

SYNTECKÉ MODELY METALOENZYMŮ KATALYZUJÍCÍ ŠTĚPENÍ FOSFODIESTEROVÉ VAZBY

DANIEL BÍM^{a,b}, LUBOMÍR RULÍŠEK^b a JANA HODAČOVÁ^a

^a Ústav organické chemie, Fakulta chemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6 bim@uochb.cas.cz

Došlo 14.10.14, přepracováno 9.1.15, přijato 29.1.15.

Klíčová slova: syntetické modely fosfodiesteras, metaloenzymy, štěpení fosfoesterové vazby

Obsah

1. Úvod
2. Mechanismus štěpení fosfoesterové vazby
 - 2.1. Spontánní hydrolyza fosfoesterů
 - 2.2. Katalýza hydrolytického štěpení fosfoesterů pomocí kovových iontů
 - 2.3. Modelové substráty imitující biologicky významné fosfoestery
3. Syntetické modely metaloenzymů
 - 3.1. Mononukleární komplexy
 - 3.2. Vícenukleární komplexy
 - 3.2.1. Makrocyclický přístup
 - 3.2.2. Využití strukturální spojky
4. Závěr

1. Úvod

Ve světě živých organismů mají fosfoestery naprosto nezastupitelnou roli. Jsou dostatečně stabilní, aby mohly tvořit páteř biopolymerů, zároveň však zastávají i funkci regulační, pro kterou je nutné jejich efektivní a selektivní štěpení. Mnohé základní biologické procesy, stejně tak i buněčné struktury, jsou založeny na reaktivitě sloučenin fosforu, fosfoesterů a fosfodiesterů^{1,2}. Příkladem může být struktura DNA a RNA, která obsahuje extrémně stabilní fosfodiesterové vazby dohromady jednotlivé nukleosidové jednotky. Dále jsou fosfoestery součástí fosfolipidů, které se nacházejí v každé buňce a jsou základním stavebním prvkem všech biomembrán. Energeticky bohaté fosfáty, např. adenosin trifosfát (ATP), adenosin difosfát (ADP) a další, skladují a přenášejí energii buňky potřebnou pro jednotlivé biologické procesy. Na fosfoesterech je založena také regulace a mezibuněčná signalizace – fosfoestery jsou součástí tzv. druhých posílů, např. cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) nebo cyklického guanosinmono-

fosfátu (cGMP), které regulují hormonální a nervovou komunikaci buněk.

Výše shrnuté funkce fosfoesterů v biologických systémech odhalují pozoruhodný paradox sestávající z extrémní stability fosfoesterů v nukleových kyselinách (poločas spontánní hydrolyzy DNA ve vodě je asi 30 milionů let) oproti velmi rychlým procesům buněčné regulace. Tímto jsou kladeny velmi vysoké nároky na enzymatickou katalýzu a není proto divu, že evoluce vyvinula přírodní enzymy schopné katalyzovat štěpení fosfoesterové vazby, které svou aktivitou patří mezi neefektivnější enzymy vůbec.

Enzymy, které katalyzují hydrolyzu vazby P–OR, dělíme do tří základních skupin: *fosfatasy*^{3–5}, které napomáhají defosforylaci fosfomonoesterů za vzniku anorganického fosforečnanu a alkoholu, *fosfodiesterasy* katalyzující hydrolyzu fosfodiesterové vazby a *fosfotriesterasy*^{1,5,6} napomáhající štěpení toxických fosfotriesterů na výrazně méně toxické fosfodiesterové. Dále se v popisu omezíme pouze na skupinu fosfodiesteras, které jsou z hlediska připravených syntetických analog skupinou nejpoběžnější.

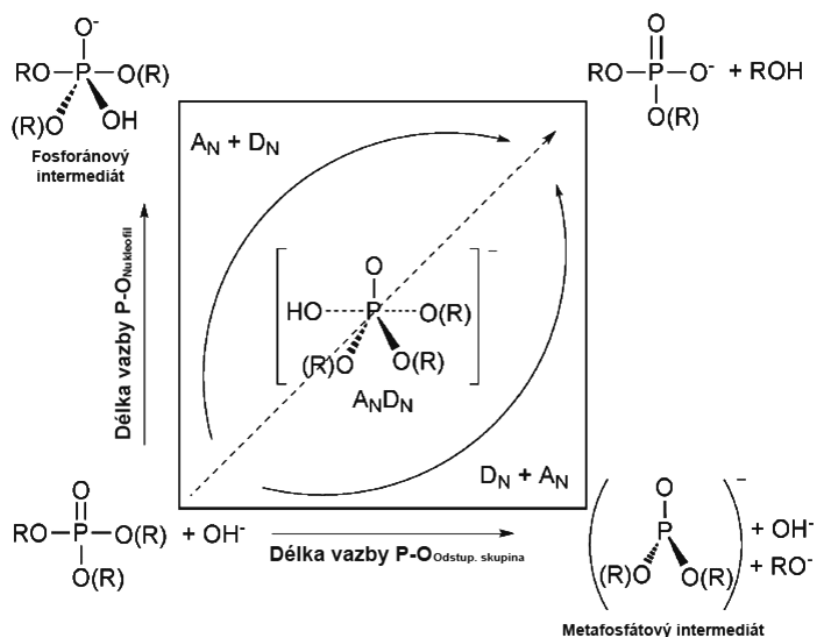
Jako fosfodiesterasy jsou obvykle nazývány klinicky důležité fosfodiesterasy cyklických nukleotidů (PDEs)⁷, které hrají roli v buněčné signalizaci, při degradaci tzv. druhých posílů – cAMP a cGMP. Mezi fosfodiesterasy však řadíme mnoho dalších skupin enzymů, např. fosfolipasy C a D, fosfodiesterasu sfingomyelinu, autotaxin a především také nukleasy^{1,5}, které jsou schopny katalyzovat štěpení fosfodiesterových vazeb v nukleových kyselinách (DNA a RNA). Aktivní místa většiny nukleas obsahují dvojmocné kationty – Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ nebo Zn²⁺, které jsou esenciální pro jejich katalytickou účinnost. Jedná se tedy o metaloenzymy, jednotlivé atomy kovů a jejich počet se však v jednotlivých typech nukleas liší.

