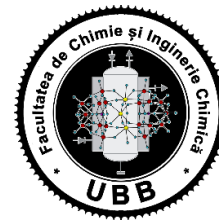




UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI  
BABEȘ-BOLYAI TUDOMÁNYEGYETEM  
BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITÄT  
BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITY  
TRADITIO ET EXCELLENTIA



**Universitatea Babeș-Bolyai**  
**Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică**

**Rezumatul tezei de doctorat**

*Reactivitatea vitaminei B<sub>12</sub> și a compușilor înrudiți cu molecule mici*

Student doctorand

**Maria Ștefana Lehene**

Coordonator științific:

Prof. Dr. Radu-Lucian Silaghi-Dumitrescu

Cluj-Napoca

2024

**Cuvinte cheie:** cobalt, cobalamină, peroxid, UV-vis, stopped-flow, DFT, hemoglobină, albumină, ascorbat, antioxidant, RMN, peroxyacid, hipoclorit, clorit, clorit dismutază.

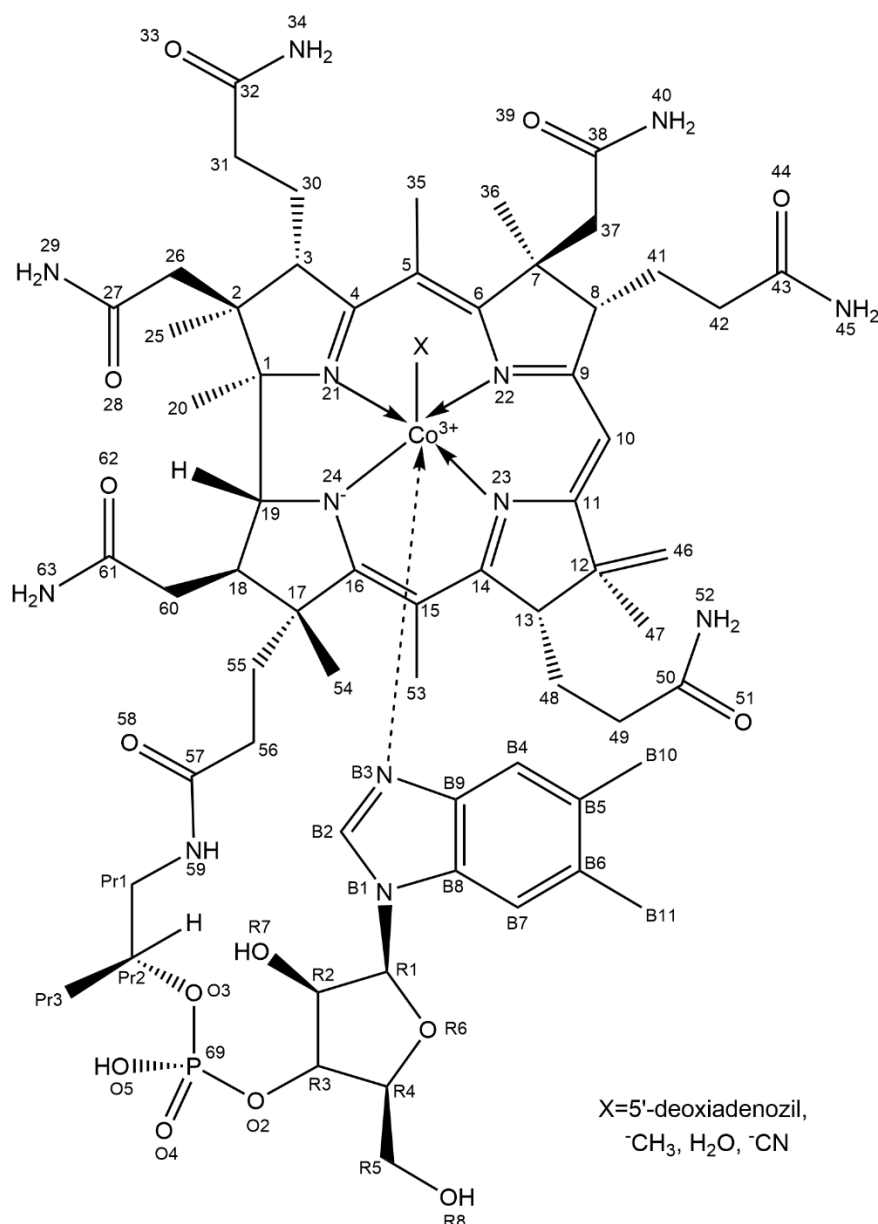
## Cuprinsul tezei de doctorat

1.	Introducere.....	3
1.1.	Structură.....	3
1.2.	Rol.....	6
1.3.	Domeniul de aplicare al chimiei de coordinare a cobalaminei cu liganzi exogeni de masă moleculară mică.....	7
2.	Interacțiunea și relevanța fiziologică a oxidanților și antioxidanților asupra unui sistem metalamacrociclic chintesențial: hemul din hemoglobină.....	9
2.1.	Introducere.....	9
2.2.	Materiale și metode.....	10
2.3.	Rezultate și discuții.....	11
3.	Aductul aquacobalaminei cu apa oxigenată.....	24
3.1.	Introducere.....	24
3.2.	Materiale și metode.....	24
3.3.	Rezultate și discuții.....	26
4.	Despre reacția cobalaminei Co(II) cu apa oxigenată.....	36
4.1.	Introducere.....	36
4.2.	Materiale și metode.....	37
4.3.	Rezultate și discuții.....	38
5.	Un complex de cobalamină cu un peroxid organic.....	45
5.1.	Introducere.....	45
5.2.	Materiale și metode.....	46
5.3.	Rezultate și discuții.....	48
6.	Aducții ciano- și aquacobalaminei cu hipocloritul.....	65
6.1.	Introducere.....	65

6.2. Materiale și metode.....	66
6.3. Rezultate și discuții.....	67
7. Aductul cu clorit al aquacobalaminei: contrast cu clorit dismutaza.....	84
7.1. Introducere.....	84
7.2. Materiale și metode.....	85
7.3. Rezultate și discuții.....	86
8. Concluzii generale.....	95
9. Mulțumiri.....	97
10. Lista lucrărilor publicate și a participărilor la conferințe.....	98
10.1. Articole în reviste, parte a tezei.....	98
10.2. Articole în reviste, care nu fac parte din această teză.....	99
10.3. Participări la conferințe.....	100
11. Referințe.....	101
12. Informații suplimentare.....	120
12.1. Introducere.....	120
12.2. Interacțiunea și relevanța fiziologică a oxidanților și antioxidanților asupra unui sistem metalamacrociclic chintesențial: hemul din hemoglobină.....	121
12.3. Aductul aquacobalaminei cu apa oxigenată.....	122
12.4. Despre reacția cobalaminei Co(II) cu apa oxigenată.....	133
12.5. Un complex de cobalamină cu un peroxid organic.....	143
12.6. Aducții ciano- și aquacobalaminei cu hipocloritul.....	147
12.7. Aductul cu clorit al aquacobalaminei: contrast cu clorit dismutaza.....	155

## 1. Introducere

Cobalamina (Figura 1) este una dintre cele mai complexe vitamine din punct de vedere al structurii. Descrierea structurii cristaline de către Hodgkin et al.<sup>1</sup> a fost o lucrare de pionierat în caracterizarea structurală a biomoleculor, fiind recompensată premiul Nobel în 1964.



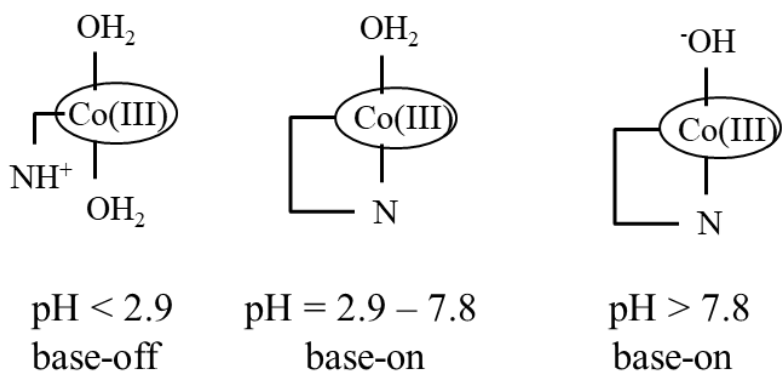
**Figura 1.** Structura cobalaminei și a liganzilor exogeni cei mai tipici.

