



1 Einleitung

1.1 Kupferenzyme in der Natur

Kupferenzyme sind eine sehr wichtige Untergruppe der Metalloenzyme.^[1] Neben Kupfer sind noch weitere Metalle möglich, wobei die Metallkationen durch Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffdonoratome der entsprechenden Aminosäuren koordiniert werden.^[2,3] Metalloenzyme sind dabei für grundlegende biologische Funktionen, wie Elektronentransfer, Sauerstofftransport, Sauerstoffaktivierung oder Sauerstoffspeicherung verantwortlich, wobei die Art der biologischen Funktion der Metalloenzyme durch das Zusammenspiel der Metallionen und der Proteinmatrix bestimmt wird.^[4] Um einen Radikalcharakter zu erhalten, überwinden Metalloenzyme die in Sauerstoffreaktionen vorhandene Barriere oftmals durch Substrataktivierung mittels eines oxidierten Metallzentrums. Die zweite Möglichkeit ist die Sauerstoffaktivierung durch einen reduzierten Metallkern, der durch eine Zwei-Elektronen-Reduktion aus Sauerstoff ein Peroxid erzeugt.^[5]

Kupferenzyme werden anhand ihrer spektroskopischen Eigenschaften in verschiedene Typen Typ I, Typ II und Typ III eingeteilt.^[6,7] Beispiele der Kupferenzyme der Klassen des Typ I, Typ II und Typ III sind in **Abbildung 1** dargestellt. Diese Enzyme können an drei Hauptreaktionen beteiligt sein. Diese sind zum einen Elektronentransferreaktionen, zum Zweiten der Transport von Sauerstoff und die dritte mögliche Rolle ist der Transport bzw. die Speicherung des Metalls.^[7,8] Mögliche Oxidationsstufen der aktiven Zentren von Kupferproteinen sind +I, +II oder unter speziellen Bedingungen auch +III.^[7]

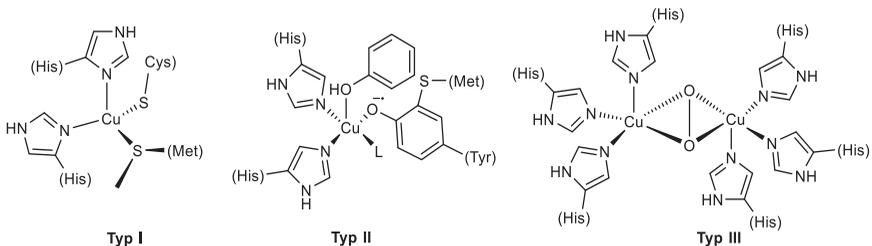


Abbildung 1: Aktive Zentren kupferbasierter Metalloenzyme des Typs I-III. Typ I: Plastocyanin, Typ II: Galaktoseoxidase, Typ III: Oxy-Hämocyanin.^[9]

Typ I Kupferenzyme, aufgrund ihrer blauen Farbe auch blaue Kupferproteine genannt, besitzen ein mononukleares Kupferzentrum, das durch die Aminosäure Histidin, die Aminosäure Cystein und meist schwach durch die Aminosäure Methionin koordiniert wird.^[10] Dieser Enzymtyp ist normalerweise an Elektronentransferreaktionen beteiligt.^[6,9,11] Beispiele für diese Enzymklasse sind Plastocyanin,^[12] Auracyanin^[13] und Azurin.^[9] Dieser Enzymtyp besitzt eine starke Absorption im Bereich um 600 nm.^[6]

Zu den Typ II Kupferenzymen, auch nichtblaue oder normale Kupferproteine genannt, gehören beispielsweise die Galaktoseoxidase,^[14] die Superoxiddismutase^[15] und die Dopamin- β -hydroxylase.^[6] Der aktive Kern besteht dabei ebenfalls aus einem mononuklearen Kupferkern, der durch Stickstoff- und Sauerstoffdonoren der Aminosäuren koordiniert wird. Diese besitzen eine schwache Absorptionsbande bei ca. 700 nm.^[16] Superoxiddismutasen katalysieren die Disproportionierung von Superoxid zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff.^[17] Das aktive Zentrum der Enzyme der Klasse des Typs III besteht im Gegensatz zu den beiden vorigen aus einem dinuklearen Kern, der durch Histidinreste koordiniert wird. Zu dieser Klasse gehören neben Hämocyanin auch die Catecholoxidase und die Tyrosinase.^[9,18,19] Typisch für diese Enzyme ist die Fähigkeit, Sauerstoff reversibel zu binden.^[9] Außerdem ist Hämocyanin für den Sauerstofftransport verantwortlich.^[18]

Im Folgenden wird näher auf das Enzym Tyrosinase eingegangen.

