Oxoperoxokomplexe des Vanadiums als Modelle für das aktive Zentrum vanadatabhängiger Peroxidasen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

von

Marian Časný

aus
Bratislava
Slowakische Republik

Hamburg 2003

Tor zur Welt der Wissenschaft

D Zusammenfassung

Vanadat-abhängige Haloperoxidasen katalysieren die Oxidation von Halogenid zu Unterhalogeniger Säure mittels Peroxid. Im aktiven Zentrum der Peroxidasen ist Vanadat kovalent an ein Histidin der Proteinmatrix gebunden. Im Rahmen des turn-over wird ein Oxoperoxo-Komplex gebildet, der eine Oxogruppe und ein Proton auf das Substrat überträgt. In der vorliegenden Arbeit werden Oxoperoxokomplexe des Vanadiums als Modelle der Peroxoform der Peroxidasen synthetisiert und festem Zustand sowie in Lösung charakterisiert. Weiterhin wird die Bromoperoxidase aus der marinen Braunalge *Ascophyllum nodosum* isoliert und XAS- sowie NMR-Studien unterworfen.

Als Liganden wurden u.a. die in Abbildung S 1 gezeigten mehrzähnigen Aminderivate eingesetzt. Für Bis(picolyl)glycin (Hbpg) and Bis(picolyl)-β-alanin (Hbpa) wird ein modifizierter Syntheseweg - über 2-Aminomethylpyridin und Bis(pyridyl)amin - vorgestellt.