Principala caracteristică structurală a cobalaminei este ionul de cobalt, coordinat axial de inelul aromatic al 5,6-dimetilbenzimidazolului (DMBZ) și ecuatorial de macrociclul corină.<sup>2</sup> A șasea poziție de coordonare a cobaltului este disponibilă pentru coordonarea unei varietăți de grupări. Cea mai notabilă dintre acestea este  $\text{CH}_3$ ; metilcobalamina (MeCbl) este o formă biologic activă a vitaminei B<sub>12</sub>, utilizată ca purtător de metil în procesul de cataliză al metiltransferazelor. Gruparea metil legată tranzitoriu în metilcobalamina facilitează procesul de metilare în diferite căi metabolice, inclusiv biosinteza metioninei, metanului, acetonei și antibioticelor, cum ar fi carbapeneme și tiostrepton. AdoCbl, adenzilcobalamina, care este, de asemenea, o formă biologic activă a vitaminei B<sub>12</sub>, are o grupare 5'-deoxadenozil care legată de cobaltul din cobalamina prin carbonul 5'. AdoCbl facilitează conversia unui produs secundar toxic, metilmalonil-CoA, în succinil-CoA printr-o reacție de izomerizare bazată pe radicali. Astfel, atât metilcobalamina și adenzilcobalamina conțin o legătură covalentă cobalt-carbon, fiind prin urmare exemple rare de compuși organometalici naturali. O altă formă a vitaminei B<sub>12</sub> este ciancobalamina (CNCbl), cu o grupare cianură ca ligand. CNCbl este nefuncțională și trebuie convertită in vivo în MeCbl sau AdoCbl pentru activitatea biologică. Este de obicei utilizată pentru prevenirea și tratarea deficienței de vitaminei B<sub>12</sub>, deoarece este cea mai accesibilă formă comercială de cobalamina. În absența altor liganzi, vitamina B<sub>12</sub> în soluție apoasă leagă o moleculă de apă formând hidroxocobalamina sau aquacobalamina; acesta din urmă predomină la pH-ul fiziologic. Hidrox/aqua cobalamina are o afinitate extrem de mare pentru cianură și formează ciancobalamina, motiv pentru care este folosită ca antidot în cazul otrăvirii cu cianură.

5,6-dimetilbenzimidazolul cobalaminei poate exista într-o conformație coordonată (base-on) sau liberă (base-off). Echilibrul base-on/off joacă un rol important pentru legarea și activitatea catalitică a cobalaminei în proteine, în timp ce ligandul superior afectează în mod direct chimia și biologia cofactorilor vitaminei B<sub>12</sub>. În general, cobalamina se găsește în soluție în soluție sub forma base-on, ceea ce înseamnă că 5,6-dimetil benzimidazolul este coordonat la inelul corinic.<sup>2</sup> Cu toate acestea, legătura de coordonare Co-N dintre cobalt și DMBZ nu este puternică, iar baza nucleotidică poate disocia în funcție de pH, temperatură și starea de oxidare a ionului de cobalt.

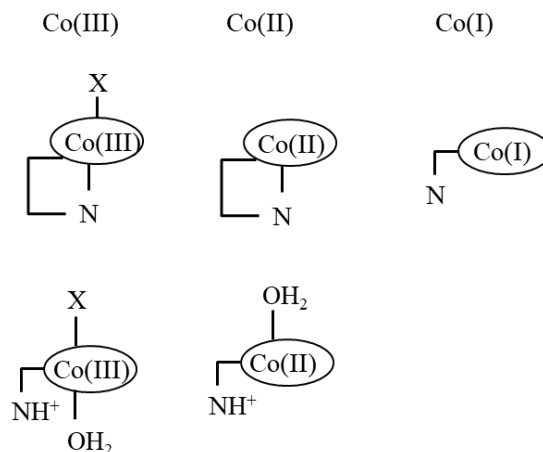
La pH < 2,9 DMBZ este înlocuit cu o moleculă de apă, cf. Figuri 2. Potențialul redox al Cbl(III) este puternic dependent de pH și rămâne independent numai între 2,9 și 7,8. La pH < 2,9 valorile sunt mai pozitive, iar la pH > 7,8 valorile sunt mai negative. În timp ce la pH > 7,8 aqua-

ligandul este deprotonat în hidroxid, la  $\text{pH} < 2,9$  5,6-dimetilbenzimidazolul atașează protonul și dă specii Cbl(III) base-on.<sup>2</sup>



**Figura 2.** Specii base-on și base-off ale cobalaminei.

În condiții reducătoare, cobalamina Co(II) se formează relativ ușor. Această formă, numită  $B_{12r}$ , este pentacoordinată și paramagnetică (și, prin urmare, detectabilă prin spectroscopie de rezonanță paramagnetică electronică, RES). Această formă este relativ inertă în condiții anaerobe, dar se oxidează rapid în prezența oxigenului molecular. Reducerea suplimentară a  $B_{12r}$  printr-un electron suplimentar conduce la forma super-redușă  $B_{12s}$ , Co(I), care este tetracoordinată. Forma Co(I) este foarte nucleofilă și un agent reducător reactiv puternic. Cob(I)alamina participă la reacțiile de transfer ale grupării metil, la dehalogenarea substraturilor organice și la sinteza in vivo a formelor de coenzime. Formarea formei Co(I) este un pas important în mai multe sisteme catalitice, inclusiv cobalaminele și derivații lor.<sup>3</sup> Un sumar al stărilor de coordinare descrise mai sus este prezentat în Figura 3.



**Figura 3.** Stările de coordinaare ale Co(III), Co(II) și Co(I)-cobalaminelor. <sup>2</sup>

Cobalamina a fost descoperită în 1926, ca factor de anemie antipernicioasă - fiind apoi efectiv izolată pentru prima dată în 1948. Anemia pernicioasă este o boală autoimună care are ca rezultat o producție deficitară de factor intrinsec (IF), proteina care facilitează absorbția cobalaminii. Această afecțiune poate provoca deficit sever de vitamina B<sub>12</sub> (hipocobalaminemie), chiar și cu un aport alimentar adecvat al vitaminei. Anemia pernicioasă se caracterizează prin anemie, precum și disfuncții neurologice și digestive.

Oamenii au doar două enzime dependente de cobalamină: metionin sintetaza citoplasmatică și mutaza metilmalonil-CoA mitocondrială. Metionin sintetaza facilitează transferul unei grupări metil de la N 5-metiltetrahidrofolat la homocisteină, generând tetrahidrofolat și metionină. Cobalamina acționează ca un purtător intermediar al grupării metil și cicluri între methylcobalamină și cob(I)alamină. Mutaza metilmalonil-CoA utilizează forma 5'-deoxiadenozilcobalamină a cofactorului pentru a cataliza rearanjarea 1,2 a metilmalonil-CoA în succinil-CoA.

Chimia coordinativă a cobalaminii include și o serie de alți liganzi exogeni cu moleculă mică pe lângă cei din Figura 1, unii dintre aceștia purtând și ei relevanță fiziologică. Astfel, monoxidul de azot (NO) este o moleculă de semnalizare formată din gaz și apare atât în exteriorul, cât și în interiorul corpului.<sup>4</sup> Poate avea multiple efecte biochimice, inclusiv reacții cu metaloenzimele.<sup>5</sup> Este produsă de corpul uman și este una dintre cele mai importante molecule pentru sănătatea vaselor de sânge, deoarece crește fluxul sanguin și scade tensiunea arterială.<sup>6,7</sup> Nitroxilul (HNO) are o reactivitate chimică și biologică unică<sup>8,9</sup> prin comparație cu NO, de

exemplu, reacționează direct cu tiolii. Asemenea NO, este, un vasorelaxant. Azotitul ( $\text{NO}_2^-$ ) este un anion anorganic monovalent și se poate transforma în oxid nitric<sup>10</sup> în organism. Are o mare afinitate pentru cobalamină.  $\text{SCN}^-$  (Tiocianatul) este un anion biologic semnificativ.<sup>11</sup> La om, este prezent în concentrații milimolare în fluidele produse de membranele mucoase și, într-o măsură mult mai mică, în sânge. De asemenea, au fost studiate reacțiile cob(III)alamină cu sulfat și tiosulfat, precum și reducerea Cbl(III) la Cbl(II) prin ditionit.