2. Mechanismus štěpení fosfoesterové vazby

2.1. Spontánní hydrolyza fosfoesterů

Jak již bylo uvedeno výše v textu, nekatalyzované štěpení fosfoesterové vazby P–O probíhá velmi neochotně. Ukazuje se, že degradace DNA dokonce většinou neprobíhá štěpením vazby P–O, nýbrž jinou cestou, a vazba P–O je za fyziologických podmínek prakticky inertní⁸. Vlastní degradace pak může zahrnovat štěpení vazby C–O, otvírání nukleových bází či radikálový atak. RNA má oproti DNA mnohem nižší stabilitu způsobenou snazším štěpením právě vazby P–O. Vyšší reaktivita je způsobena přítomností 2'-hydroxyly ribosy, který umožňuje hydrolyzu RNA intramolekulární transesterifikací doprovázenou hydrolyzou cyklického intermediátu⁸.

Hydrolyza fosfoesterů je substituční reakcí, probíhat může třemi krajními mechanismy:

Schéma 1. O'Ferrallův-Jencksův diagram hraničních mechanismů pro hydrolýzu fosfoesterové vazby⁸

1) Disociativní ($D_N + A_N$), ve kterém dochází ke ztrátě odstupující skupiny (disociaci, D_N) ještě před vlastním atakem nukleofilu (asociaci/adici, A_N). Reakce tak probíhá přes stádium metafosfátového intermediátu.

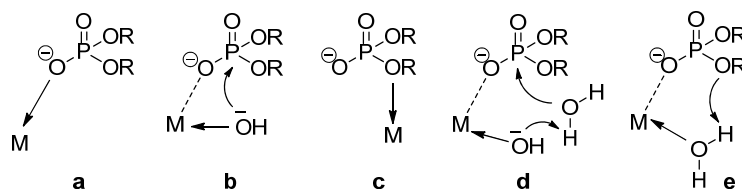
2) Asociativní ($A_N + D_N$) – dvoukrokový mechanismus, kde atak nukleofilu předchází ztrátě odstupující skupiny a dochází ke vzniku fosforánového intermediátu.

3) Spřažený ($A_N D_N$) mechanismus, ve kterém vznik vazby mezi atomem fosforu a nukleofilem a zánik vazby mezi fosforem a odstupující skupinou probíhá v jedné elementární reakci. Reakce tak neprobíhá přes stádium intermediátu.

Hydrolýza fosfoesterů probíhá obvykle spřaženým mechanismem, tranzitní stavy se však mění z volných na těsnější (blíže asociativnímu charakteru) v závislosti na substrátu směrem od mono- k di- a triesterům⁸. Při štěpení fosfoesterové vazby dále hraje významnou roli pH, struktura tranzitního stavu je ovlivněna tím, zda je nukleofilem hydroxidový anion či voda. Vlastní mechanismus reakce pak má výrazný vliv také na reakční rychlost.

2.2. Katalýza hydrolytického štěpení fosfoesterů pomocí kovových iontů

Vzhledem k tomu, že štěpení fosfoesterů nejčastěji probíhá asociativním, resp. spřaženým mechanismem, při kterém dochází ke zvýšení nábojové hustoty na fosforylové skupině, je logické, že reakce bude urychlována elektrostatickou katalýzou. Není tedy divu, že kovové kationty, stejně tak i kladně nabitě postranní řetězce aminokyselin, mají pozitivní vliv na rychlost hydrolýzy⁸. Stejnou roli hrají kovové kationty i v aktivních místech nukleas. Kovové kationty se chovají jako Lewisovy kyseliny a aktivují tak fosfáty pro nukleofilní atak (Schéma 2, **a**), zároveň jsou schopny stabilizovat vznikající tranzitní stav. Kromě toho mohou kovové kationty aktivovat i vlastní nukleofil (voda vázaná na kovovém centru má kyselejší charakter) (**b**) nebo aktivovat odstupující skupinu (**c**). Hydroxidový ion či voda vázané k atomu kovu mohou nepřímou fungovat jako báze/kyselina v obecné bazické/kyselé katalýze (**d**)/(**e**).

Schéma 2. Možné způsoby aktivace fosfodiesterové vazby pro její hydrolytické štěpení pomocí kovových iontů⁸

Jednotlivé způsoby aktivace se mohou vzájemně doplňovat a kombinovat, ideální systém proto většinou není mononukleární, ale obsahuje vícenukleární aktivní centrum. Zde spolu různé atomy kovů spolupracují a vytváří tak jeden celek kombinující aktivaci substrátu, nukleofilu či odstupující skupiny. Vliv jednotlivých způsobů aktivace na reakční rychlost dokázal kvantifikovat J. Chin v roce 1999 (cit.⁹). Ze studie vyplývá, že vzdálenost mezi kovy v dinukleárních komplexech by měla být, pro co možná nejvyšší aktivitu, mezi 2,9 až 7,0 Å. To je možné doložit např. strukturou přírodních enzymů, kde je tato podmínka splněna¹⁰. Ukazuje se, že pro aktivitu syntetických dinukleárních modelů metaloenzymů je vzdálenost kovových center taktéž zcela klíčová.

Ze studií poslední doby vyplývá, že štěpení fosfoesterové vazby neprobíhá žádným všeobecným mechanismem¹¹ a vždy se jedná o kombinaci různých vlivů, které rozhodují o vlastním průběhu reakce. Ten se může lišit v závislosti na substrátu, odstupující skupině, na reakčních podmínkách, ale i na struktuře použitého enzymu nebo typu kovového iontu.

2.3. Modelové substráty imitující biologicky významné fosfoestery

Většina biologicky významných substrátů jsou obrovské biopolymery, jejichž separace, identifikace a případná detekce není triviální. To se odráží jednak ve složité analýze katalyzovaných reakcí, jednak ve vysoké ceně těchto substrátů. Pro zkoumání katalytické aktivity ať už syntetických modelů, či přírodních enzymů, bývají proto využívány menší substráty^{1,11}, které jsou navrženy tak, aby jejich reaktivita co možná nejvíce odpovídala reaktivitě biopolymerů. Předpokladem je také lepší monitorování katalyzovaných reakcí.

