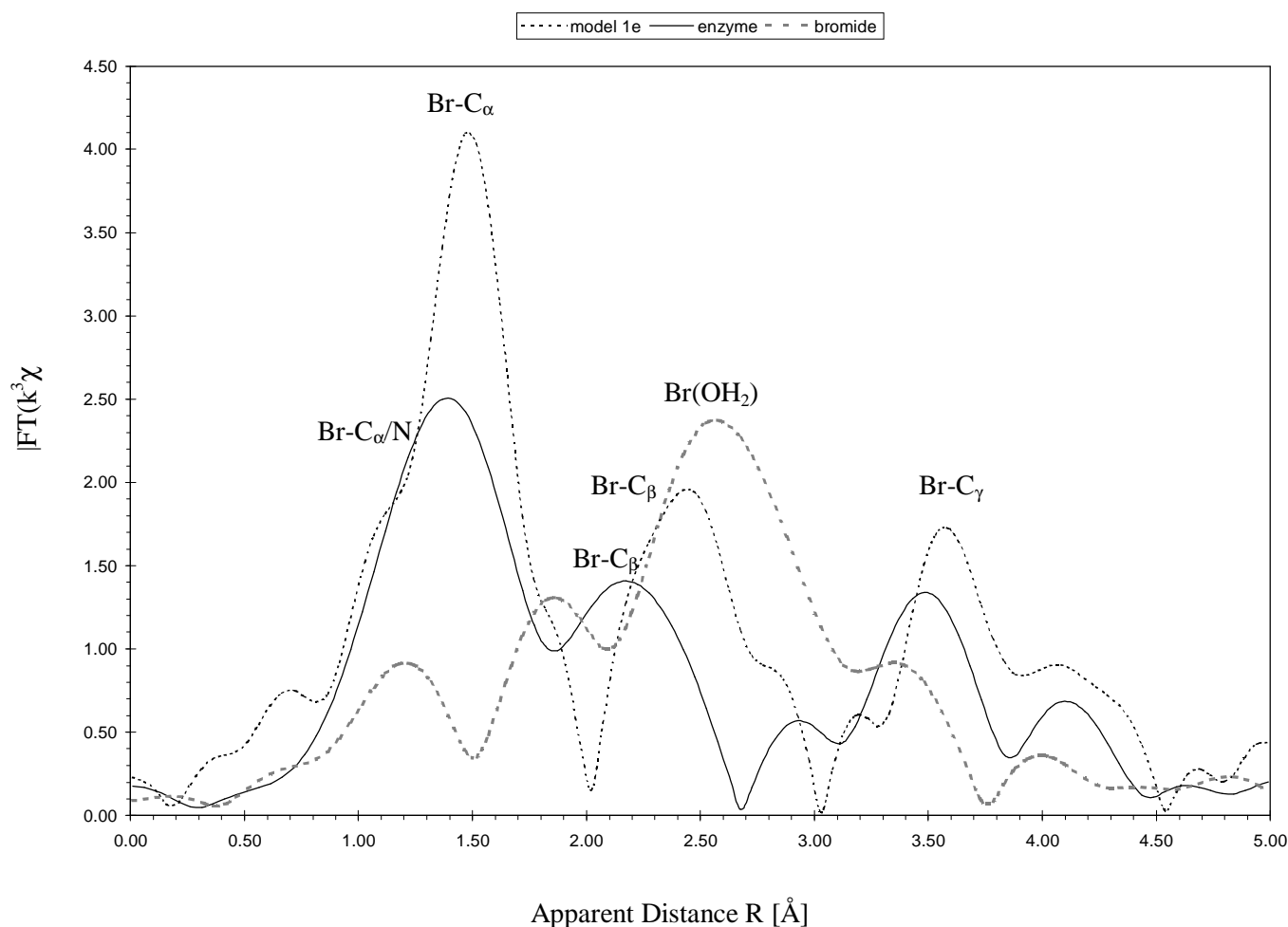
In a second main effort of the present work, the mode of binding of substrate bromide to the Ascophyllum peroxidase has been investigated. For this issue, bromine-containing vanadium compounds have been synthesised, covering a broad range of vanadium-bromine distances (direct V-Br bond of 2.4 Å up to a distance of 7.4 Å). Within this group of model compounds,  $\sigma$ -organyl-vanadium complexes containing a bromoorganic ligand represent a so far unknown class of substances. These labile compounds have been prepared from alkoxo-halogeno-oxovanadium(V) precursors.



Selection of bromine containing vanadium compounds used as models in XAS experiments.

