



Doctoral Thesis

Coenzym F430 aus Methanogenen Bakterien Untersuchungen zur radikalischen Reaktivität des Nickelzentrums von Coenzym F430

Author(s):

Knuppe, Carola

Publication Date:

1997

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001859445> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 12364

**Coenzym F430 aus Methanogenen Bakterien:
Untersuchungen zur radikalischen Reaktivität des
Nickelzentrums von Coenzym F430**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels
Doktor der Naturwissenschaften
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von
CAROLA KNUPPE

Dipl. Chem.
Humboldt-Universität zu Berlin
geboren am 17. Dezember 1969

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. B. Jaun, Referent
Prof. Dr. A. Togni, Korreferent

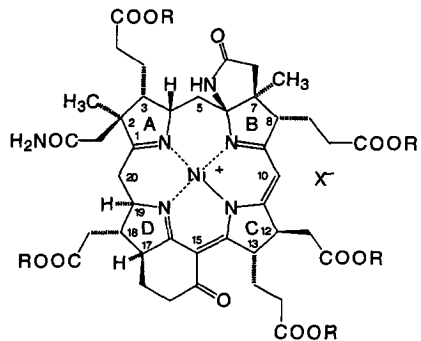
Zürich 1997

Zusammenfassung

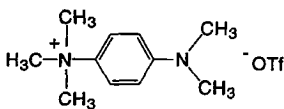
Coenzym F430, der hydrocorphinoide Nickelkomplex **1**, ist die prosthetische Gruppe der Methyl-Coenzym M-Reduktase. Diese katalysiert den letzten Schritt der Methanbildung in methanogenen Bakterien, wobei der Mechanismus der Katalyse noch immer unbekannt ist. ESR-Messungen belegen aber, dass die Ni(I)-Form von Coenzym F430 in vivo gebildet wird und dass ihre Konzentration mit der Methanbildung korreliert.

Die am Pentamethylester F430M (**2**) bisher durchgeführten Untersuchungen zur Reaktivität des freien Coenzym zeigen, dass die Ni(I)-Form von F430M zwar mit elektrophilen Methylendonoren zu Methan reagiert, nicht aber mit Thioethern, einschliesslich dem natürlichen Substrat Methyl-CoM. Dies führte zu der Hypothese, dass Methyl-CoM vor der Reaktion mit Ni(I)F430M durch Bildung eines Sulfuranylradikals aktiviert werden könnte. Ziel dieser Arbeit war die experimentelle

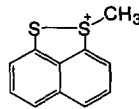
Überprüfung dieser Hypothese. Um zu untersuchen, ob F430M nach dem Mechanismus einer radikalischen Substitution reagieren kann, wurden potentielle Modellsubstrate für eine solche Reaktion synthetisiert, mit Ni(I)F430M umgesetzt und die Methanbildung untersucht.



- 1 Coenzym F430 (R = H)
- 2 Coenzym F430M (R = CH₃, X⁻ = ClO₄⁻)



(p-Dimethylaminophenyl)trimethylammoniumtriflat

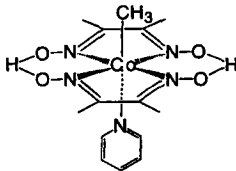


S-Methyl-Naphthalin-1,8-disulfid

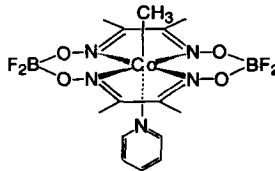
(p-Dimethylaminophenyl)-trimethylammoniumtriflat, das unter radikalischer Substitution am Methyl-C zum stabilen Wurster-Radikal führen würde, zeigte keine Reaktivität gegenüber F430M.

Das bisher unbekannte Substrat S-Methyl-Naphthalin-1,8-disulfid, welches dem Sulfuranylradikal strukturell am ähnlichsten ist, konnte nicht synthetisiert werden.

Methylkobalt(III)komplexe erwiesen sich dagegen als geeignete Substrate für einen radikalischen Methyltransfer.



15 $\text{CH}_3\text{Co}(\text{dmgH})_2\text{py}$



18 $\text{CH}_3\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2\text{py}$

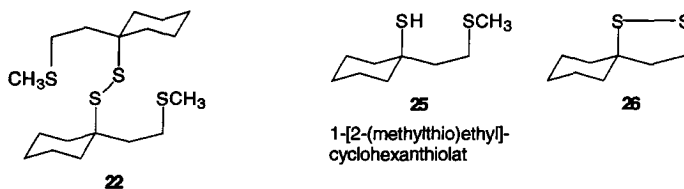
Bei der Umsetzung von $\text{CH}_3\text{Co}(\text{dmgH})_2\text{py}$ **15** mit Ni(I)F430M wurde Methanbildung beobachtet, deren Geschwindigkeit mit der Ni(I)F430M Konzentration korrelierte. Genauere mechanistische Untersuchungen waren jedoch nur begrenzt möglich, weil sich zeigte, dass F430 sich parallel zur langsamen Reaktion mit **15** zersetzte. NMR-Studien mit isotope markierten iso-Propanolen zeigten, dass für die Methanbildung sowohl der Weg über ein Methyl-Nickel-Derivat, als auch H-Abstraktion durch freie Methylradikale in Frage kommt.