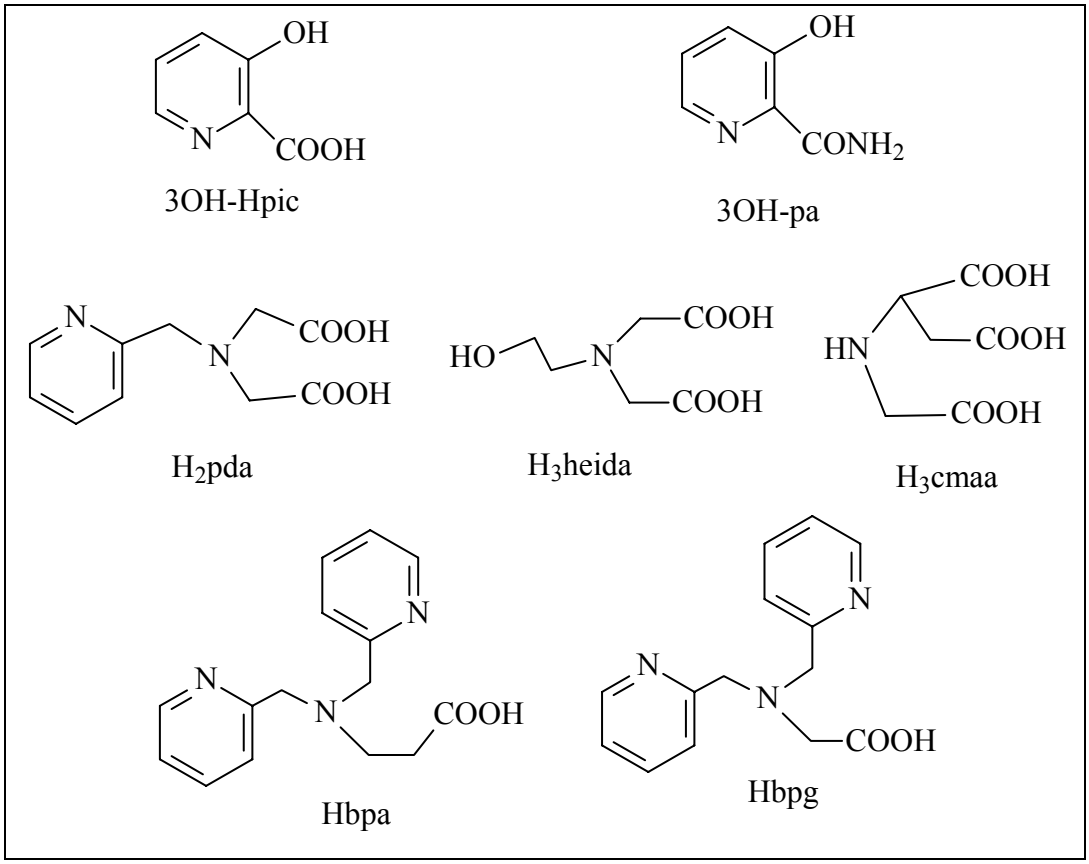

Abbildung S 1: Strukturformeln der Liganden Hbpa, Hbpg, H_3cmaa, H_3heida, H_2pda, 3OH-Hpic und 3OH-pa

Die Umsetzung von Hbpa mit Vanadat in stark saurem Milieu führte zu Komplexen der Zusammensetzung $[VO(O_2)Hbpa][ClO_4]\cdot 2H_2O$ (Abbildung S 2) bzw.

$2[VO(O_2)Hbpa][ClO_4]\cdot[VO(O_2)bpa]\cdot 2.25H_2O$ (beide strukturell charakterisiert). Durch ^{17}O-NMR-Untersuchungen unter Verwendung von ^{17}O-angereichertem H_2O_2 konnte gezeigt werden, dass kein Austausch des Peroxo-Liganden mit Peroxid aus dem Medium erfolgt. Die Umsetzungen mit H_3cmaa führte zu den Komplexen $M_2[VO(O_2)cmaa(H_2O)]$ (M = NH_4, $N(n\text{-}C_4H_9)_4$, K) und $K[VO(O_2)Hcmaa(H_2O)]$. ^{51}V-NMR-Studien zeigten hier das Vorliegen von mindestens zwei Isomeren (***endo-*** und ***exo-***Formen) in Lösung, und erlauben Einblick in die relativen Stabilitäten dieser beiden Isomeren in Abhängigkeit vom pH der Lösung. Versuche, diese Komplexe in kristalliner Form zu erhalten, führten zur Bildung von Einkristallen des Dekavanadats $K_4[Na_2(H_2O)_8(\mu\text{-}H_2O)_2][V_{10}O_{28}]$. Schließlich ergab die Umsetzung mit H_3heida den Komplex $K[VO(O_2)Hheida]\cdot 2H_2O$, der ebenfalls durch Röntgenstrukturanalyse charakterisiert wurde.