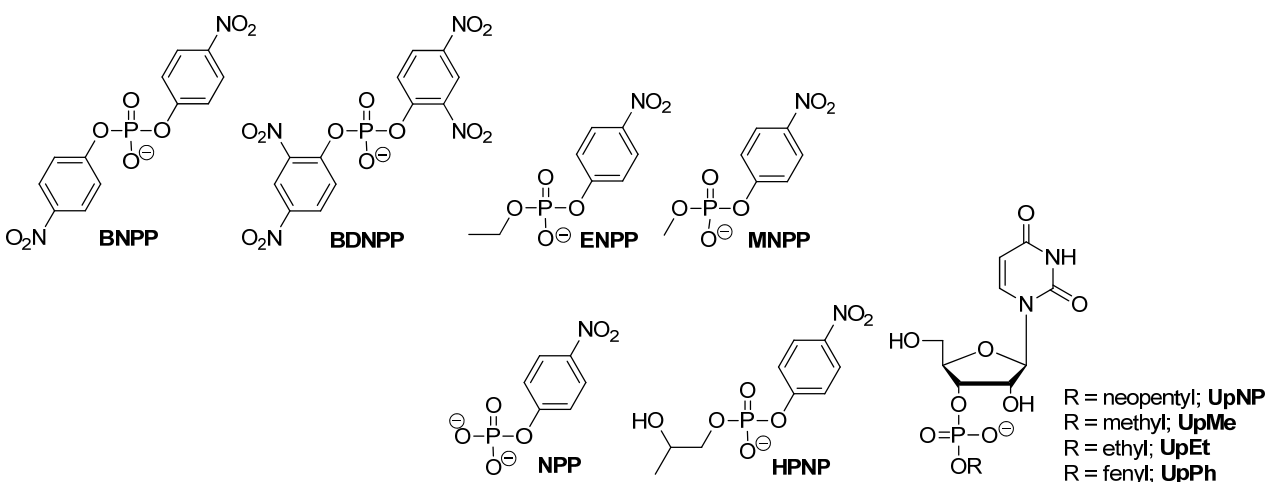
V první řadě se může jednat o pouze určité zajímavé sekvence DNA nebo RNA, jejichž degradace je významná například z hlediska vývoje protinádorových léčiv (cytostatik, chemoterapeutik, apod.). Dalším příkladem mohou být specifické diribonukleotidy, např. adenylyl-

-3',5'-uridin-3'-monofosfát (ApUp) nebo cyklické nukleotidy (cAMP, cGMP, apod.). Využívána bývá také početná skupina syntetických nízkomolekulárních látek, které mimikují fosfodiesterové uskupení DNA a RNA. Jako modely DNA bývají využívány např. bis(4-nitrofenyl)fosfát (BNPP), bis(2,4-dinitrofenyl)fosfát (BDNPP) a ethyl-4-nitrofenylfosfát (ENPP). Mezi využívané RNA modely patří např. 2-hydroxypropyl-4-nitrofenylfosfát (HPNP) nebo uridin 3'-nitrofenylfosfát (UpNP). Produktem štěpení BNPP je 4-nitrofenylfosfát (NPP), který je běžně využíván jako modelový fosfomonoester. Výhodou těchto modelových substrátů je především snadné monitorování koncentrace odstupující skupiny (produktu) pomocí UV-Vis spektroskopie. Rozdílem mezi modely DNA a RNA je zejména přítomnost 2'-hydroxylové skupiny v RNA modelech, která umožňuje intramolekulární atak na atom fosforu a vznik cyklického intermediátu.

3. Syntetické modely metaloenzymů

Syntetické modely metaloenzymů vycházejí ze struktury metaloenzymů přírodních. To bývají většinou zinečnaté, vápenaté či hořečnaté komplexy, vlastní kationty jsou vázány pomocí postranních řetězců aminokyselin, nejčastěji se uplatňuje histidin, aspartát/glutamat či cystein¹². Kovové ionty hrají roli při vazbě substrátu, stabilizovat jej v aktivním místě enzymu je však možné i pomocí slabých interakcí, např. vodíkových vazeb ke guanidiniiovému zbytku argininu. Syntetické modely metaloenzymů pak využívají kromě výše zmíněných i další kovové kationty, především kationty měďnaté, uplatnění v poslední době nalézají také trojmocné kationty lanthanoidů^{13–17}.

Ačkoliv byly syntetizovány také enzymatické modely, které využívají guanidiniiové skupiny pro fixaci substrátu ve vhodné orientaci, a to i bez přítomnosti kovových iontů^{18–20}, jedná se spíše o výjimky a tato oblast není dosud příliš prostudována. Mnohem početnější skupinou jsou syntetické modely metaloenzymů, především zinečnatých a měďnatých, a zbylý text bude proto zaměřen převážně na tyto komplexy.



3.1. Mononukleární komplexy

První studie, zabývající se katalýzou štěpení fosfoesterové vazby pomocí syntetických modelů metaloenzymů, byla publikována²¹ v roce 1983. Bylo potvrzeno urychlení hydrolyzy 4-nitrofenylfosfátu při jeho koordinaci k iontu Co^{3+} v komplexu $\text{cis}[\text{Co}(\text{en})_2(\text{OH})_2(\text{O}_3\text{POC}_6\text{H}_4\text{NO}_2)]^+$. Součástí této práce je také návrh mechanismu štěpení fosfoesterové vazby. Konkrétně je uvažován počáteční intramolekulární atak koordinovaného hydroxidového iontu na atom fosforu, následný vznik fosforánového tranzitního stavu/intermediátu v orientaci trigonální bipyramidy a rozpad za vzniku 4-nitrofenolu a $[\text{Co}(\text{en})_2(\text{OH})_2(\text{O}_2\text{PO})]^-$. Vznikající komplex je kineticky inertní, reakci tak není možné vést katalyticky. Úspěch proto nalezy až kineticky více labilní komplexy dvojmocných kationtů mědi, zinku a niklu. Většina mononukleárních komplexů na této bázi se skládá z centrálního atomu kovu a buď z uzavřené makrocyclické jednotky obsahující donorové atomy, nebo z necyclického „otevřeného“ polydentátního ligandu. Některé vybrané struktury ligandů jsou uvedeny níže.