1.2 Typ III Kupferenzym Tyrosinase

Die Kristallstruktur des Enzyms Tyrosinase konnte erst 2006 durch Matoba *et al.* aufgeklärt werden.^[20]

Das katalytisch aktive Zentrum besteht dabei aus einem dinuklearen μ - η^2 : η^2 -Kupferperoxo-Komplex, bei dem die beiden Kupferatome durch je drei Histidinreste koordiniert werden (**Abbildung 2**).^[21]

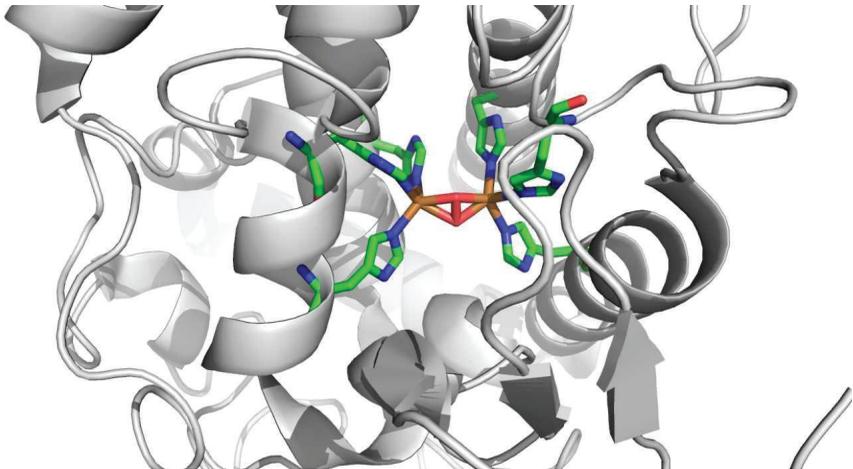
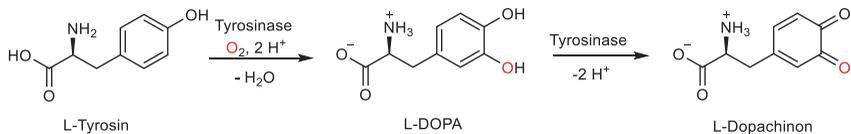


Abbildung 2: Katalytisch aktives Zentrum der Tyrosinase in der Oxy-Form.^[20]



Dabei wird der Sauerstoff in der verbrückten side-on $\mu-\eta^2:\eta^2$ -Form gebunden und der Kupfer-Kupfer-Abstand in der Oxy-Form der Tyrosinase beträgt 3.4 \AA .^[20] Charakteristische Absorptionsbanden im UV/Vis-Spektrum dieser Kupfer-Sauerstoff-Spezies sind eine starke Bande bei 350 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $20000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und eine schwache Bande bei 550 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.^[22]