Prezenta teză își propune să investigheze reactivitatea chimică a vitaminei B<sub>12</sub> față de moleculele mici oxidate, inclusiv apa oxigenată, hipocloritul, cloritul și acidul m-cloroperoxibenzoic. Acești compuși joacă roluri ca intermediari în procesele homeostatice ale organismelor vii. Investigarea și evidențierea unor noi mecanisme de reactivitate a vitaminei B<sub>12</sub> cu aceste molecule mici, care nu au fost studiate anterior în acest context, ar putea avea implicații semnificative pentru dezvoltarea tratamentelor pentru deficiențe sau boli metabolice și orice condiții legate de metabolismul acestei vitamine. Agenții oxidanți luați în considerare ca liganzi de cobalamină au fost aleși datorită relevanței lor biologice și pot atinge concentrații relativ ridicate în anumite compartimente celulare specializate și, de asemenea, deoarece chimia lor cu metalamacroclicii înrudiți (cum ar fi hemul) este bine cunoscută.

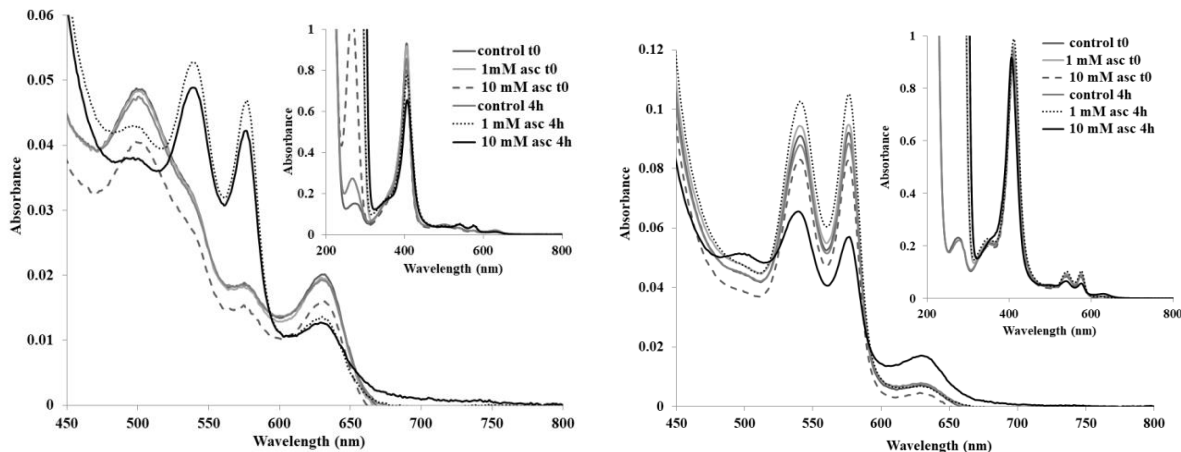
## **2. Interacțiunea și relevanța fiziologică a oxidanților și antioxidanților asupra unui sistem metalamacrociclic chintesențial: hemul din hemoglobină<sup>1</sup>**

Antioxidanții, și în special ascorbatul, au fost mult timp un subiect al tratamentelor medicale propuse ambițioase (și uneori nesuținute).<sup>12</sup> Mai recent, au fost propuse studii clinice pentru injecțiile intravenoase de ascorbat, împotriva SARS-CoV-2 / COVID-19.<sup>13</sup>

---

<sup>1</sup> Publicat ca Lehene, Maria; Fischer-Fodor, Eva; Scurtu, Florina; Hădade, Niculina D.; Gal, Emese; Mot, Augustin C.; Matei, Alina; Silaghi-Dumitrescu, Radu. Excess ascorbate is a chemical stress agent against proteins and cells. *Pharmaceuticals*, 2020, 13(6), 107.

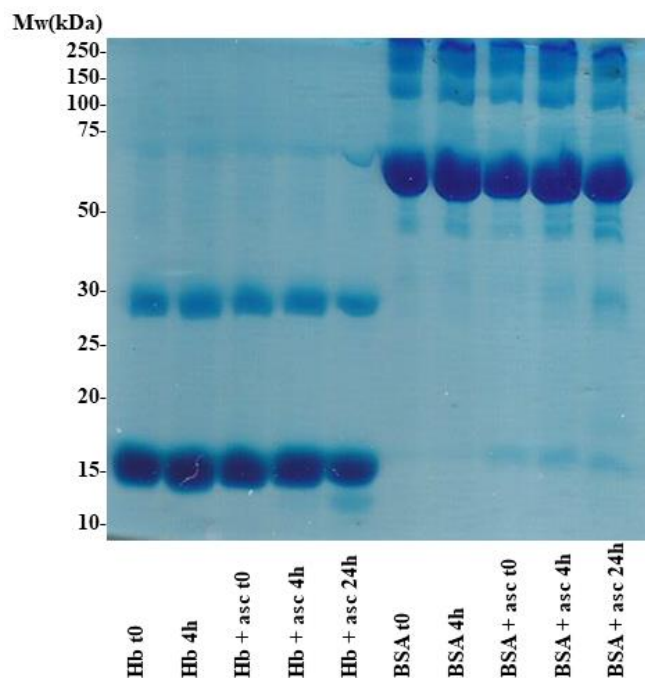




**Figura 4.** Spectrele UV-vis ale hemoglobinei (panoul superior: feric; panoul inferior: oxi feros) cu concentrații diferite de ascorbat. Condiții: 5  $\mu\text{M}$  met și 7  $\mu\text{M}$  oxi hemoglobină bovină, temperatura camerei, 50 mM fosfat, pH 7.

Spectrele oxi Hb cu ascorbat indică un efect distinct, cf. Figurii 4. Astfel, la 4 ore, proba de 10 mM (dar nu și 1 mM) și-a înjumătățit maximele formei oxi de la 540 și 580 nm și a dezvoltat un semnal puternic la 630 nm, caracteristic formei ferice. Excesul de ascorbat este astfel un promotor eficient al autooxidării Hb. Am arătat anterior că la timpi de incubare mai lungi și / sau cu concentrații mai mari de ascorbat, oxi Hb dezvoltă, de asemenea, caracteristici spectrale ale degradării hemului, nu numai oxidarea fierului.<sup>14</sup>

Figura 5 prezintă datele SDS-PAGE privind Hb expusă la ascorbat; albumina a fost, de asemenea, utilizată în acest caz, ca exemplu alternativ de proteină din sânge care poate fi expusă la ascorbat în exces. Pentru proba de Hb-ascorbat, se observă o ușoară scădere a intensității benzilor datorită Hb (monomer, dominant și dimer, mai puțin intens) la 4 ore – împreună cu apariția unei noi benzi la masă moleculară mai mică. Pentru albumină, benzi cu masă moleculară mai mică par să se dezvolte în timp. Aceste observații sugerează că o mică parte a proteinei poate fi degradată la aceste concentrații de ascorbat – și că procesul nu este unic pentru hemoglobină. Reacția directă a ascorbatului / ascorbilului cu oxigenul molecular sau a ascorbilului cu proteinele poate fi responsabilă pentru inițierea unor astfel de procese.



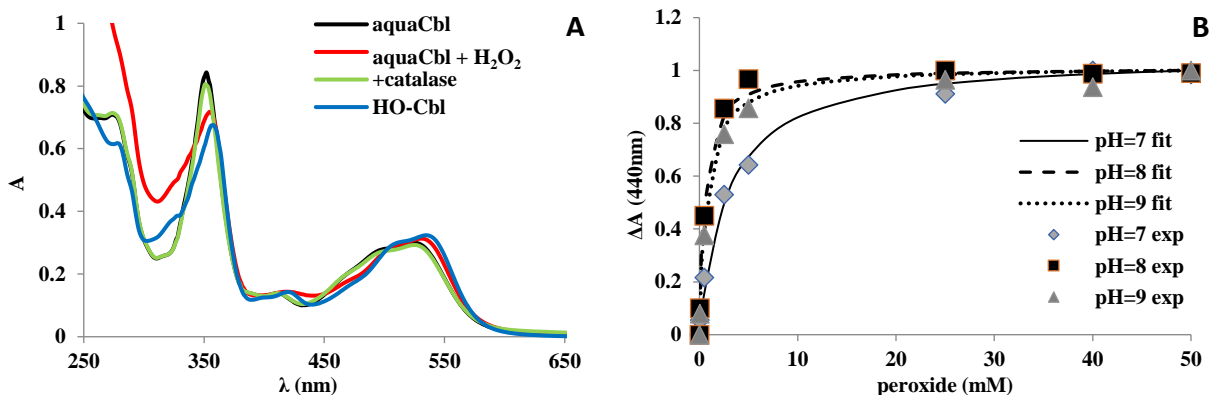
**Figura 5.** SDS-PAGE (12%) de hemoglobină și albumină expuse la ascorbat. Condiții: 50  $\mu$ M Hb, 20  $\mu$ M albumina serică bovină (BSA) au fost incubate la temperatura camerei pentru momentele indicate, cu sau fără ascorbat de 10 mM, în fosfat de 50 mM, pH = 7. Probele, de la stânga la dreapta, sunt: 1. Hb t0 (fără incubare), 2. Hb 4h, 3. Hb + ascorbat t0, 4. Hb + ascorbat 4h, 5. Hb + ascorbat 24h, 6. BSA t0, 7. BSA 4h, 8. BSA + ascorbat t0, 9. BSA + ascorbat 4h, 10. BSA + ascorbat 24h.