Aktivita jednotlivých mononukleárních komplexů připravených z těchto ligandů se značně liší, nicméně přesný kvantitativní popis reakčních rychlostí při hydrolyze vazby P–O v modelových substrátech není na tomto místě možný, vzhledem k rozsahu předkládané práce. Čtenáře bychom proto rádi odkázali na vynikající přehledný referát, který se vztahem mezi strukturou příslušných mononukleárních komplexů a jejich reaktivitou blíže zabývá¹. Z naměřených kinetických dat je však patrné, že ve všech případech je aktivita komplexů připravených z tridentátních ligandů vyšší než aktivita komplexů připravených z analogických ligandů tetradentátních^{22–24}.

3.2. Vicenukleární komplexy

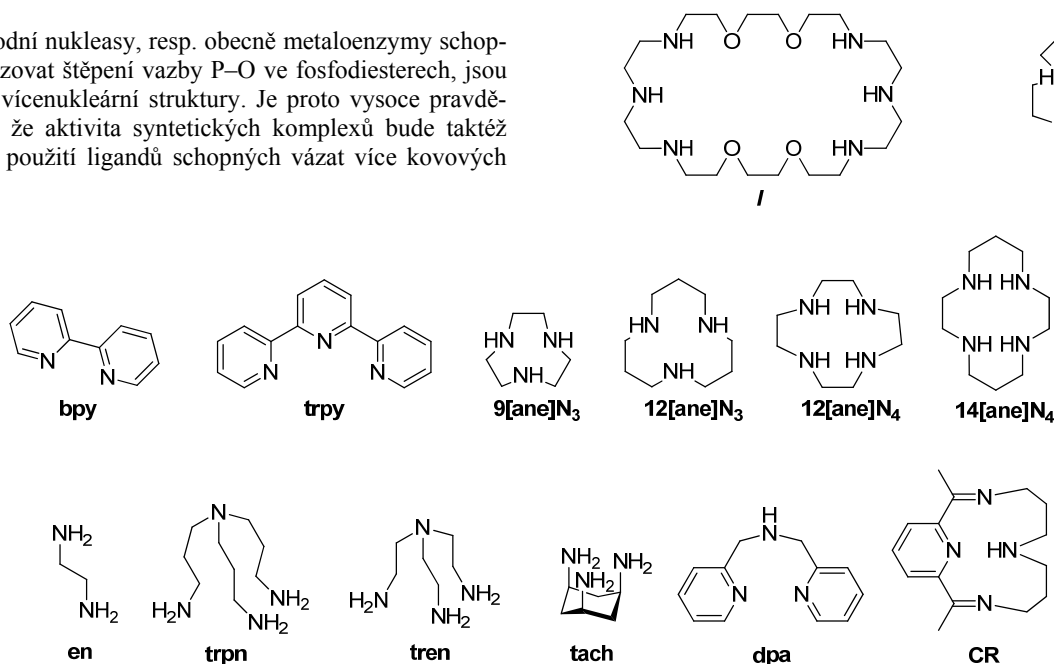
Přírodní nukleasy, resp. obecně metaloenzymy schopné katalyzovat štěpení vazby P–O ve fosfodiesterách, jsou většinou vícenukleární struktury. Je proto vysoce pravděpodobné, že aktivita syntetických komplexů bude taktéž vyšší při použití ligandů schopných vázat více kovových iontů.

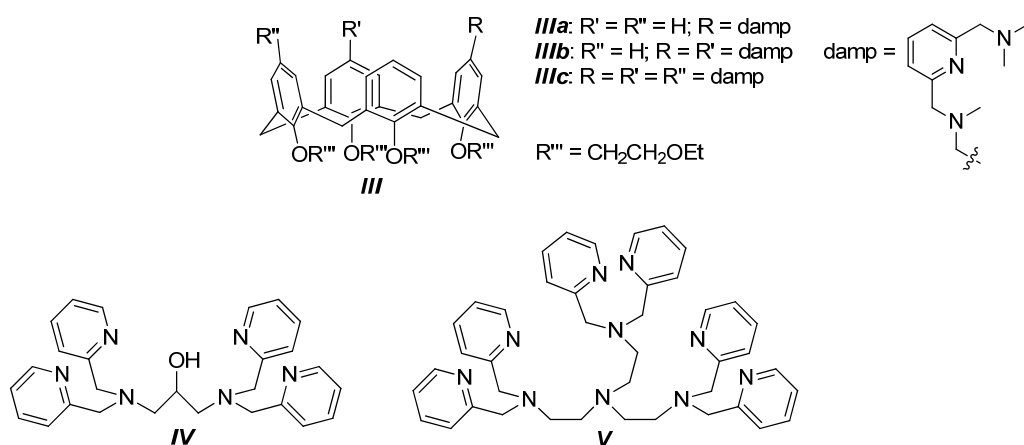
Důkazem může být rozdílná katalytická aktivita dinukleárního zinečnatého komplexu $\text{Zn}_2\text{-I}$ oproti mononukleárnímu zinečnatému komplexu Zn-II , která je asi $10\times$ vyšší ve prospěch dinukleárního komplexu²⁵.

Dalším příkladem mohou být práce Reinhoudtovy skupiny^{26,27} z roku 1999, které dokazují vyšší aktivitu dinukleárního zinečnatého komplexu s derivatizovaným calix[4]arenovým ligandem **IIIb** oproti analogickému mononukleárnímu Zn-IIIa . Hydrolyza modelových struktur RNA je asi $50\times$ rychlejší. Zajímavé je, že i trinukleární zinečnatý komplex $\text{Zn}_3\text{-IIIc}$ vykazuje vyšší aktivitu než komplex dinukleární.