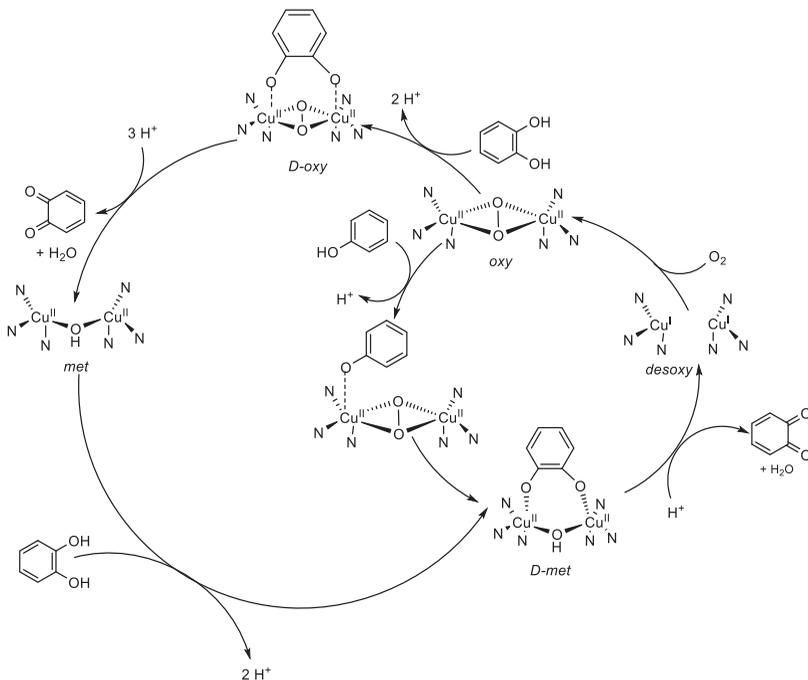
Wie bereits erwähnt, gehört das Enzym Tyrosinase zur Klasse der Typ III Kupferenzyme. Das Enzym katalysiert dabei zum einen die *ortho*-Hydroxylierung von Phenolen zu *ortho*-Diphenolen und zum anderen die Oxygenierung dieser zu *ortho*-Chinonen.^[23] In biologischen Systemen katalysiert die Tyrosinase die ersten Schritte der Melanin-Biosynthese.^[24] Dabei katalysiert die Tyrosinase die *ortho*-Hydroxylierung der Aminosäure L-Tyrosin zu L-DOPA und die anschließende Dehydrierung zu L-Dopachinon (**Schema 1**).^[11] Durch anschließende Polymerisation wird Eumelanin erhalten.^[11,25,26] Neben Eumelanin, das der Hauptbestandteil des in der Natur vorkommenden Melanins ist, kann auch Pheomelanin gebildet werden.^[11] Da die Tyrosinase beide Reaktionsschritte katalysieren kann, besitzt diese sowohl Cresolase- als auch Catecholase-Aktivität. Die Catecholoxidase unterscheidet sich von der Tyrosinase insofern, dass die Catecholoxidase nur die Catecholase-Aktivität besitzt.^[27]



Schema 1: Hydroxylierung von L-Tyrosin zu L-DOPA und anschließende Dehydrierung zu L-Dopachinon.^[11]

Dabei ist bei der Reaktion die Hydroxylierungsreaktion von L-Tyrosin zu L-DOPA der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.^[19]

Der durch Tuzcek *et al.* vorgeschlagene Reaktionszyklus der Tyrosinase ist in **Schema 2** gezeigt. Dieser wurde auf Basis von kinetischen Untersuchungen und den bekannten Intermediaten der Tyrosinase entwickelt.^[28]



Schema 2: Monophenolase und Diphenolaseaktivität der Tyrosinase nach Tucek *et al.* [26]

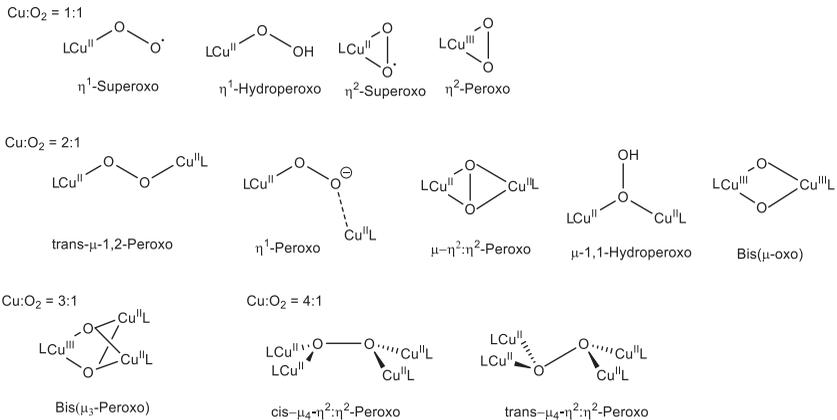
Zuerst wird die *desoxy*-Form der Tyrosinase durch Bindung des Sauerstoffmoleküls in die katalytisch aktive *oxy*-Form überführt. Ausgehend von dieser sind zwei verschiedene Reaktionszyklen, der Monophenolase bzw. der Diphenolasezyklus, möglich. Im Monophenolase-Zyklus lagert sich zuerst das deprotonierte Phenol an eines der Kupfer-Zentren der *oxy*-Form der Tyrosinase an. Die *D-met*-Spezies entsteht durch Anlagerung der beiden Sauerstoffatome des Catecholats an die beiden Kupferzentren. Das koordinierte Catechol wird dann durch die Anwesenheit von Protonen zum Chinon oxidiert und das Produkt wird unter Wasserfreisetzung vom Katalysator abgespalten, wobei die *desoxy*-Form der Tyrosinase erneut entsteht.