$\text{CH}_3\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2\text{py}$ **18** reagierte wesentlich schneller mit Ni(I)F430M zu Methan und ermöglichte somit die stöchiometrische Analyse dieser Reaktion. Für diesen Komplex konnte der Einbau eines Protons als 4. Wasserstoffeinheit in Methan nachgewiesen werden, Hinweise auf H-Abstraktion durch freie Methylradikale fehlten. Diese Resultate stimmen mit der postulierten Methyl-Nickel-Verbindung als Zwischenstufe in der Methanbildung überein.

Von den beiden natürlichen Vertretern Methylcobalamin und Methylcobester konnte nur für letzteren Komplex eine Reaktion zu Methan beobachtet werden.

Die gemessenen reduktiven Peakpotentiale der vier untersuchten Methylkobaltverbindungen korrelierten mit der Geschwindigkeit der Methanbildung mit Ni(I)F430M. Bei der Suche nach Möglichkeiten zur Erzeugung von Sulfuranylradikalen aus entsprechenden schwefelhaltigen Modellverbindungen wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Pfaltz (Universität Basel) die Reaktion von F430M mit Disulfiden und Thiolaten untersucht. Ni(I)F430M zeigte mit Dimethyl- und Diphenyldisulfid jeweils eine rasche Reaktion zur Ni(II)-Form. Dagegen war das sterisch gehinderte Bis-{1-[2-(methylthio)ethyl]cyclohexyl}-disulfid **22** (synthetisiert von R. Hug, Basel) unreaktiv gegenüber Ni(I)F430M, was auf einen nukleophilen Angriff des reduzierten

Nickelzentrums auf die Disulfidbindung schliessen lässt. Dies könnte erklären, dass in vivo das Produkt der Enzymreaktion, ein Heterodisulfid, nicht mit der Ni(I)-Form des Coenzym reagiert.



Bis-[1-[2-(methylthio)ethyl]cyclohexyl]-disulfid

Da in der Sulfuranyl-Hypothese die Bildung von Ni(I)F430M aus einem Nickelthiolat postuliert wird, untersuchten wir die Reaktion von Thiolaten mit Ni(II)F430M. Wir konnten zeigen, dass Thiophenolate und n-Alkylthiolate nicht in der Lage sind, Ni(II)F430M zur Ni(I)-Form zu reduzieren. Diese Thiolate bilden aber, im Gegensatz zu Thiolen und Thioethern, penta- und hexakoordinierte Thiolatkomplexe mit Ni(II)F430M. Die entsprechenden Komplexbildungskonstanten konnten für n-Propanthiolat und Thiophenolat spektrophotometrisch bestimmt werden.

Wie R. Hug (Universität Basel) am synthetischen Modellkomplex R,S,R,S-1,4,8,11-tetramethyl-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan gezeigt hat, kann die in situ aus **25** gebildete Ni(II)-Thiolatbindung photolytisch zu Thylyradikal und Ni(I) gespalten werden. Dabei beobachtete er Methan und Bildung des Spirodisulfides **26**. Diese Ergebnisse sind mit der in der Sulfuranyl-Hypothese postulierten Weiterreaktion des Thylyradikals vereinbar. In analogen Versuchen mit **25** und Ni(II)F430M wurde aber die rasche Bildung eines π -Radikals (vermutlich durch H-Abstraktion aus dem Liganden) beobachtet.

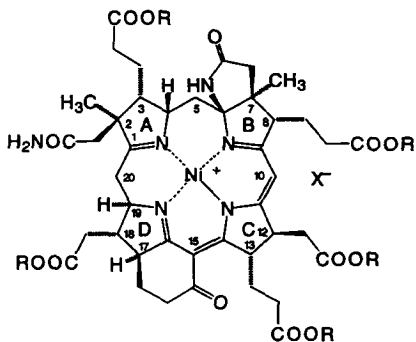
Mit dieser Arbeit gelang es, einen der Teilschritte der Sulfuranyl-Hypothese zu belegen, nämlich die (formale) Übertragung eines Methylradikals auf Ni(I)F430M. Der experimentelle Nachweis der Thioetherspaltung über ein Sulfuranylradikal konnte aber mit F430 noch nicht erbracht werden.

Summary

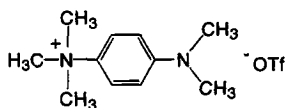
Coenzyme F430, the hydrocorphinoid nickel complex **1**, is the prosthetic group of methyl coenzyme M reductase, which catalyses the last step of biological methane formation in methanogens. The mechanism of catalysis of this enzyme is still unknown. However, *in vivo* EPR-measurements showed that the Ni(I) valence form of coenzyme F430 is formed in whole cells and that the intensity of the Ni(I) EPR signal correlates with the activity of purified enzyme preparations.