### 3. Aductul aquacobalaminei cu apa oxigenată <sup>2</sup>

Reacțiile peroxizilor cu centri de metale tranziționale relevante din punct de vedere biologic urmează adesea paradigma definită de chimia Fenton, unde are loc scindarea legăturii O-O, generând oxidanți puternici, cum ar fi radicalii hidroxil și speciile de metale cu valență ridicată și / sau modificând în continuare compușii organici, fie în mod intenționat (ca în peroxidaze, citocromii P450, oxigenazele de fier non-hem, bleomicina de fier și cupru, oxigenazele de mangan,

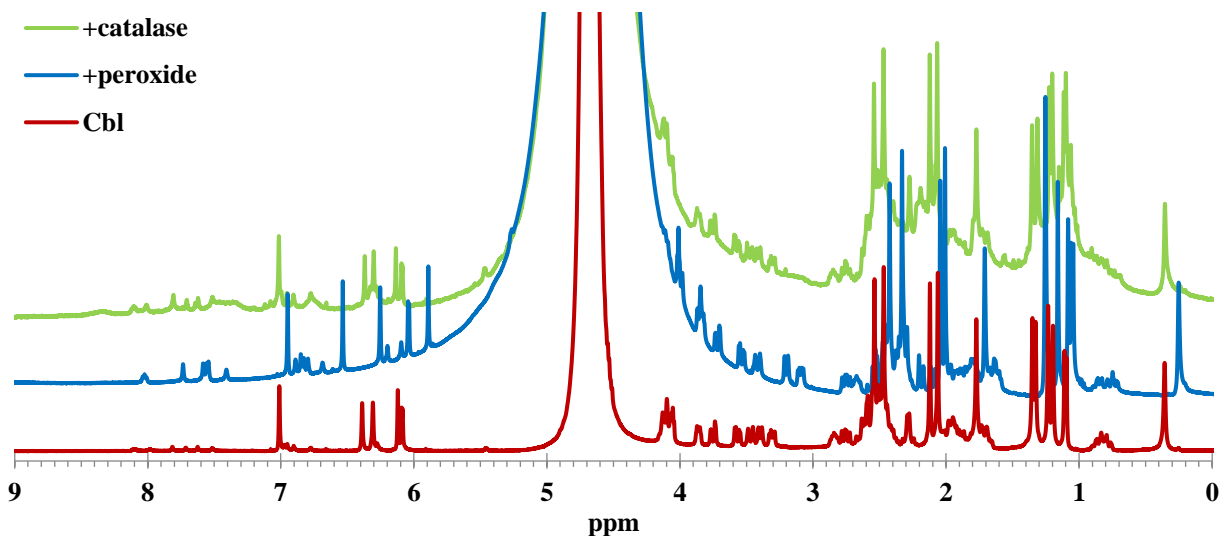
<sup>2</sup> Publicat ca Lehene, Maria; Pleșa, Diana; Ionescu-Zinca, Stefania; Iancu, Stefania D.; Leopold, Nicolae; Makarov, Serghei V.; Brânzanic, Adrian M.V.; Silaghi-Dumitrescu, Radu. Adduct of aquacobalamin with hydrogen peroxide. *Inorganic Chemistry*, 2021, 60 (17), 12681-12684

peroxidazele care conțin vanadiu și altele) fie ca reacție secundară.<sup>15-18</sup> Pe de altă parte, în unii centri bioanorganici se formează complecși metalici stabili metal-peroxo - cum ar fi aductul cobalt-peroxo al bleomicinei.<sup>19</sup>



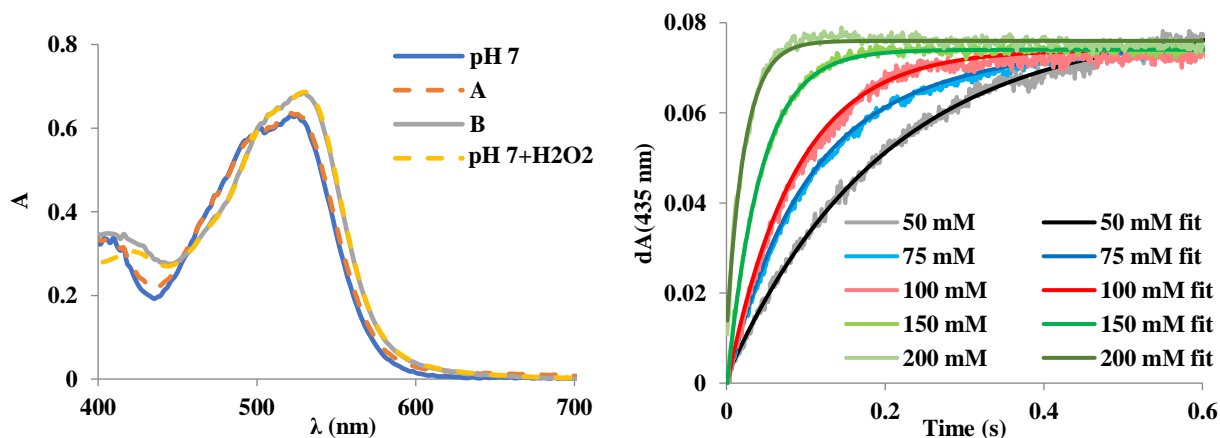
**Figura 6.** A: efectul catalazei asupra spectrului UV-vis al complexului cobalamină-peroxid, la pH 7; prezentat pentru comparație este, de asemenea, spectrul hidroxicobalaminiei (pH 11). B: curbe de titrare pentru aquacobalamina care reacționează cu peroxidul la pH 6, 7 și 8, monitorizate la 440 nm. Condiții: 0,05 mM Cbl, 22°C.

Figurile 6 și 7 arată că spectrele UV-vis ale aquaCbl sunt afectate de către apa oxigenantă într-o manieră dependentă de concentrație, cu un  $K_d$  apparent de 0,25 mM la pH 7 (0,56 mM la pH 8, 0,78 mM la pH 9) - ceva mai mici decât cele pentru azotit sau tiocianat,<sup>4,20</sup> dar mult mai mare decât pentru cianură.<sup>21,22</sup> Spectrul cobalamină + peroxid este diferit de cel al hidroxocobalaminiei și este readus în întregime de către catalază la cel al aquacobalaminiei, sugerând un complex Cbl-peroxid format reversibil.



**Figura 7.** Spectrele  $^1\text{H}$ -RMN ale Cbl după expunerea la peroxid și după adăugarea ulterioară de catalază. Condiții: 5 mM Cbl, 50 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 200 mM fosfat pH 7, 22°C.

Viteza de formare a complexului peroxid-Cbl a fost examinată prin spectroscopie stopped-flow UV-vis, așa cum se observă în Figura 8. Cinetica poate fi modelată ca un proces simplu  $\text{A} \rightarrow \text{B}$  dependent de concentrația de peroxid, unde specia A este identică cu spectrul de repaus al Cbl, în timp ce specia B prezintă diagnosticul de 435 nm caracteristic aductului Cbl-peroxo.



**Figura 8.** Evoluția tipică în timp a absorbanței (dreapta) și spectrele calculate ale speciilor implicate (stânga), pentru amestecarea în stopped-flow a Cbl cu apa oxigenată. Condiții: 0,07 mM Cbl, pH = 7, temperatura camerei, concentrațiile de peroxid indicate în figură (100 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$

pentru spectrele din panoul din stânga). De asemenea, sunt prezentate pentru referință spectrele Cbl și ale aductului cu peroxid obținute în experimente statice cf. Figura 6.