Reinhoudtovo pozorování vyšší aktivity trinukleárního komplexu oproti dinukleárnímu bylo potvrzeno také pro zinečnaté komplexy $\text{Zn}_2\text{-IV}$ a $\text{Zn}_3\text{-V}$ (cit.²⁸). Zatímco komplex $\text{Zn}_2\text{-IV}$ je schopný štěpit pouze jednoduchý diribonukleotid ApA, komplex $\text{Zn}_3\text{-V}$ katalyzuje štěpení celé řady dinukleotidových dimerů.

Důvodem vyšší aktivity vícenukleárních komplexů je vhodné prostorové uspořádání jednotlivých kovových iontů, které mohou vzájemně kooperovat za aktivace nukleofilu, substrátu, případně i odstupující skupiny. Návrh ligandů pro dinukleární či obecně vícenukleární komplexy bývá založen na dvou různých strategiích. První skupinou ligandů jsou velké makrocyclické sloučeniny, které jsou schopny vázat dva a více atomů kovu přímo v jedné makrocyclické jednotce (makrocyclický přístup). Druhým, běžnějším přístupem, je propojení jednotlivých částí molekuly, které jsou schopny vázat kovové ionty, pomocí strukturální spojky (angl. *spacer* nebo též *linker*) za vzniku jedné sloučeniny. Výhodou druhé skupiny ligandů je velmi snadná variabilita délky či geometrie jak spojovací molekuly, tak i ligandů chelatujících kovové ionty, a především pak jednodušší syntéza.





3.2.1. Makrocyclický přístup

Typickým zástupcem ze skupiny komplexů navržených dle makrocyclického přístupu je již výše zmíněný zinečnatý komplex $\text{Zn}_2\text{-I}$ (cit.²⁵). Součinnost kovových center v tomto dinukleárním komplexu dokazuje mimo jiné rentgenostrukturní analýza, která potvrzuje tvorbu difenylfosfátového můstku mezi oběma kovovými ionty.

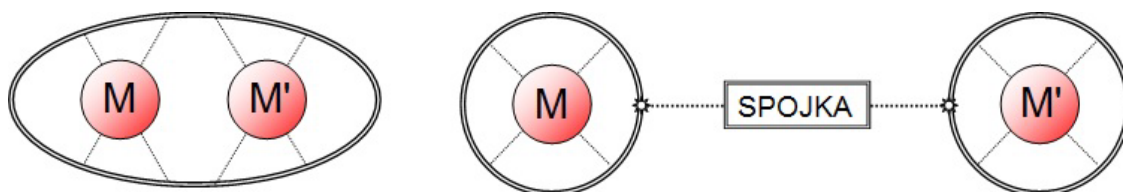
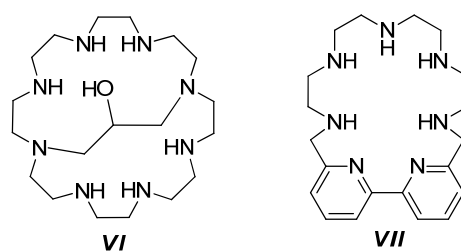
Dalšími podobnými makrocyclickými ligandy schopnými koordinace k více kovovým centrům jsou níže uvedené ligandy **VI** (cit.²⁹) a **VII** (cit.³⁰), jejichž rigidita je zvýšena přítomností můstku s hydroxylovou skupinou u prvního ligandu nebo přítomností bipyridinové jednotky u druhého ligandu. Díky tomuto zpevněnému skeletu jsou kovové kationty fixovány ve správné orientaci, čímž bylo dosaženo vyšší účinnosti zinečnatých komplexů připravených z těchto ligandů.

Dosud nebylo připraveno příliš mnoho syntetických analog trinukleárních zinečnatých enzymů, jako je např. fosfolipasa C nebo P1 nukleasa. Nicméně trinukleární zinečnatý komplex $\text{Zn}_3\text{-VIII}$, který byl popsán v roce 2004 skupinou prof. Nishihary³¹, katalyzuje štěpení DNA izolované z telecího brzlíku při teplotě 37 °C a 50 °C. Jelikož nebyla publikována žádná kinetická data, není možné hodnotit rozdíl v aktivitě mezi tímto trinukleárním a analogickým dinukleárním či mononukleárním komplexem.

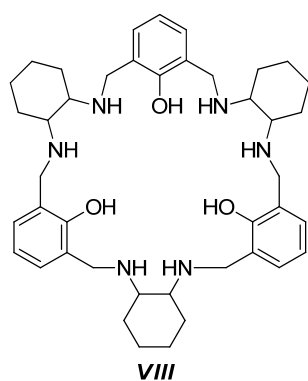
3.2.2. Využití strukturální spojky

Vícenukleárních komplexů, jejichž struktura vychází z přístupu využívajícího strukturální spojky, bylo v minulosti připraveno velké množství, zde budou prezentovány pouze některé vybrané struktury. Řazeny budou dle použité makrocyclické jednotky, téměř ve všech případech se bude jednat o makrocyclické jednotky uvedené v kap. 3.1., zabývající se mononukleárními komplexy. Strukturálních spojek využitých k přemostění těchto jednotek je celá řada, většinou proto bude následovat pouze jejich výčet s odkazem na původní literaturu nebo na příslušné přehledné referáty.