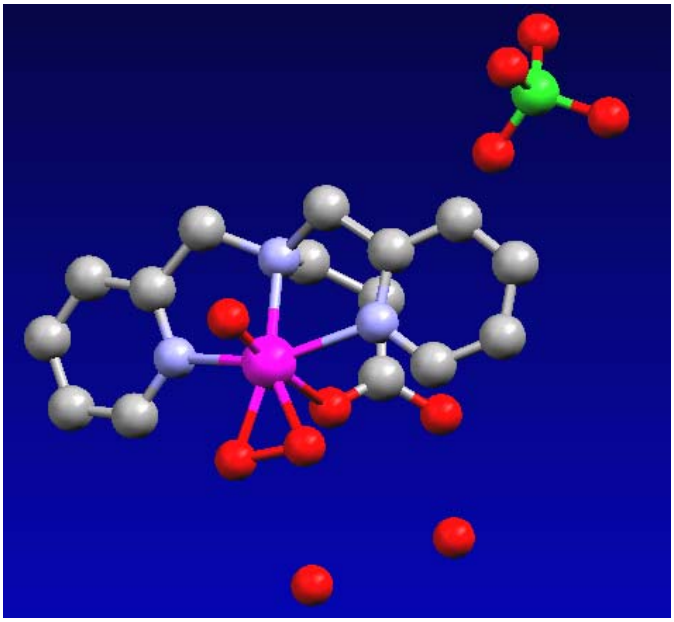

Abbildung S 2: Struktur des Komplexes $[VO(O_2)Hbpa][ClO_4]\cdot 2H_2O$

Durch die Reaktionen von Vanadat oder Vanadiumpentoxid mit 3-Hydroxypicolin-Derivaten in Gegenwart von Peroxid konnten u.a. die folgenden Komplexe erhalten werden: $[VO(O_2)(3OH\text{-}pa)_2]X$ (X = Cl, ClO_4), $[VO(tert\text{-}BuOO)(3OH\text{-}pa)_2]^{2+}$, $M[VO(O_2)(3OH\text{-}pic)_2]$ (M = $N(n\text{-}C_4H_9)_4$, NH_4), $[VO(tert\text{-}BuOO)(3OH\text{-}pic)_2]$. Die Peroxokomplexe zeigen im ^{51}V-NMR-Spektrum Signale bei charakteristischen Lagen zwischen –580 und –615 ppm (gegenüber den peroxidfreien, Dioxokomplexen – z.B. $[N(n\text{-}C_4H_9)_4][VO_2(3OH\text{-}pic)_2]$ mit $\delta(^{51}V)$-Werten um –520 ppm). Die Komplexe $[N(n\text{-}C_4H_9)_4][VO(O_2)(3OH\text{-}pic)_2]$ und $[NH_4][VO(O_2)(3OH\text{-}pic)_2]\cdot H_2O$ konnten wieder strukturell aufgeklärt werden (Abb. S3). Von besonderem Interesse in Hinblick auf den Modellcharakter für die Haloperoxidasen ist das Wasserstoffbrückennetzwerk im Komplex $[NH_4][VO(O_2)(3OH\text{-}pic)_2]\cdot H_2O$, in das die

Peroxogruppe, der Oxoligand, die OH-Gruppe des Picolinatliganden, das Kristallwasser und das Ammoniumion einbezogen sind (Abb. S4).

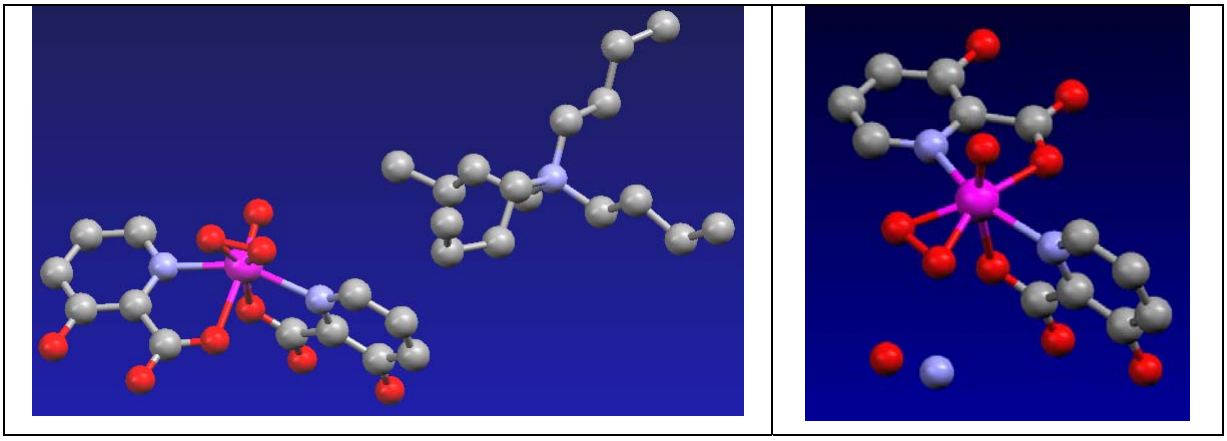

Abbildung S 3: Molekülstruktur der Komplexe $[N(n\text{-}C_4H_9)_4][VO(O_2)(3OH\text{-}pic)_2]$ und $[NH_4][VO(O_2)(3OH\text{-}pic)_2]\cdot H_2O$ (die H-Atome sind hier mit nicht abgebildet)