The models, along with bromide-loaded enzyme and aqueous rubidium bromide solutions were investigated by bromine K-edge (in the case of the model compounds also by vanadium K-edge) XAS spectroscopy. The most striking feature is the similarity of the spectra of the enzyme and the model compound [VO(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(5-Br-salicylidene-glycinato)] (**1e**) both in the XANES and the EXAFS region. **1e** has also been structurally characterised by X-ray

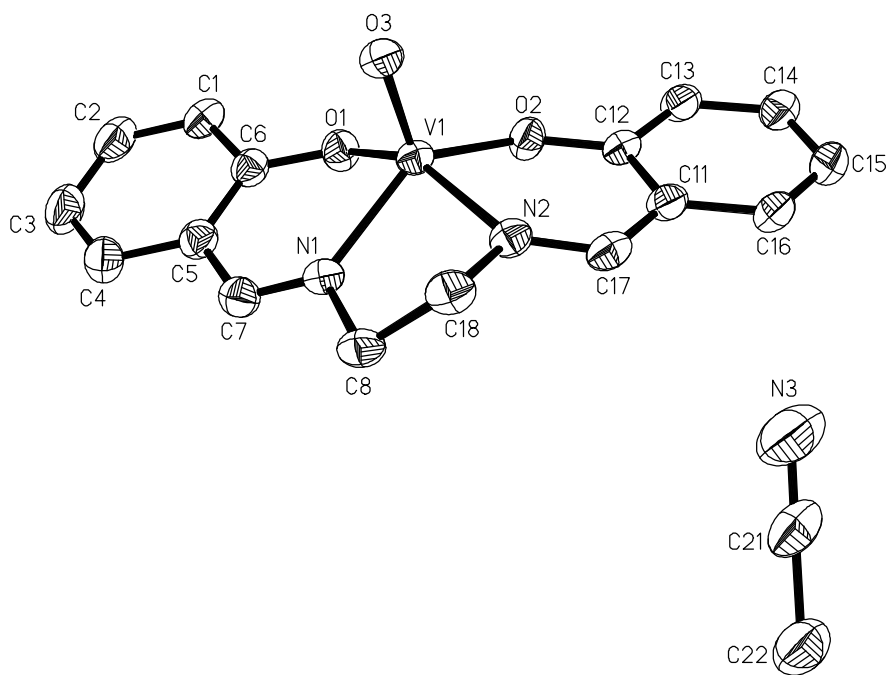
diffraction (vide supra). The main peak in the EXAFS, at 1.87 Å, should correspond to bromine bonded to an  $sp^2$  hybridised carbon or a nitrogen.



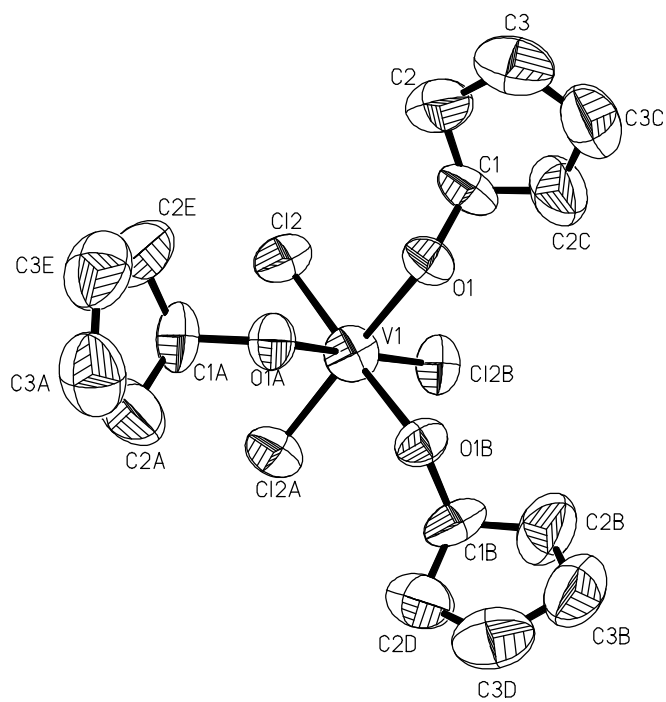
Fourier-transformed EXAFS spectra (bromine K-edge) of enzyme + bromide and model compound **1e**

Of the alternative binding sites for bromide so far under discussion, viz. serine and histidine, the latter, based on the EXAFS findings, appears to be the more likely one. In any case, a direct binding of bromine to vanadium and an ionic interaction could be excluded by our experiments. Additional experiments will, however, be necessary to finally clarify the binding mode of bromine.

Further compounds characterised by X-ray diffraction are  $[VO(salen)]\cdot CH_3CN$  and  $[VCl_3(OR)(HOR)_2]$ ,  $R$ =cyclopentyl.



ORTEP drawing of VO(salen)·CH<sub>3</sub>CN



ORTEP drawing of VCl<sub>3</sub>(O-cyclopentyl)(HO-cyclopentyl)<sub>2</sub>