Prvním komplexem, využívajícím strukturální spojku (*spacer*), který byl využit k urychlení hydrolyzy aktivovaných fosfotriesterů (např. difenyl-*p*-nitrofenylfosfátu), byl zinečnatý bis-makrocycklus $\text{Zn}_2\text{-IX}$ (cit.³²). Tento komplex vykazuje asi čtyřnásobné urychlení reakce oproti analogickému mono-makrocyclickému komplexu. Dalšími ze série komplexů, připravených ve skupině prof. Breslowa, byly

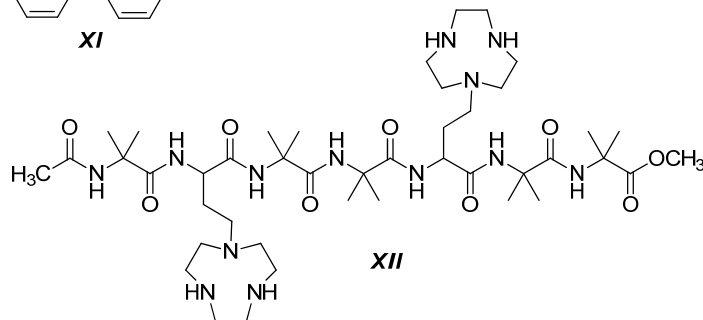
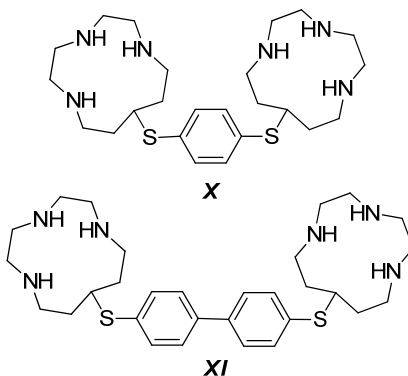
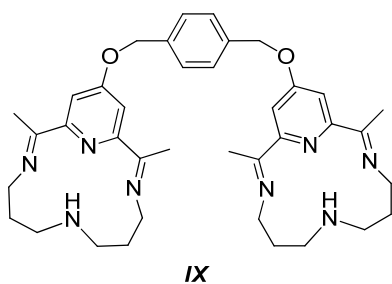


Obr. 1. Rozdíl mezi makrocyclickým přístupem a přístupem využívajícím strukturální spojku



zinečnaté komplexy Zn_2 -**X** a Zn_2 -**XI** (cit.³³), tedy zinečnaté komplexy s bis-makrocyclickými ligandy, obsahujícími vždy dvě 1,4,7-triazacyklododekanové jednotky, propojené různými aromatickými strukturálními spojkami.

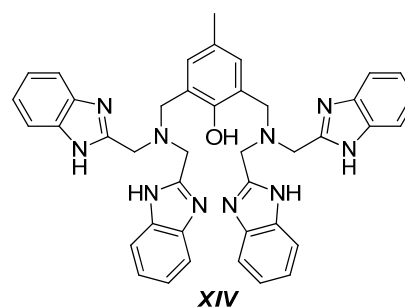
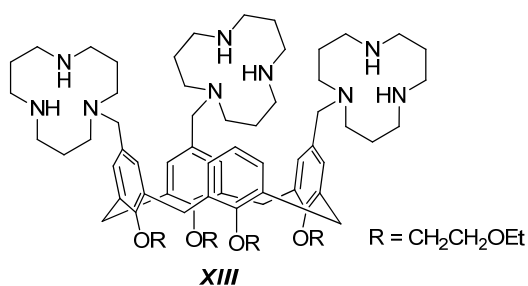
Hojně využívanou makrocyclickou jednotkou je rovněž 1,4,7-triazacyklononan (zkráceně [9]aneN₃), jako strukturální spojka pro syntézu bis-makrocyclických struktur byl využit například 2,7-dimethylnaftalen³⁴, xylen^{35–38}, 1,10-dimethylfenanthrolin^{37,39}, 2,2'-dimethylbipyridin³⁹, pentan³⁷, 2,3-dimethylchinoxalin³⁹ nebo 2,6-dimethylpyridin⁴⁰. Strukturálně zajímavý je také ligand **XII** sestávající ze dvou 1,4,7-triazacyklononanových jednotek propojených dlouhým peptidovým řetězcem. Výhodou je snadná optimalizace vzdálenosti obou kovových center, v příslušném komplexu Zn_2 -**XII** se jedná o 6 Å (cit.⁴¹). Komplex Zn_2 -**XII** vykazuje značnou katalytickou aktivitu při hydrolyze HPNP, ale také plasmidické DNA, kde je rychlost reakce až 20× vyšší, než rychlost reakce katalyzované pouze mononukleárním zinečnatým komplexem Zn -[9]aneN₃.



Populárním makrocyclickým motivem, využívaným při syntéze vícenukleárních komplexů s využitím strukturální spojky, je 1,5,9-triazacyklododekan ([12]aneN₃). Byly připraveny ligandy, které mají makrocyclické jednotky přemostěny s využitím propanu, 4,4'-bifenyly, xylenů a 2,6-dimethylpyridinu⁴². Spojku však může tvořit také calix[4]arenový skelet, který je derivatizován na horním okraji. Byly publikovány struktury, které mají jednu, dvě a tři (ligand **XIII**) makrocyclické jednotky připojené ke calix[4]arenovému skeletu⁴³. Vlastnosti strukturálně podobných ligandů **IIIa–IIIc** již byly popsány výše v textu.

Ligandy připravené z různých strukturálních spojek a z cyklu ([12]aneN₄) jakožto makrocyclické jednotky, byly publikovány například v práci Königovy skupiny⁴⁴.

Kromě ligandů, které chelatují kovové ionty pomocí donorových atomů uvnitř makrocyclické jednotky, byly připraveny také ligandy, jejichž donorové atomy nejsou součástí makrocyclického kruhu. Jsou to většinou jednoduché strukturální jednotky analogické těm, které byly využity pro syntézu mononukleárních komplexů (viz kap. 3.1.), zde jsou však spojeny strukturální spojkou a vytváří tak ligandy pro přípravu vícenukleárních komplexů. Nejvíce využívané acyklické motivy jsou bpy a trpy^{45,46}, dále pak dpa či 2,6-bis(aminomethyl)pyridin^{27,47–49}. Komplexy připravené z těchto ligandů opět potvrzují trend vyšší aktivity dinukleárních modelů oproti mononukleárním, ale také trinukleárních oproti analogickým dinukleárním. Příklad calix[4]arenových ligandů **IIIa–c** s navázanými 2,6-bis(aminomethyl)pyridinovými jednotkami, u kterých byl tento efekt potvrzen, byl již uveden výše v kap. 3.2. Vysoká katalytická aktivita calix[4]arenových derivátů je bezesporu také způsobena dobrou komplexací odstupujícího *p*-nitrofenolátového aniontu uvnitř kavity calixarenu. Tento efekt se neuplatní při hydrolyze přírodních substrátů.