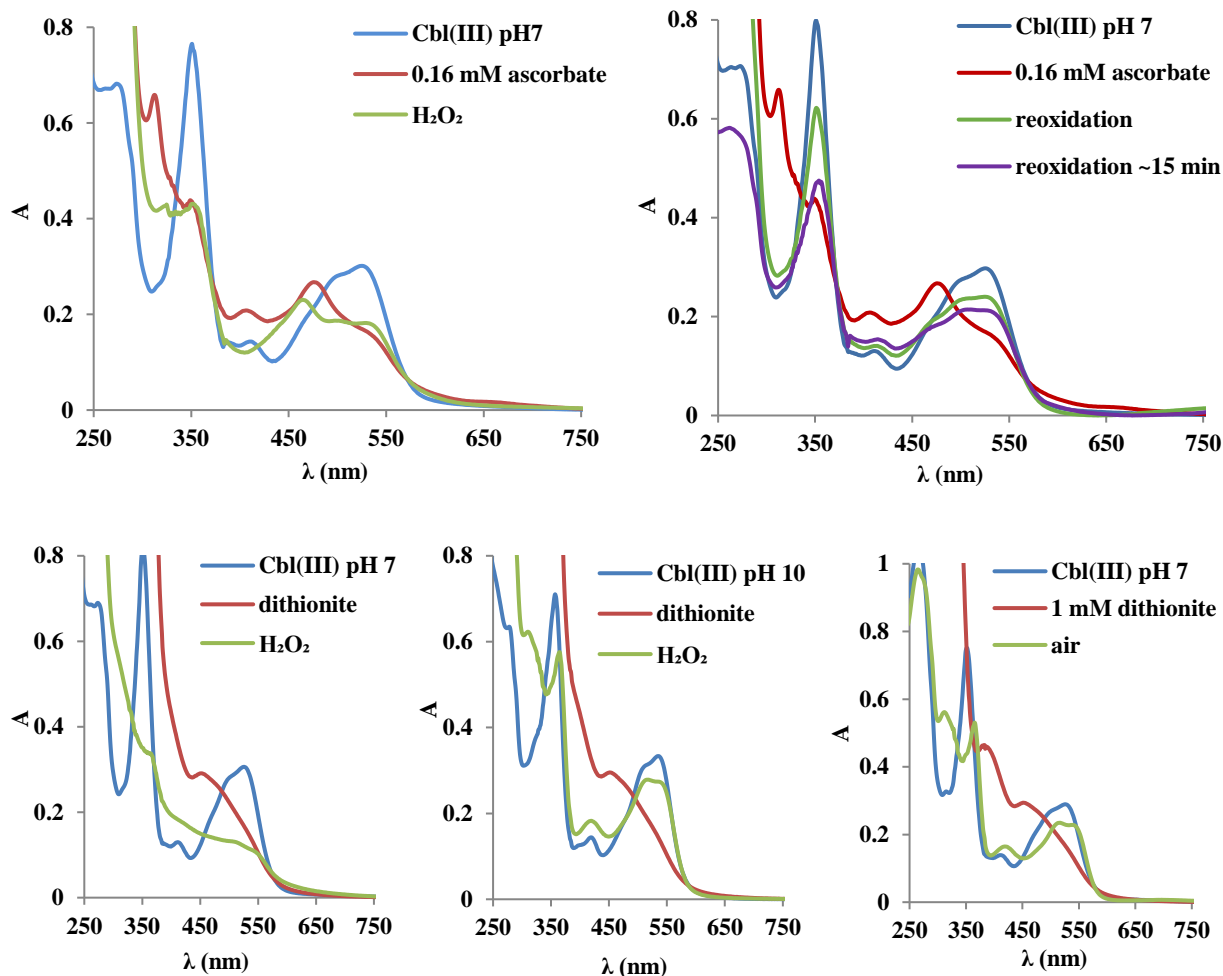
#### 4. Despre reacția Co(II) cobalaminei cu apa oxigenată <sup>3</sup>

Reacțiile apei oxigenate cu centrii de metale tranziționale relevanți din punct de vedere biologic implică de obicei unul dintre cele două mecanisme: (1) coordonarea peroxidului la metal sau (2) reacția redox în afara sferei de coordinare. Complecșii metal-peroxid pot fi stabili – cum ar fi în cazul Co(II)bleomicinei sau Co(III)cobalaminei (Co(III)Cbl),<sup>19,23</sup> sau pot suferi scindarea legăturii O-O, cum ar fi în cazul sistemelor Fenton, peroxidazelor, citocromilor P450, complecșilor bleomicinei cu fier sau cupru, peroxidazelor care conțin vanadiu, sau altele).<sup>15-18</sup> Reacțiile în afara sferei de coordinare ale peroxizilor cu centrii metalici sunt de obicei monoelectronice și, prin popularea orbitalului antilegătură  $\sigma^*$  al legăturii peroxidice cu electronii primiți de la metal, conduc la scindarea legăturii O-O cu formare de radicali hidroxil; astfel de procese sunt de obicei asociate cu chimia Fenton sau cu reacții secundare nedorite ale centrilor metalici biologici.<sup>24-28</sup>

Figura 9 arată descrie reoxidarea B<sub>12r</sub> cu O<sub>2</sub> în prezența ascorbatului în exces, care restabilește parțial un spectru asemănător cu aquaCbl; cu toate acestea, la timpi de reacție mai lungi se observă o creștere a regiunii la 450 nm, sugerând formarea unor specii de tip SYC(stable yellow corrinoid, cu sistemul corinic oxigenat la periferie). Acest lucru poate fi explicat prin formarea ROS (inclusiv peroxid) datorită interacțiunii excesului de ascorbat cu O<sub>2</sub> și datorită oxidării monoelectronice a Cbl(II) cu O<sub>2</sub> într-o reacție pseudo ascorbat oxidazică.

---

<sup>3</sup> Publicat ca Pleșa, Diana; Lehene, Maria; Silaghi-Dumitrescu, Radu. On the reaction of Co(II) cobalamin with hydrogen peroxide. Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis, 2023, 136,1791–1799.



**Figura 9.** Spectre UV-vis reprezentative ilustrând reoxidarea B<sub>12r</sub> sau B<sub>12r</sub> cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sau O<sub>2</sub>.

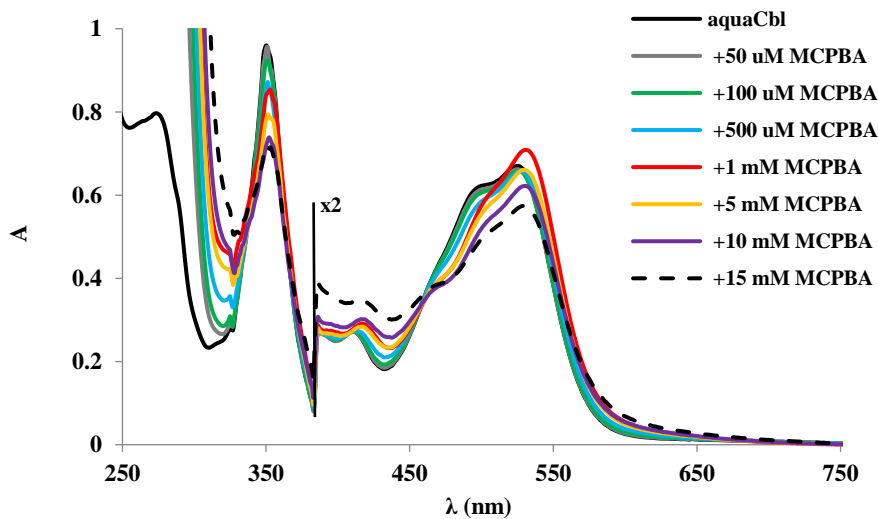
Panou superior: spectre UV-vis de 0,05 mM Co(III)cobalamină cu 0,16 mM ascorbat și reoxidare cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> și O<sub>2</sub> la pH 7, 22°C. Panou inferior: spectre UV-vis de 0,05 mM Co(III)cobalamină cu 1 mM ditionit de sodiu și reoxidare cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la pH 7 și pH 10 și cu O<sub>2</sub> la pH 7, 22°C.