It is known that the Ni(I) form of F430 pentamethyl ester (**2**) reacts with electrophilic methyl donors to give methane. However, thioethers, including the natural substrate methyl coenzyme M, did not react with Ni(I)F430M. This observation led to the mechanistic hypothesis that the thioether could be activated *in vivo* through addition of a thiyl radical to give a sulfuranyl radical as the reactive intermediate. The experimental verification of this hypothesis was the goal of the work presented here. In

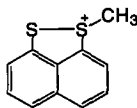
order to show that Ni(I)F430M is able to react according to the postulated radical substitution mechanism, model substrates that would yield stable radicals as leaving groups upon radical substitution were synthesised.



- 1** Coenzyme F430 (R = H)
2 Coenzyme F430M (R = CH₃, X⁻ = ClO₄⁻)

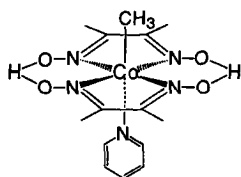
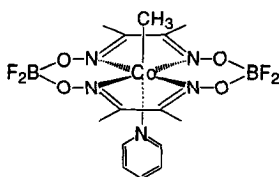


(p-Dimethylaminophenyl)trimethylammoniumtriflat



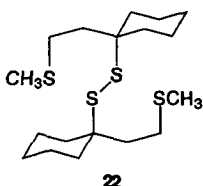
S-Methyl-Naphthalin-1,8-disulfid

(p-dimethylaminophenyl)-trimethylammonium triflate, which should give the well known Wurster's blue cation radical did not react with Ni(I)F430M. The heterosulfonium ion S-methyl naphthalene-1,8-disulfide, would be structurally close to the postulated sulfuranyl radical, but synthesis of this previously unreported ion was not successful.

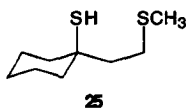
15 $\text{CH}_3\text{Co}(\text{dmgH})_2\text{py}$ 18 $\text{CH}_3\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2\text{py}$

However, methyl cobalt complexes such as **15** and **18** did react with Ni(I)F430M to give methane. The reaction rate of **15** with Ni(I)F430M correlated with the concentration of Ni(I)F430M, but parallel decomposition of the coenzyme prevented quantitative studies of the stoichiometry and kinetics. $\text{CH}_3\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2\text{py}$ (**18**) reacted much faster and allowed determination of the stoichiometry as 2 Ni(I) to 1 $\text{CH}_3\text{Co}(\text{III})\text{L}$. Incorporation of deuterium into the resulting methane was observed if the reaction was carried out in the presence of isopropanol-OD, whereas no deuterium was incorporated from the solvent (DMF- d_7). This proves that the 4th hydrogen moiety in methane was introduced as a proton and not via hydrogen atom abstraction by free methyl radicals and confirms the postulated formation of a methyl-Ni(II) intermediate. Whereas methyl-cobalamin did not react detectably with Ni(I)F430M, methyl-cobester gave methane at a rate intermediate between those found with **18** and **15**.

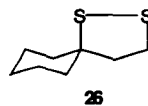
With the goal of generating sulfuranyl radicals in the immediate vicinity of the Ni(I) center of F430, the reactivity of Ni(I)F430M towards disulfides was investigated in collaboration with the Group of A. Pfaltz (University of Basel). Whereas small disulfides such as dimethyldisulfide and diphenyldisulfide reacted rapidly with Ni(I)F430M, the sterically hindered disulfide **22**, which was synthesised for the purpose by R. Hug (University of Basel), did not react with Ni(I)F430M at all. This result points to a nucleophilic attack of the Ni(I) centre on the disulfide, as opposed to outer sphere electron transfer. This may explain why, in the enzymic reaction, the heterodisulfide product is not attacked by the Ni(I) centre of the coenzyme.



Bis-[1-[2-(methylthio)ethyl]cyclohexyl]-disulfid



1-[2-(methylthio)ethyl]-
cyclohexanethiolat



Since the mechanistic sulfuranyl-radical hypothesis postulates formation of a thiyl radical and Ni(I)F430 from a Ni(II) thiolate, the reaction of Ni(II)F430M with thiolates was investigated. It was shown that n-alkyl thiolates are unable to reduce Ni(II)F430M to the Ni(I) valence form but do form penta- and hexacoordinate complexes with one or two thiolate ligands in the axial coordination sites of Ni(II)F430M. The corresponding formation constants were determined spectrophotometrically for n-propane thiolate and thiophenolate.

R.Hug (University of Basel) was able to show that photolysis of the thiolate complex derived in situ from thiol **25** and the synthetic complex (R,S,R,S)-nickeltetramethylcyclam leads to cleavage of the thioether in **25** giving methane and the spirodisulfide **26**. This result is consistent with the postulated formation of a cyclic sulfuranyl radical. However, the same experiment with Ni(II)F430M failed to give methane and spirodisulfide because the macrocyclic ligand of F430 was attacked preferentially (presumably via hydrogen abstraction by thiyl radical) to give a ligand π -radical.

In conclusion, we were able to show that formal transfer of a methyl radical to the Ni(I) centre of F430, one of the individual steps postulated in the sulfuranyl radical hypothesis, can be observed with the free coenzyme in solution. Thioether cleavage according to the postulated mechanism however, although observed with a model complex, remains to be demonstrated with F430 itself.