Im Diphenolase-Zyklus wird ausgehend von der *oxy*-Form je ein Sauerstoffatom des zweifach deprotonierten Catechols an die beiden Kupfer-Zentren gebunden. Dabei entsteht der *D-oxy*-Komplex. Durch die Anwesenheit von Protonen wird neben dem entstandenen Chinon und Wasser auch der *met*-Komplex der Tyrosinase freigesetzt. An diesen lagert sich direkt wieder ein zweifach deprotoniertes Catechol unter Bildung der *D-met*-Tyrosinase an. In Anwesenheit von Protonen entstehen ebenfalls wieder Wasser, das Chinon und die *desoxy*-Tyrosinase. [26]



1.3 Mögliche Kupfer-Sauerstoff-Spezies

Durch Reaktion der Desoxy-Tyrosinase mit molekularem Sauerstoff und die Anbindung dieses wird ein μ - η^2 : η^2 -Peroxo-Kern als aktive Spezies gebildet.^[28] Diese ist allerdings nicht die einzige mögliche Spezies, die sich bei der Reaktion von Kupfer(I)-Komplexen mit Sauerstoff bilden kann (**Schema 3**). Unterschieden wird dabei zwischen der end-on und der side-on Bindung des Sauerstoffs.^[22]



Schema 3: Mögliche Kupfer-Sauerstoff-Kerne nach Anlagerung von Sauerstoff an Kupfer(I)-Ligand-Komplexe.^[22]

Das mögliche Verhältnis von Cu:O₂ kann bei der Bildung der unterschiedlichen Spezies 1:1, 2:1, 3:1 oder 4:1 betragen. Bei den unterschiedlichen Kupfer-Sauerstoff-Spezies liegen die Kupferatome nach Sauerstoffbindung entweder in der Oxidationsstufe +II oder +III vor. Die meisten dieser möglichen Spezies stehen im Gleichgewicht miteinander. Die Spezies unterscheiden sich neben den spektroskopischen Eigenschaften auch anhand der Kupfer-Sauerstoff-Abstände und der Sauerstoff-Sauerstoff-Abstände. Wenn das Verhältnis von Cu:O₂ 2:1 oder mehr beträgt, sind auch unterschiedliche Kupfer-Kupfer-Abstände beschrieben. Durch die Wahl des Ligandendesigns kann die Bildung der unterschiedlichen Spezies gezielt beeinflusst werden.^[22]

1.4 Tyrosinase-Modell-Komplexe

Die Entwicklung von Modell-Komplexen, die strukturell einfacher als ein Enzym sind, hilft zum einen dabei, die katalytischen Reaktionen der Enzyme zu verstehen.^[29] Zum anderen bietet sich durch die Entwicklung von Modell-Komplexen aber auch die Möglichkeit, effektivere und vielseitiger einsetzbare Katalysatorsysteme zu erhalten.^[30]

Der erste Tyrosinase-Modell-Komplex wurde 1989 von Kitajima *et al.*^[31] synthetisiert. Die Arbeitsgruppe verwendete dabei das Tris(3,5-isopropylpyrazolyl)borat (**Abbildung 3**) als Liganden für den μ - η^2 : η^2 -Peroxodikupfer-Komplex.^[32]