Reoxidarea aquaCbl cu ditionit redus (B<sub>12rs</sub>, hexacoordinat cu un ligand SO<sub>2</sub> trans la dimetilbenzimidazol, DMBZ) la pH 7 duce la dispariția spectrului Cbl în regiunea vizibilă – probabil dintr-o reacție pseudo ditionit peroxidazică și din reacția cu specii reactive prezente în mod inerent în amestecuri de ditionit cu agenți oxidanți.<sup>29–33</sup> Cu toate acestea, la pH 10 se obține un spectru tipic de Co(III)Cbl la reoxidarea lui B<sub>12rs</sub> cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Această reactivitate diferită la pH-ul bazic se poate datora unei reactivități mai scăzute a ditionitului la pH-ul bazic (într-adevăr, în acest interval de pH, reactivitatea ditionitului este afectată semnificativ de pH, în special prin natura complexă a posibilor săi produși de descompunere, cum ar fi bisulfitul, tiosulfatul, dioxidul de

sulf și alții, în timp ce ascorbatul, cu un pKa de 4,2 și un singur produs – dehidroascorbat – prezintă un comportament mult mai simplu),<sup>34,35</sup> și, de asemenea, indică, în general, un rol pentru protoni în formarea SYC în sistemul peroxid-ditionit. Acest lucru este oarecum în contradicție cu un mecanism în care hidroperoxidul ar fi reactivul cheie care atacă inelul corinic al Cbl.<sup>36</sup>

## 5. Un complex de cobalamină cu un peroxid organic <sup>4</sup>

Complecșii peroxidici ai centrelor metalelor de tranziție biologică sunt, cum s-a arătat mai sus, intermediari reactivi în mecanisme complexe de reacție. Complecși peroxo stabili ai centrelor metalelor de tranziție biologică sunt, de asemenea, cunoscuți, cum ar fi cu Co(II) bleomicină. Cum am demonstrat recent, cobalamina formează și ea un complex stabil Co(III) cu apa oxigenată.<sup>19,23</sup> Acesta a fost primul exemplu de complex al cobalaminei cu un agent oxidant. Capitolul de față demonstrează că aductul cu apa oxigenată nu este o excepție și că în fapt cobalamina oferă posibilități de coordonare și pentru peroxizii organici.



**Figura 10.** Spectre UV-vis ale 50  $\mu$ M aquacobalaminei tratate cu MCPBS (acid m-cloro peroxobenzoic).

<sup>4</sup> Publicat ca Lehene, Maria; Zagrean-Tuza, Hadade, Niculina; Cezara; Aghion, Andreea; Septelean, Raluca; Iancu, Stefania; Brânzanic Adrian M.V.; Silaghi-Dumitrescu, Radu. A complex of cobalamin with an organic peroxide. New Journal of Chemistry, 2023, 47 (39), 18178-18185.

După cum arată Figura 10, la reacția cu MCPBA, spectrul UV-vis al aquacobalaminei ( $\text{H}_2\text{OCbl}^+$ ) suferă modificări batocrome care amintesc de aductul hidroperoxocobalaminic descris în capitolul 3.<sup>23</sup> Punctele izosbestice de la 461 nm, 340 și 367 nm sugerează formarea unui singur produs nou, care poate fi, în principiu, atribuit ca un complex peroaciz (MCPBA)-Cbl(III) analog complexului cobalamină(III)-hidropoxo raportat anterior. Aceste observații au fost coroborate cu date RMN, de rezonanță Raman, de spectrometrie de masă, respectiv DFT.

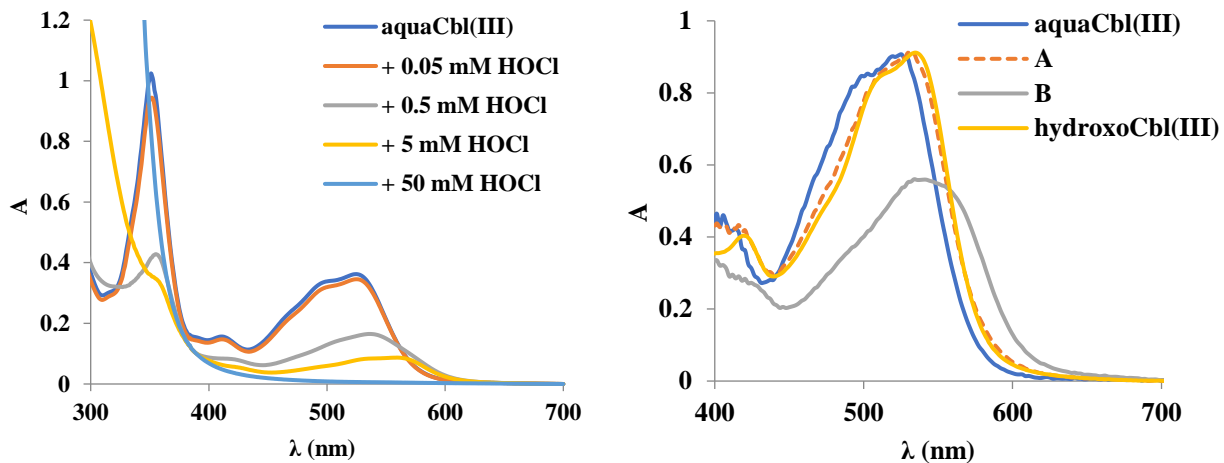
## 6. Aducții ciano- și aquacobalaminei cu hipoclorit <sup>5</sup>

Reacțiile biologice catalizate de cobalamină se referă la heteroliza legăturii cobalt-carbon și hemoliză în aducții de alchil Cbl (III).<sup>37</sup> Chimia redox a cobaltului în Cbl(III) este cunoscută până acum ca fiind constrânsă în principal la reducerea la Co(II) și Co(I).<sup>11,38</sup> S-a demonstrat că tratamentul Cbl(III) cu agenți oxidanți fie nu are efect (de exemplu, cu hexacloridat), fie duce la oxidarea și albirea corinei (de exemplu, cu hipoclorit). Totuși, în teza de față s-a demonstrat formarea reversibilă de aducții relativ stabili de Co(III)-peroxid.<sup>23</sup> Capitolul de față explorează dacă această nouă chimie a coordinativă a cobalaminei cu peroxizii poate fi extinsă și la hipoclorit ca exemplu de o a doua clasă de agenți oxidanți.

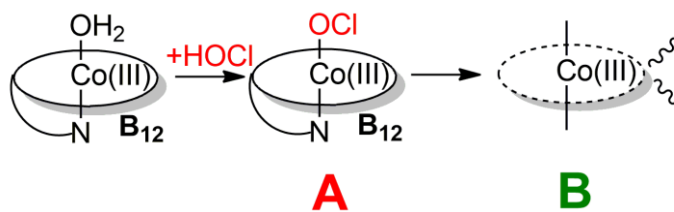
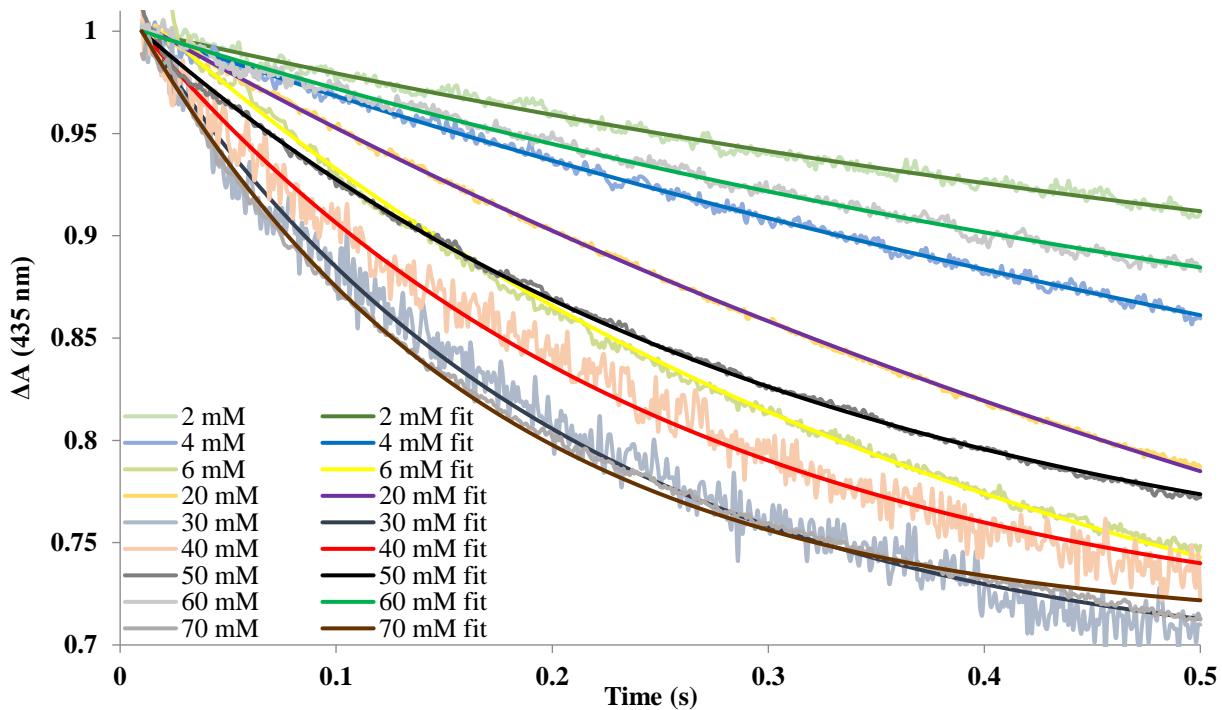
---

<sup>5</sup> Publicat ca Lehene, Maria; Brânzanic Adrian M.V.; Silaghi-Dumitrescu, Radu. The adducts of cyano- and aquacobalamin with hypochlorite. *Journal of Inorganic Biological Chemistry*, 2023, 6 (28), 583-589.