U komplexů připravených makrocyclickým přístupem bylo zvýšením rigidity dosaženo vyšší aktivity těchto komplexů díky lepší fixaci kovových center na přesně definovaném místě (struktury **VI** a **VII**). V přístupu využívajícím strukturní spojku bylo podobného efektu dosaženo nejčastěji spojkou, která ve vhodné orientaci obsahuje funkční skupinu, jež je schopna koordinace k oběma kovovým centrům komplexu zároveň. V tomto směru se jako spojovací molekula velmi dobře osvědčil např. propan-2-ol, 2,4,6-trimethylfenol (ligand **XIV**) nebo naftyridin či pyrazol. Chelatující části molekuly se většinou nemění a odpovídají výše uvedeným. Dinukleární zinečnatý komplex Zn_2 -**XIV** (cit.^{37,50}) vykazuje až 120× vyšší účinnost při hydrolyze HPNP než mononukleární zinečnatý komplex Zn -[9]aneN₃ a asi 20 až 40× vyšší aktivitu než Zn_2 -bis([9]aneN₃) komplexy s flexibilními spojkami.

Kromě výše zmíněných derivátů, připravených pomocí makrocyclického přístupu či s využitím strukturní spojky, byla za účelem vyšší aktivity, která by se blížila přírodním enzymům, připravena ještě celá řada dalších komplexů. Byly syntetizovány systémy na bázi dendrimerů a nanočástic zlata, které mají na svém vnějším povrchu vázány kovové ionty¹. Chelatujícími ligandy jsou opět struktury podobné již výše uvedeným, obsahující většinou dusíkaté donorové atomy. Další pokusy o vylepšení katalytické aktivity vedly k přípravě syntetických modelů metaloenzymů s nukleofily zabudovanými přímo do jejich struktury a dále k zavedení ligandů s pozitivně nabitými rameny. Pro vyšší reaktivitu vůči přírodním substrátům, nukleovým kyselinám, byly také do systémů zavedeny pomocné části molekul, které přímo interagují s nukleovými kyselinami. Vzhledem k rozsahu této práce bohužel není možné, aby zde byly veškeré systémy obsaženy, odkazujeme proto čtenáře na přehledné referáty zabývající se zmíněnými strukturními typy^{1,6,8,51,52}.

4. Závěr

V posledních 30 letech bylo publikováno široké spektrum systémů, syntetických enzymatických modelů, které katalyzují štěpení vazby P–O. Vzhledem ke každoročnímu enormnímu růstu počtu publikací na toto téma není možné všechny systémy do našeho přehledného článku zahrnout, proto zde byly uvedeny pouze některé vybrané příklady. I přes velkou snahu výzkumných týmů dosud nebyly při-

praveny katalyzátory, které by se svou aktivitou vyrovnaly účinnosti přírodních enzymů. Jejich vývoj je mimo jiné komplikován dosud ne zcela objasněným mechanismem štěpení fosfoesterové vazby, ale také multidisciplinárním charakterem primárního výzkumu. Rychlost štěpení fosfoesterové vazby je ovlivněna mnoha faktory a na syntetické modely fosfoesteras jsou tak kladeny značné nároky. Modelové systémy musí vykazovat jednak dobrou afinitu k substrátu, jednak musí být vysoce aktivní při jeho štěpení. Jejich příprava by měla být pokud možno snadná a kvantitativní a vhodné látky by měly být dobře rozpustné v reakčním médiu (ideálně ve vodě). Přestože byla syntetizována řada vysoce aktivních systémů katalyzujících štěpení fosfoesterové vazby ve směsných vodných rozpouštědlech, bylo dosud připraveno jen velmi málo katalyzátorů rozpustných ve vodě a jejich aktivita je řádově nižší. Další výzkum v této oblasti bude proto pravděpodobně směřován k vývoji systémů aktivních ve vodném prostředí. Takové látky by mohly být v budoucnu použity např. jako nové typy protinádorových léčiv (cytostatik, chemoterapeutik, apod.). Vzhledem k vysoké efektivitě přírodních enzymů mají jejich syntetická analoga značný potenciál také v organické katalýze nebo například v direktivním stříhání deoxyribonukleové či ribonukleové kyseliny. Výhodou syntetických analogů oproti přírodním enzymům je především jejich snadná dostupnost, nízká cena a jednodušší možnost modifikace jejich struktury (a současně aktivity) ke konkrétnímu účelu.

LITERATURA

- Desbouis D., Troitsky I. P., Belousoff M. J., Spiccia L., Graham B.: *Coord. Chem. Rev.* 256, 897 (2012).
- Vodrážka Z.: *Biochemie*. Academia, Praha 2007.
- Hill H. A., Sadler P. J., Thompson A. J.: *Metal Sites in Proteins and Models: Phosphatases, Lewis Acids and Vanadium*. Springer-Verlag, 1997.
- Cowan J. A.: *Inorganic Biochemistry: An Introduction*. Wiley-VCH, 1997.
- Cleland W. W., Hengge A. C.: *Chem. Rev.* 106, 3252 (2006).
- Weston J.: *Chem. Rev.* 105, 2151 (2005).
- Omori K., Kotera J.: *Circ. Res.* 100, 309 (2007).
- Mancin F., Scrimin P., Tecilla P.: *Chem. Commun.* 48, 5545 (2012).
- Williams N. H., Takasaki B., Wall M., Chin J.: *Acc.*