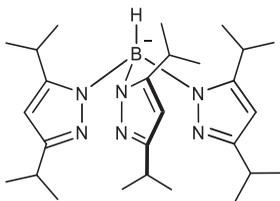


Abbildung 3: Tris(3,5-isopropylpyrazolyl)borat nach Kitajima *et al.*^[31]

1.4.1 Katalytisch aktive Tyrosinase-Modell-Komplexe

Um die Tyrosinase strukturell und funktionell nachzuahmen, hat es sich bewährt, Liganden mit drei koordinierenden Stickstoffatomen pro Kupferzentrum zu verwenden. Diese Liganden bestehen oft aus *N*-Heterozyklen wie Pyridin, Imidazol oder Pyrazol, da auch das im Enzym koordinierende Histidin einen *N*-Heterozyklus aufweist.^[33–35]

Bereits die ersten für Tyrosinase-Modell-Komplexe entwickelten Liganden basieren auf verbrückten Ligandensystemen. Karlin *et al.* publizierten 1984 einen Liganden, bei dem je drei *N*-Donoreinheiten über eine *m*-Xylyl-Brücke verbunden sind (**Abbildung 4**).^[36,37]

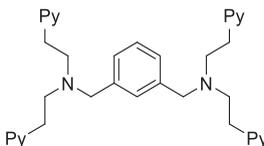
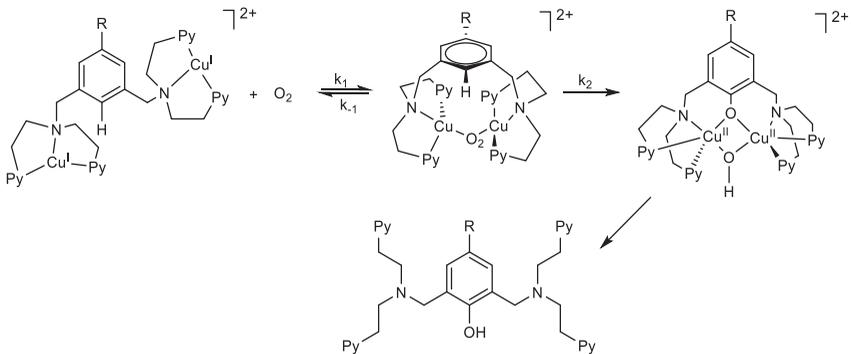


Abbildung 4: Hexadentater *m*-Xylyl-Ligand nach Karlin *et al.*^[37]

Dabei wird ausgehend von einem side-on-Peroxo-Komplex die aromatische Brückeneinheit des Liganden hydroxyliert. Die Anlagerung von Sauerstoff an den $\text{Cu}_2(\text{XYL})$ -Komplex führt zu einer μ -Phenoxo- μ -Hydroxo-Struktur (**Schema 4**).^[37–39]



Schema 4: Reaktion des Cu₂(XYL)-Systems der Arbeitsgruppe um Karlin *et al.*^[37,40]

Den ersten katalytisch aktiven Tyrosinase-Modell-Komplex stellten 1990 Réglier *et al.*^[33] vor. Die Arbeitsgruppe erzielte mit diesem Komplex und dem Substrat 2,4-Di-*tert*-butylphenol eine Turnover-Frequenz von 16 h⁻¹.^[33] Casella *et al.* entwickelten 1991 einen side-on-Peroxo-Komplex mit einem Ligandensystem, das aus vier Benzimidazolylgruppen, die über zwei *m*-Xylol-Einheiten und ein tertiäres Amin verbrückt sind.^[41]

Mit diesem Liganden konnten Casella und Tuczec *et al.* 2000 erstmals die vollständig reversible Oxygenierung eines Dikupferkomplexes nachweisen. Zudem ist der erhaltene μ - η^2 : η^2 -Peroxo-Komplex katalytisch aktiv.^[34]

Tuczec *et al.* entwickelten Liganden für Tyrosinase-Modell-Komplexe mit Iminderivaten und Pyrazolyl- oder Benzimidazolyleinheiten.^[42]