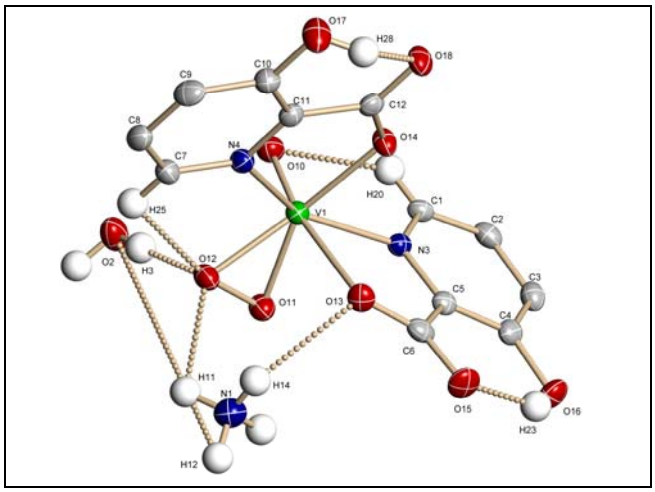

Abbildung S 4: Wasserstoffbrücken-Netzwerk im Komplex $[NH_4][VO(O_2)(3OH\text{-}pic)_2]\cdot H_2O$

Da in der Literatur verschiedentlich über insulinmimetische Eigenschaften insbesondere auch von Peroxo-Komplexen des Vanadiums berichtet wird, wurden ausgewählte Peroxokomplexe *in vitro* mittels Simian-Virus transformierter Fibroblasten von Mäusen (Zelllinie SV 3T3) auf ihre Cytotoxizität und insulin-mimetischen Eigenschaften (Stimulierung der Glucoseaufnahme) untersucht (bcm-research, Entrischenbrunn). Die Komplexe sind bei physiologischen Konzentrationen (10 µM und weniger) nicht toxisch, und in der Regel in ihrer Befähigung, Aufnahme und Abbau von Glucose durch die Zellen dem Insulin vergleichbar.

In einem weiteren umfangreichen Teil der Arbeit wird die Isolierung der Bromoperoxidase aus Trockenmasse des Knotentangs (*Ascophyllum nodosum*) beschrieben, die in den Grobreinigungsschritten im Technikum der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in

Braunschweig, in der Feinreinigungsphase in der Abteilung für Biochemie des Fachbereichs Chemie in Hamburg vorgenommen wurde. Die technikumsmäßige Vorreinigung, die besonders durch die hohen Alginsäure und Polyphenolgehalte der Algen erschwert war, erfolgte in einem dreistufigen Flüssig-Flüssig-Extraktionsprozess im Zweiphasensystem, die Feinreinigung durch mehrere hintereinandergeschaltete Vorgänge der hydrophoben Interaktionschromatographie und anionischen Austauschchromatographie. Nach Rekonstitution des hochgereinigten Enzyms durch Dialyse gegen Vanadat und Aufkonzentration wurden 1.85 mL (Proteingehalt 33.3 mg/mL; spezifische Aktivität 800 $U^{\#}$) des Isoenzyms der Molmasse 120 kD (elektrophoretisch) aus ursprünglich 11.8 kg Algentrockenmasse erhalten.

Mit Teilen dieser Enzymprobe wurden einerseits XAS-Messungen (ESRF in Grenoble) zur Substratbindung, andererseits „Festkörper"-^{51}V-NMR-Messungen (Institut für Physikalische Chemie II, Universität Dortmund) und ^{17}O-NMR-Messungen (Hamburg) durchgeführt.

Die XAS-Messungen in Gegenwart von Bromid (oder Jodid) als Substrat ergaben im Kantenbereich einen intensitätsstarke und in mindestens zwei Komponenten aufgelösten Vorkanten-Peak, in Übereinstimmung mit der zu erwartenden niedrigen lokalen Symmetrie. Die energetische Lage des Vorkantenpeaks (und der K-Kante selbst) schließt eine direkte Koordination des Bromids an das Vanadiumzentrum aus. Das wird bestätigt durch den EXAFS-Bereich, in dem kein V-Br-Abstand gefunden wird, wohl aber eine V···Br-Distanz von 4.2 Å, die auf das Vorhandensein von Bromid im aktiven Zentrum schließen lässt. Der EXAFS-Bereich weist im Übrigen einen Peak bei 1.98 und 2.79 Å aus, die mit der Koordination von O/N in erster Sphäre bzw. leichten Atomen (C aus der organischen Matrix, O von Wassermolekülen) in zweiter Sphäre gefittet werden können.