**Figura 11.** Stânga sus: spectrele UV-vis ale aquaCbl tratate cu diferite concentrații de acid hipocloros (amestecare manuală, timp de reacție ~ 1 minut). În dreapta sus: spectre reprezentative ale speciilor A și B rezultate din modelarea cineticii stopped-flow la reacția aquaCbl cu hipoclorit 40 mM; de asemenea, pentru referință sunt prezentate spectrele statice/de echilibru ale aqua și ale hidroxocbl în absența HOCl.



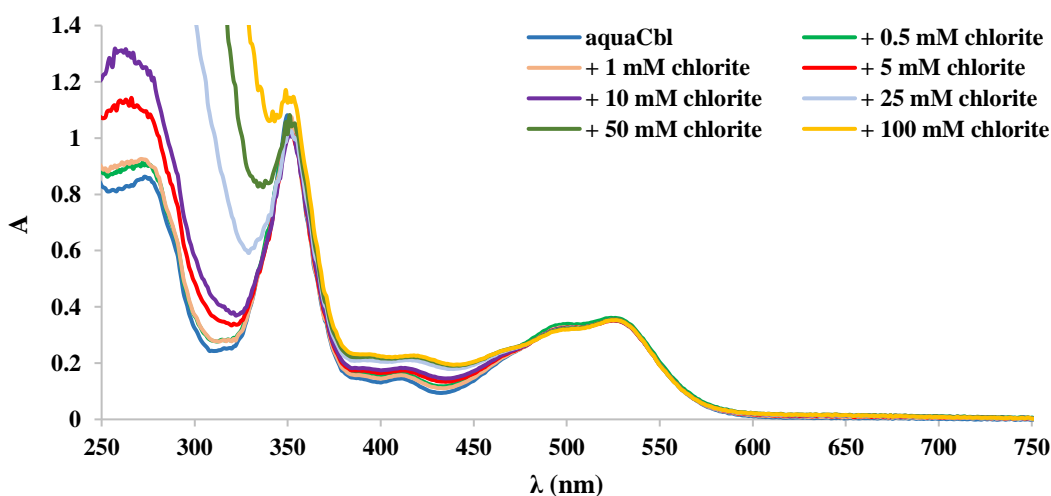
**Figura 12.** Cursul temporal normalizat al absorbanței ( $\Delta A$ ) din experimentele stopped-flow UV-vis. Condiții: 0,5 mM Cbl, pH 7, dacă nu se specifică altfel.

Speciile A din Figurile 11 și 12 sunt atribuite ca aducți Co(III)-hipoclorit. După cum este ilustrat și în Figura 11, constantele vitezei aparente pentru  $A \rightarrow B$  nu par să arate o dependență clară de concentrația de hipoclorit ( $R^2 = 0,2$ ), chiar dacă concentrațiile mai mari duc la reacții mai rapide. Această situație este compatibilă cu un mecanism de reacție în care la  $[HOCl] > 4 \text{ mM}$  aquaCbl reacționează cu hipocloritul în timpul mort al instrumentului ( $\sim 2 \text{ ms}$ ), astfel încât prima specie observabilă este un aduct de Cbl(III)-hipoclorit.

## 7. Aductul aquacobalaminei cu cloritul: contrast cu clorit dismutaza <sup>6</sup>

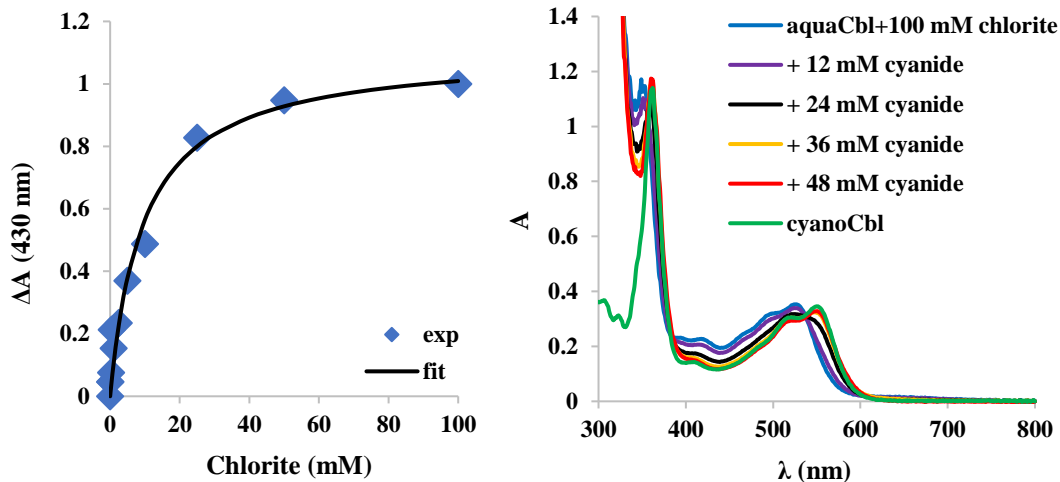
Capitolele anterioare au demonstrat că vitamina B<sub>12</sub> prezintă un domeniu anterior necunoscut de chimie de coordinare, cu agenți peroxizi și cu hipoclorit. Capitolul de față explorează măsura în care hipocloritul nu constituie o excepție – și deci și alți oxianioni ai clorului pot coordina la cobalamină. În acest scop este folosit cloritul ca ligand.

Figurile 13 și 14 arată că cloritul până la 100 mM nu are un efect clar asupra spectrului UV-vis al aquacobalaminei peste 450 nm. În intervalul 250-350 nm, se observă o creștere a absorbantei datorită cloritului, dar nici o schimbare în banda de 350 nm a Cbl. Ușoare modificări în regiunea 400-450 nm se pot datora parțial și cloritului; Cu toate acestea, maximul de 415 nm pare ușor deplasat spre roșu și mai puțin definit la concentrații mai mari de clorit.



**Figura 13.** Spectrele UV-vis ale reacției dintre 50 uM aquaCbl și 0,5 mM-100 mM clorit la pH 7, temperatura camerei. Panoul inferior, stânga: curba de titrare pentru aquacobalamina care reacționează cu cloritul la pH 7, monitorizată la 430 nm.

<sup>6</sup> Trimis la Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2024.



**Figura 14.** Panoul din stânga: curba de titrare pentru aquacobalamina care reacționează cu cloritul la pH 7, monitorizată la 430 nm. Panoul din dreapta: spectrele UV-vis ale aquaCbl care reacționează cu cloritul de 100 mM, comparativ cu aquaCbl care reacționează cu cianura de 12 mM-14 mM și cianoCbl.

Modificări oarecum similare induse de apa oxigenată în spectrele UV-vis ale cobalaminei au fost ignorate anterior până când investigațiile noastre mai detaliate au arătat că acestea se datorează complexării peroxidului la Co(III)Cbl. Figura 13 arată, de asemenea, că aceste modificări arată un comportament de saturație cu un  $K_d$  aparent de 9,6 mM, care poate fi luat ca dovadă pentru formarea unui complex de Co(III)-clorit. După cum se arată și în Figurile 13 și 14, adăugarea de cianură la complexul propus Co(III)-clorit cobalamină duce la formarea ciancobalaminei; aceste spectre pot fi interpretate ca dovezi că cianura deplasează cloritul din Co(III) – și că cloritul nu a indus nici o degradare detectabilă a Cbl la aceste concentrații. Aceste observații au fost coroborate cu date RMN, de rezonanță Raman, spectrometrie de masă și DFT.

## 8. Concluzii generale

Această teză a explorat chimia de coordonare a cobalaminei cu agenți oxidanți. Cobalamina prezintă unele asemănări structurale cu hemul. Hemul și hemoproteinele prezintă, printre altele, reacții relevante din punct de vedere biologic cu agenți oxidanți care conduc la Fe(IV) sau Fe(V)

și, în cele din urmă, radicali liberi, prin mecanisme care includ sau seamănă cu chimia Fenton. Pe de altă parte, înainte de studiile noastre, domeniul chimiei de coordinare a cobalaminei cu agenți oxidanți a fost în întregime inexistent. Datele noastre au arătat acum că mai mulți agenți oxidanți – apa oxigenată, peroxizi organici și oxianioni de halogeni – formează de fapt complecși cu cobalamina Co(III), care sunt similare, dar mai stabile decât cele observate în centrele active conexe ale proteinelor heminice.