Neben den bereits beschriebenen Liganden entwickelte die Arbeitsgruppe Tuczec weitere Liganden für Tyrosinase-Modell-Komplexe, die katalytische Aktivität zeigen.^[21,38,43–45] Besonders hervorzuheben ist dabei das 2018 von Herzigkeit *et al.* publizierte System, mit dem die bislang höchste TON bei der Umsetzung von *para*-Methoxyphenol erreicht wird.^[45]

Auch Herres-Pawlis *et al.* synthetisierten Bis(pyrazolyl)methan-Liganden, die katalytische Aktivität zeigen. Die Umsatzzahlen konnten durch die Variation der Donoreinheiten verbessert werden.^[46–49] Beispiele für die Liganden der oben beschriebenen Komplexe sind in

Abbildung 5 gezeigt.

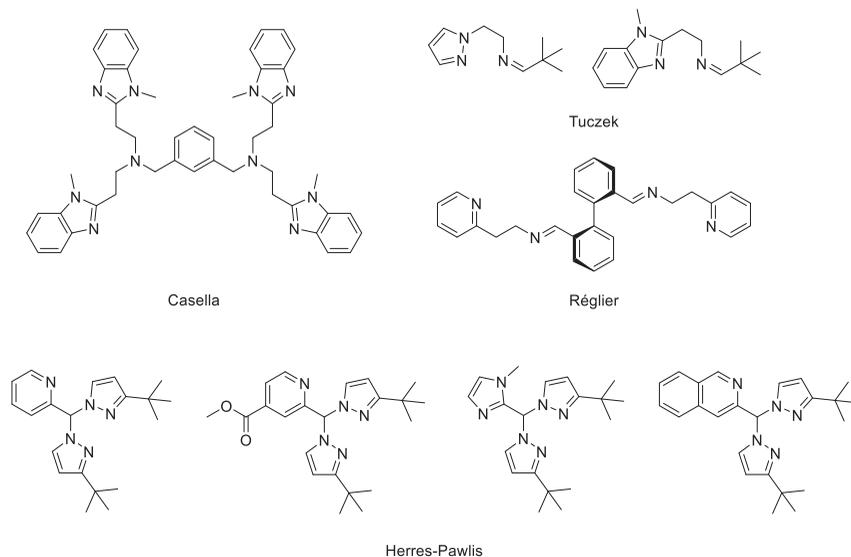


Abbildung 5: Liganden, die in der Lage sind, katalytisch aktive Tyrosinase-Modell-Komplexe zu bilden.

1.4.2 Hydroxylierungsreaktionen

In der Literatur sind einige Tyrosinase-Modell-Komplexe bekannt, die in der Lage sind, phenolische Substrate in Chinone oder Catechole zu hydroxylieren. Dabei ist in den letzten Jahren eine Substratvielfalt für die Hydroxylierung beschrieben.^[21,28,30,50]

Hierbei kann zwischen der katalytischen Hydroxylierung und der stöchiometrischen Phenolatreaktion unterschieden werden.



1.4.2.1 Stöchiometrische Substratreaktionen

Stöchiometrische Reaktionen wurden durch die Arbeitsgruppe um Itoh *et al.*^[51] durchgeführt. Dabei wurde der Bis(pyridinyl)benzylamin-Ligand zur Untersuchung der Reaktion verwendet (**Abbildung 6**).

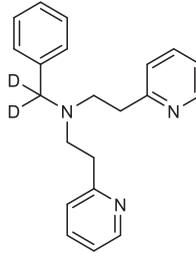
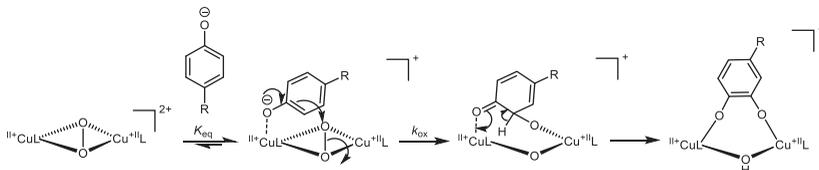


Abbildung 6: Für stöchiometrische Reaktionen von Itoh *et al.* verwendeter Bis(pyridinyl)benzylamin-Ligand.^[51,52]