^{51}V-NMR-Messungen der gelartigen Lösung des Enzyms am Dortmunder Festkörper-NMR-Gerät ergab eine überraschen hohe und nur schwer interpretierbare Verschiebung von -930 ppm, die bei Zugabe von H_2O_2 noch auf -1160 zunimmt, bei mehrtägigem Stehen aber dann auf einen erwarteten Wert von -473 ppm abfällt. Die hohen Verschiebungen werden versuchsweise mit der Bildung von Mono- und Diperoxokomplexen erklärt. Das ^{17}O-NMR-Spektrum einer mit angereichertem $H_2{}^{17}O_2$ versetzten Probe des Enzyms zeigt ein Signal für die Peroxoform des Enzyms (bei ca. 600 ppm) sowie für ein Hydroperoxoderivat (Doppelsignal bei ca. 200 ppm). Ein Hydroperoxo-Intermediat wird im katalytischen Prozess als Angriffspunkt für das nukleophile Substrat postuliert.

E Summary

Vanadate-dependent haloperoxidases catalyse the oxidation of halide to hypohalous acid by peroxide. In the active centre, vanadate is covalently bound to a histidine of the protein matrix. In the course of the turnover, an oxo-peroxo complex forms, which transfers an oxo group and a proton to the substrate. In the present work, oxo-peroxo complexes of vanadium, serving as model compounds of the peroxo form of the peroxidases, are synthesised and characterised in the solid state and in solution. Furthermore, the bromoperoxidase from the marine brown alga *Ascophyllum nodosum* is isolated and subjected to XAS and NMR studies.

The ligands – multidentate amine derivatives – which have been employed are shown in Figure S1. For bis(picolyl)glycine (Hbpg) and bis(picolyl)-β-alanine (Hbpa), a modified synthetic route, via 2-aminomethylpyridine and bis(pyridyl)amines, is introduced.