- Chem. Res. 32, 485 (1999).
10. Auld D. S.: *BioMetals* 14, 271 (2001).
 11. Korhonen H., Koivusalo T., Toivola S., Mikkola S.: *Org. Biomol. Chem.* 11, 8324 (2013).
 12. Rulišek L., Vondrášek J.: *J. Inorg. Biochem.* 71, 115 (1998).
 13. Raganathan K. G., Schneider H. J.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 35, 1219 (1996).
 14. Gómez-Tagle P., Yatsimirsky A. K.: *Inorg. Chem.* 40, 3786 (2001).
 15. Aguilar-Pérez F., Gómez-Tagle P., Collado-Fregoso E., Yatsimirsky A. K.: *Inorg. Chem.* 45, 9502 (2006).
 16. Chang C. A., Chen Y. P., Hsiao C. H.: *Eur. J. Inorg. Chem.* 2009, 1036.
 17. Chang C. A., Wu B. H., Hsiao C. H.: *Eur. J. Inorg. Chem.* 2009, 1339.
 18. Lönnberg H.: *Org. Biomol. Chem.* 9, 1687 (2011).
 19. Göbel M. W., Rousev C. D., Ute S.: *Helv. Chim. Acta* 97, 215 (2014).
 20. Riccardo S., Mandolini L., Savelli C.: *J. Org. Chem.* 78, 7259 (2013).
 21. Jones D. R., Lindoy L. F., Sargeson A. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 105, 7327 (1983).
 22. De Rosch M. A., Trogler W. C.: *Inorg. Chem.* 29, 2409 (1990).
 23. Koike T., Kimura E.: *J. Am. Chem. Soc.* 113, 8935 (1991).
 24. Bonfá L., Gatos M., Mancin F., Tecilla P., Tonellato U.: *Inorg. Chem.* 42, 3943 (2003).
 25. Bazzicalupi C., Bencini A., Bianchi A., Fusi V., Giorgi C., Paoletti P., Valtancoli B., Zanchi D.: *Inorg. Chem.* 36, 2784 (1997).
 26. Molenveld P., Engbersen J. F. J., Reinhoudt D. N.: *Eur. J. Org. Chem.* 1999, 3269.
 27. Molenveld P., Stikvoort W. M. G., Kooijman H., Spek A. L., Engbersen J. F. J., Reinhoudt D. N.: *J. Org. Chem.* 64, 3896 (1999).
 28. Yashiro M., Ishikubo A., Komiyama M.: *Chem. Commun.* 83 (1997).
 29. Koike T., Inoue M., Kimura E., Shiro M.: *J. Am. Chem. Soc.* 118, 3091 (1996).
 30. Lodeiro C., Parola A. J., Pina F., Bazzicalupi C., Bencini A., Bianchi A., Giorgi C., Masotti A., Valtancoli B.: *Inorg. Chem.* 40, 2968 (2001).
 31. Korupoju S. R., Mangayarkarasi N., Zacharias P. S., Mizuthani J., Nishihara H.: *Inorg. Chem.* 41, 4099 (2002).
 32. Breslow R., Singh S.: *Bioorg. Chem.* 16, 408 (1988).
 33. Chapman Jr W. H., Breslow R.: *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5462 (1995).
 34. Young M. J., Chin J.: *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10577 (1995).
 35. Fry F. H., Spiccia L., Jensen P., Moubaraki B., Murray K. S., Tiekink E. R. T.: *Inorg. Chem.* 42, 5594 (2003).
 36. Belousoff M. J., Graham B., Spiccia L.: *Eur. J. Inorg. Chem.* 2008, 4133.
 37. Iranzo O., Elmer T., Richard J. P., Morrow J. R.: *Inorg. Chem.* 42, 7737 (2003).
 38. McCue K. P., Morrow J. R.: *Inorg. Chem.* 38, 6136 (1999).
 39. Arca M., Bencini A., Berni E., Caltagirone C., Devillanova F. A., Isaia F., Garau A., Giorgi C., Lippolis V., Perra A., Tei L., Valtancoli B.: *Inorg. Chem.* 42, 6929 (2003).
 40. Sheng X., Guo X., Lu X. M., Lu G. Y., Shao Y., Liu F., Xu Q.: *Bioconjugate Chem.* 19, 490 (2008).
 41. Rossi P., Felluga F., Tecilla P., Formaggio F., Crisma M., Toniolo C., Scrimin P.: *J. Am. Chem. Soc.* 121, 6948 (1999).
 42. Wang Q., Lönnberg H.: *J. Am. Chem. Soc.* 128, 10716 (2006).
 43. Cacciapaglia R., Casnati A., Mandolini L., Peracchi A., Reinhoudt D. N., Salvio R., Sartori A., Ungaro R.: *J. Am. Chem. Soc.* 129, 12512 (2007).
 44. Subat M., Woinaroschy K., Gerstl C., Sarkar B., Kaim W., König B.: *Inorg. Chem.* 47, 4661 (2008).
 45. Liu S., Hamilton A. D.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7, 1779 (1997).
 46. Liu S., Luo Z., Hamilton A. D.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 36, 2678 (1997).
 47. Molenveld P., Engbersen J. F. J., Reinhoudt D. N.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 38, 3189 (1999).
 48. Molenveld P., Engbersen J. F. J., Reinhoudt D. N.: *J. Org. Chem.* 64, 6337 (1999).
 49. Molenveld P., Kapsabelis S., Engbersen J. F. J., Reinhoudt D. N.: *J. Am. Chem. Soc.* 119, 2948 (1997).
 50. Iranzo O., Kovalevsky A. Y., Morrow J. R., Richard J. P.: *J. Am. Chem. Soc.* 125, 1988 (2003).
 51. Parkin G.: *Chem. Rev.* 104, 699 (2004).
 52. Kirby J. A., Hollfelder F.: *From Enzyme Models to Model Enzymes*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2009.

D. Bím^{a,b}, L. Rulišek^b, and J. Hodačová^a (^a *Department of Organic Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague*, ^b *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Synthetic Models of Metalloenzymes Capable of Catalyzing Phosphodiester Bond Cleavage**

Phosphodiester bond cleavage is one of the most important processes in all living systems. Cell regulation is based on the effective and selective P–O bond cleavage, which is achieved by natural enzymes – phosphodiesterases. Some enzymes of this group rank among the most efficient known. The structure of these enzymes and their mechanism of action are important for designing the artificial enzyme models capable of catalyzing P–O bond cleavage. The present review summarizes the current approaches leading to synthesis of enzyme models and provides a comprehensive overview of the most important systems that have been synthesized and studied.