Hier resultierte die Verwendung verschiedener *para*-substituierter Lithiumphenolate in der Entstehung der entsprechenden Catechole ohne Weiterreaktion zu den Chinon-Produkten oder den C-O-gekoppelten Produkten. Über den Abfall der charakteristischen Peroxo-Bande und dem Fitten nach pseudo-erster Ordnung konnte eine observable Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_{obs} erhalten werden. Durch Auftragung der observablen Reaktionsgeschwindigkeitskonstante über die Substratkonzentration wird eine Sättigungskurve nach Michaelis-Menten erhalten und daraus kann die Gleichgewichtskonstante K_{eq} und die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante des Hydroxylierungsschrittes k_{ox} bestimmt werden (vgl. **Kapitel 3.7**). Für die durch Itoh *et al.* mit dem Bis(pyridinyl)amin-Peroxo-Dikupfer-Komplex getesteten Lithiumphenolate wurden für die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_{ox} Werte zwischen 0.08 und 0.76 s^{-1} erhalten. Die ermittelten Werte für die Gleichgewichtskonstante K_{eq} liegen zwischen 570 und 940 M^{-1} . Da die Reaktionsgeschwindigkeit bei Verwendung von elektronenreichen Substraten steigt, läuft der Mechanismus nach einer elektrophilen aromatischen Substitution ab. Dieser Mechanismus ist auch im natürlichen Enzym Tyrosinase zu finden.^[23,30,51] Der Mechanismus der stöchiometrischen, elektrophilen aromatischen Substitution ist in **Schema 5** gezeigt.



Schema 5: Mechanismus der elektrophilen aromatischen Substitution der Phenolhydroxylierung.^[30,51]

Für einen Tyrosinase-Modell-Komplex mit einem Bis(pyrazolyl)methan-Liganden wurde für Natriumcarbomethoxyphenolat die schnellste Reaktionsgeschwindigkeitskonstante $k_{ox} = 4.27 \text{ s}^{-1}$ bei -78 °C in der stöchiometrischen Reaktion erhalten, während die Reaktionsgeschwindigkeiten der Hydroxylierung anderer auf Bis(pyrazolyl)methan-Liganden basierenden Tyrosinase-Modelle zwischen 0.4 und 3.4 s^{-1} liegen.^[46,48]

1.4.2.2 Katalytische Hydroxylierung phenolischer Substrate

Im Gegensatz zur stöchiometrischen Phenolatreaktion wird bei der katalytischen Hydroxylierung kein Phenolat, sondern ein phenolisches Substrat für die Reaktion verwendet. Dabei wird zum Deprotonieren des Phenols eine Hilfsbase wie beispielsweise Triethylamin benötigt.^[21] Des Weiteren wird bei der katalytischen Hydroxylierung ein Chinon als Produkt erhalten und die Reaktion stoppt nicht beim Catecholato-Komplex, wie dies bei der stöchiometrischen Umsetzung mit Lithium- oder Natriumphenolaten der Fall ist.

Der durch Hoffmann *et al.* vorgeschlagene Katalysezyklus der Phenolhydroxylierung ist in **Abbildung 7** gezeigt.^[46]

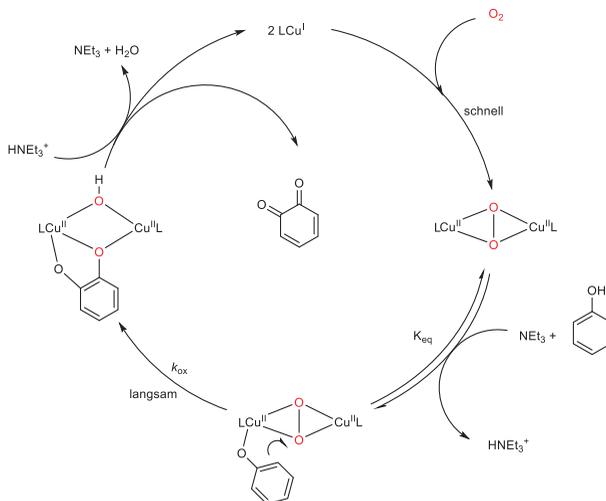


Abbildung 7: Vorgeschlagener Katalysezyklus der Phenolhydroxylierung.^[46]