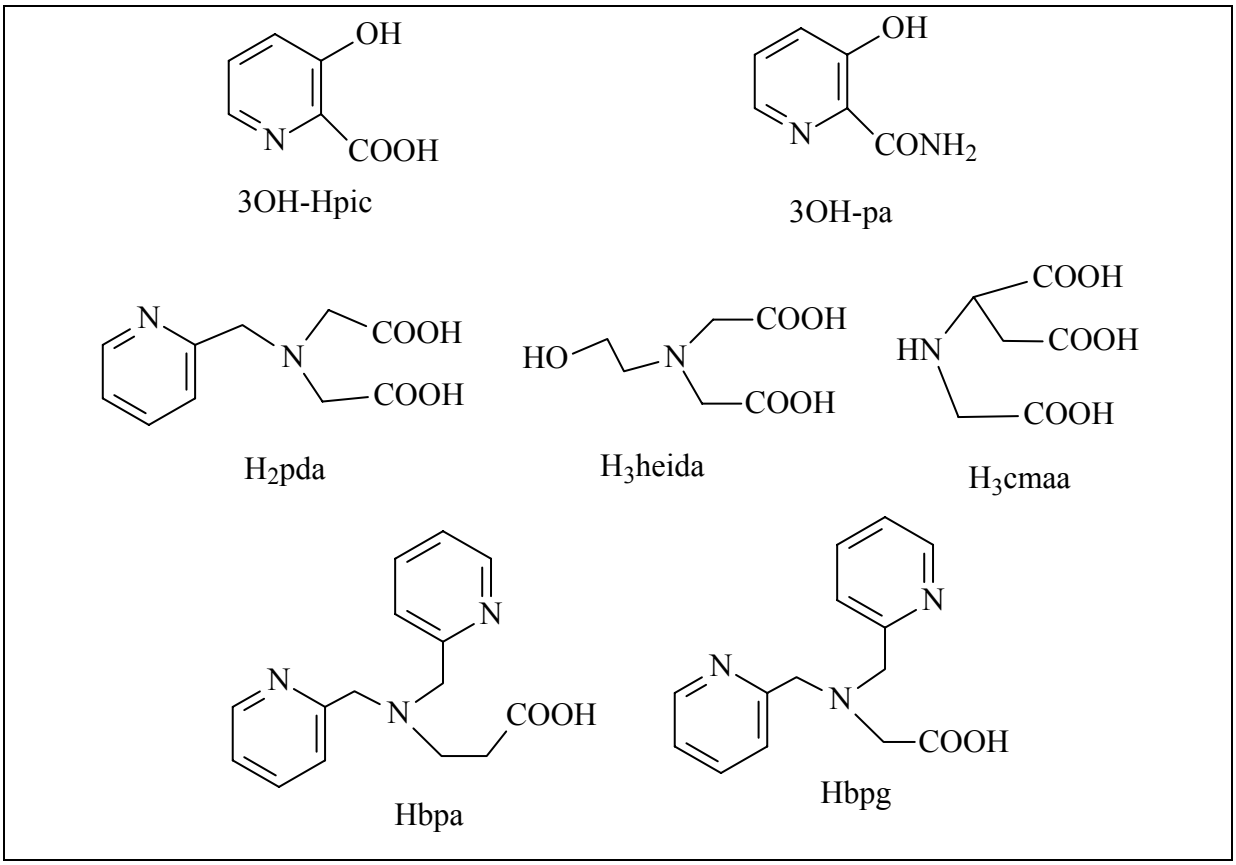

Figure S 1

Reaction of Hbpa with vanadate in strongly acidic media yields complexes of composition $[VO(O_2)Hbpa][ClO_4]\cdot 2H_2O$ (Figure S2) and $2[VO(O_2)Hbpa][ClO_4]\cdot [VO(O_2)bpa]\cdot 2.25H_2O$ (both have been structurally characterised). ^{17}O NMR in the presence of ^{17}O-enriched H_2O_2 revealed that there is no exchange between coordinated peroxide and peroxide from the medium. Reaction with H_3cmaa lead to the complexes $M_2[VO(O_2)cmaa]$ (M = NH_4, $N(n\text{-}C_4H_9)_4$, K) und $K[VO(O_2)Hcmaa]$. According to ^{51}V-NMR studies, there are at least two isomers (*endo* and *exo* form) present in solution. pH-dependent ^{51}V-NMR further allowed insight into the stability of the two forms. Efforts to obtain these complexes in crystalline form lead to the formation of mono-crystals of the decavanadate $K_4[Na_2(H_2O)_8(\mu\text{-}H_2O)_2][V_{10}O_{28}]$. Finally, reactions with H_3heida yielded the complex $K[VO(O_2)Hheida]\cdot 2H_2O$, which was also characterised by X-ray structure analysis.

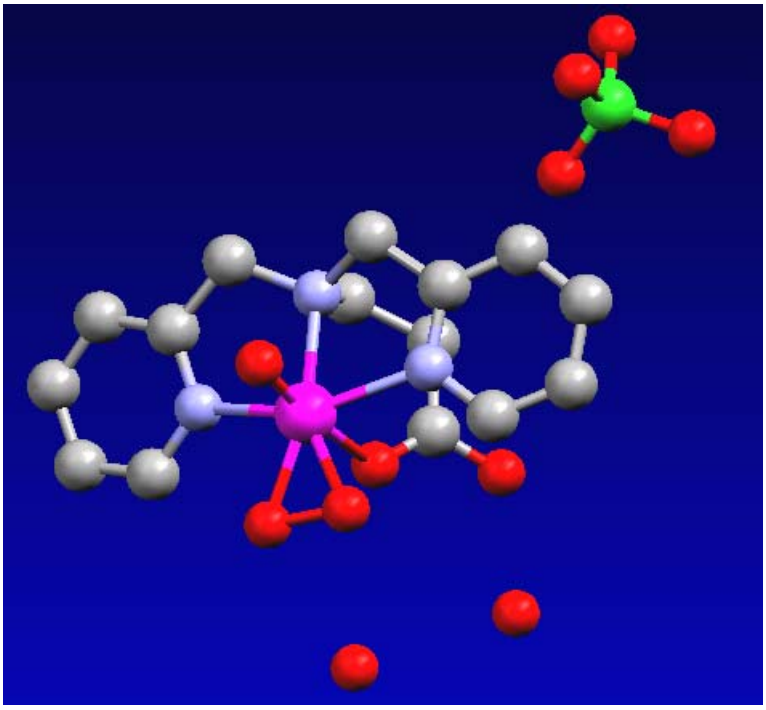

Figure S 2

By reaction of vanadate or vanadiumpentoxide with derivatives of 3-hydroxypicoline in the presence of peroxides, the following complexes have been obtained: $[VO(O_2)(3OH\text{-}pa)_2]X$ (X = Cl, ClO_4), $[VO(tert\text{-}BuOO)(3OH\text{-}pa)_2]^{2+}$, $M[VO(O_2)(3OH\text{-}pic)_2]$ (M = $N(n\text{-}C_4H_9)_4$, NH_4), $[VO(tert\text{-}BuOO)(3OH\text{-}pic)_2]$. In solution, the peroxo complexes are characterised by ^{51}V-NMR signals typically between –580 und –615 ppm (compare the peroxide-free dioxo complexes, such as $[N(n\text{-}C_4H_9)_4][VO_2(3OH\text{-}pic)_2]$, with $\delta(^{51}V)$ values around –520 ppm). The complexes $[N(n\text{-}C_4H_9)_4][VO(O_2)(3OH\text{-}pic)_2]$ and $[NH_4][VO(O_2)(3OH\text{-}pic)_2]\cdot H_2O$ have again been structurally characterised (Figure S3). Of particular interest with respect to the

model character of the compounds is an extended hydrogen bonding network in $[NH_4][VO(O_2)(3OH\text{-}pic)_2]\cdot H_2O$, involving the oxo ligand, the pending OH, the peroxo group, water of crystallisation and the ammonium counter-ion (Figure S4).

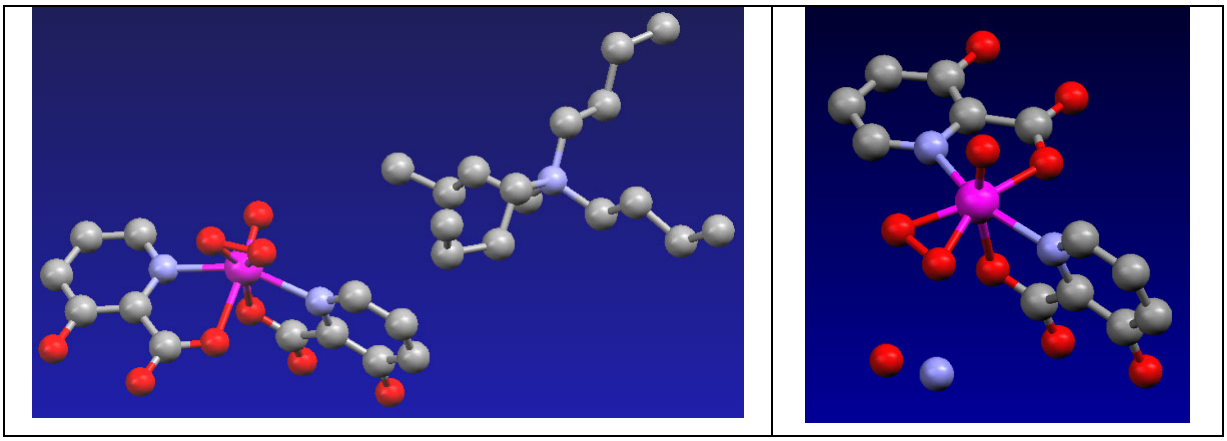

Figure S 3

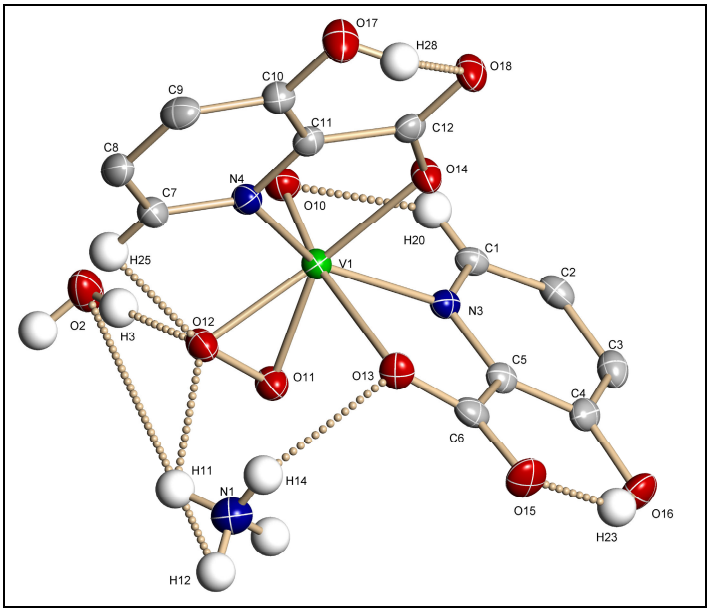

Figure S 4

Peroxovanadium complexes have been reported, in several instances, to exert insulin-mimetic properties. For this reason, *in vitro* investigations (at bcm-research, Entrischenbrunn) of the cytotoxicity and insulin-mimetic properties (stimulation of glucose uptake by cells) have been investigated with Simian virus transformed mice fibroblasts (cell line SV 3T3). The complexes are non-toxic at physiological concentrations (i.e. 10 µM and below), and most of the tested compounds are comparable to insulin in their potential to trigger glucose uptake and metabolism by the cells.

In a second extensive part of the present work, the isolation of the bromoperoxidase from freeze-dried raw material of the alga knotted wrack (*Ascophyllum nodosum*) is described. The various steps for the separation of the enzyme were carried out at the pilot plant of the Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig, the purification procedures at the institute of biochemistry and molecularbiology, University of Hamburg. The separation process at the GBF, hindered by the presence of large amounts of alginic acids and polyphenols, was carried out in three steps by liquid-liquid extraction in two-phase systems, the purification by several consecutive separations through hydrophobic interaction chromatography and anionic exchange chromatography. After reconstitution of the highly purified enzyme by dialysis against vanadate and ultracentrifugal concentration, 1.85 mL (protein contents 33.3 mg/mL; specific activity 800 $U^{\#}$) of the isoenzyme of molecular mass 120 kD (electrophoretically) was obtained from the original amount of 11.8 kg of dried algal material.

Samples of the enzyme were subjected to XAS measurements (ESRF Grenoble) in order to study substrate binding, and to "solid state" ^{51}V-NMR (institute for physical chemistry II, Dortmund) and ^{17}O NMR (Hamburg).

The ^{51}V-NMR investigations of the gel-like enzyme solution at the solid state instrument in Dortmund afforded a surprisingly high and hardly interpretable chemical shift of –930 ppm, which still increased to –1160 ppm on addition of H_2O_2. After several days, these signals decayed in favour of an expected value of –473 ppm. The large chemical shifts are preliminarily explained by the formation of mono- and diperoxovanadium complexes. The ^{17}O NMR experiment of the enzyme in the presence of enriched $H_2{}^{17}O_2$ showed a signal for the peroxo form of the enzyme at ca. 600 ppm, and a double signal at about 200 ppm for a hydroperoxo derivative. A hydroperoxo intermediate is postulated in the catalytic process for the attack of the nucleophilic substrate.