Un aduct stabil și reversibil a cobalaminei Co(III) cu apa oxigenată este descris aici pentru prima dată, folosind UV-vis, RMN, rezonanță Raman și DFT. Se propune că ligandul este deprotonat și că se leagă într-o manieră monodentată ca aduct relativ stabil și reversibil de Co(III)-hidroperoxid.

Stadiile incipiente ale reacției dintre Cbl (II) și apa oxigenată au evidențiat în studiile noastre un mecanism de reacție bifurcat. Oxidarea inițială în sfera exterioară a Cbl(II) de către H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are ca rezultat formarea Cbl(III) și a unui radical hidroxil. Acest radical hidroxil poate ataca fie marginea inelului corinic, ducând la formarea unui corinoid galben stabil (SYC), sau poate difuza în soluție, lăsând în urmă un Co(III) intact. Intermediarul pentacoordinat Co(III) nu a fost detectat.

Cbl(III) formează un complex cu acidul m-cloroperoxibenzoic deprotonat, evidențiat de UV-vis și susținut de <sup>1</sup>H-RMN, date spectroscopice Raman rezonant, calcule de funcționale de densitate, și spectrometrie de masă. În schimb, tBuOOH nu pare capabil să formeze un complex peroxo cu Cbl(III). Aceste constatări indică faptul că chimia de coordinare a cobalaminei cu peroxidizii se extinde dincolo de apa oxigenată, dar nu toți compușii peroxo ar trebui să fie de așteptat să se lege la Cbl(III).

Intermediari tranzitorii au fost detectați în reacția aqua, precum și a CNCbl, cu hipoclorit folosind cinetica stopped-flow UV-vis. Susținută de calculele DFT, intermediarul din aquaCbl este atribuit substituției ligandului aqua cu hipoclorit, formând un aduct de Co(III)-OCl. Pentru cianoCbl, intermediarul este propus să apară prin înlocuirea trans DMBZ cu cianura – de aici un aduct ClO<sup>-</sup>-Co(III)-CN<sup>-</sup>. Acești aducți de Co(III)-hipoclorit servesc ca analogi interesați ai aductului Fe(III)-hipoclorit propus ca Compus X în hemoproteine. În special în aductul ciano, ele prezintă oportunități pentru explorarea experimentală ulterioară ca omologi potențial mai stabili ai compusului X.<sup>39,40</sup>

Nu în ultimul rând, cloritul formează un complex stabil de Co(III) cu cobalamina, după cum reiese din datele noastre UV-vis, RMN, MS, rezonanța Raman și DFT. Stabilitatea acestui complex este în contrast cu ceea ce se vede în hemurile ferice, unde (cel puțin pentru clorit dismutază) scindarea legăturii O-Cl pare să dureze mai puțin de 100  $\mu$ s. Similar cu cazul scindării legăturii O-O în complexii Fe/Co-peroxid, ușurința crescută a scindării legăturii O-Cl în Fe(III) comparativ cu Co(III) are probabil legătură cu diferența dintre potențialele redox M(III)/M(IV).

## 10. Referințe

1. Karlson, P. The structure of vitamin B1. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 536–537 (1984).
2. Padmanabhan, S., Jost, M. & Drennan, C. L. A New Facet of Vitamin B 12: Gene Regulation by Photoreceptors. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 485–514 (2017).
3. Dereven'kov, I. A., Salnikov, D. S. & Makarov, S. V. Interaction between super-reduced cobalamin and selenite. *Russ. J. Phys. Chem. A* **91**, 2404–2408 (2017).
4. Wolak, M., Stochel, G., Hamza, M. & Van Eldik, R. Aquacobalamin (vitamin B(12a)) does not bind NO in aqueous solution. Nitrite impurities account for observed reaction. *Inorg. Chem.* **39**, 2018–2019 (2000).
5. Spitler, R. *et al.* Nitrosyl-cobinamide (NO-Cbi), a new nitric oxide donor, improves wound healing through cGMP/cGMP-dependent protein kinase. *Cell. Signal.* **25**, 2374–2382 (2013).
6. Wolak, M., Zahl, A., Schnepf, T., Stochel, G. & van Eldik, R. Kinetics and mechanism of the reversible binding of nitric oxide to reduced cobalamin B(12r) (Cob(II)alamin). *J Am Chem Soc* **123**, 9780–9791 (2001).
7. Selçuki, C., Van Eldik, R. & Clark, T. NO Binding to Cobalamin: Influence of the Metal Oxidation State. *Inorg. Chem.* **43**, 2828–2833 (2004).
8. Subedi, H., Hassanin, H. A. & Brasch, N. E. Kinetic and mechanistic studies on the reaction of the vitamin B 12 complex aquacobalamin with the HNO donor angeli's salt: Angeli's salt and HNO react with aquacobalamin. *Inorg. Chem.* **53**, 1570–1577 (2014).
9. Subedi, H. & Brasch, N. E. Mechanistic studies of the reactions of the reduced Vitamin B12 derivatives with the HNO donor Piloty's acid: Further evidence for oxidation of

- cob(i)alamin by (H)NO. *Dalton Trans.* **45**, 352–360 (2015).
10. Chan, A. *et al.* Nitrocobinamide, a new cyanide antidote that can be administered by intramuscular injection. *J. Med. Chem.* **58**, 1750–1759 (2015).
  11. Dereven'kov, I. A. *et al.* Comparative study of reaction of cobalamin and cobinamide with thiocyanate. *J. Inorg. Biochem.* **125**, 32–39 (2013).
  12. Cameron, E., Pauling, L. & Leibovitz, B. Ascorbic Acid and Cancer: A Review. *Cancer Res.* **39**, 663–681 (1979).
  13. Arabi, Y. M., Fowler, R. & Hayden, F. G. Critical care management of adults with community-acquired severe respiratory viral infection. *Intensive Care Med.* **46**, 315–328 (2020).
  14. Bischin, C. *et al.* Free-radical reactions: the fine line between the anti- and pro-oxidant reactivities. *Oxid. Commun.* **41**, 130–140 (2018).
  15. Silaghi-Dumitrescu, R. Redox activation of small molecules at biological metal centers. *Struct. Bond.* **150**, 97–118 (2013).
  16. Zhang, Y. & Gascon, J. A. QM/MM investigation of structure and spectroscopic properties of a vanadium-containing peroxidase. *J. Inorg. Biochem.* **102**, 1684–1690 (2008).
  17. de Visser, S. P., Kumar, D., Neumann, R. & Shaik, S. Computer-generated high-valent iron-oxo and manganese-oxo species with polyoxometalate ligands: how do they compare with the iron-oxo active species of heme enzymes? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**, 5661–5665 (2004).
  18. Hersleth, H. P., Ryde, U., Rydberg, P., Gorbitz, C. H. & Andersson, K. K. Structures of the high-valent metal-ion haem-oxygen intermediates in peroxidases, oxygenases and catalases. *J. Inorg. Biochem.* **100**, 460–476 (2006).
  19. Carrascoza, F., Surducun, M., Eriksson, L. A. & Silaghi-Dumitrescu, R. Interaction of cobalt and iron hydroperoxo bleomycin with deoxyribonucleic acid (DNA): Dynamic vs. electronic structure considerations. *Inorg. Chim. Acta* **509**, 119682 (2020).
  20. Dereven'Kov, I. A. A. *et al.* Comparative study of reaction of cobalamin and cobinamide with thiocyanate. *J. Inorg. Biochem.* **125**, 32–39 (2013).
  21. Lexa, D., Savéant, J. M. & Zickler, J. Electrochemistry of Vitamin B<sub>12</sub>. 5. Cyanocobalamins. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 2654–2663 (1980).
  22. Wolak, M., Stochel, G. & Van Eldik, R. Mechanistic studies on the interaction of reduced

- cobalamin (vitamin B<sub>12r</sub>) with nitroprusside. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1334–1351 (2003).
23. Lehene, M. *et al.* Adduct of Aquacobalamin with Hydrogen Peroxide. *Inorg. Chem.* **60**, 12681–12684 (2021).
  24. Ensing, B., Buda, F., Blochl, P. & Baerends, E. J. Chemical Involvement of Solvent Water Molecules in Elementary Steps of the Fenton Oxidation Reaction. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **40**, 2893–2895 (2001).
  25. Sadrzadeh, S. M., Graf, E., Panter, S. S., Hallaway, P. E. & Eaton, J. W. Hemoglobin. A biological fenton reagent. *J. Biol. Chem.* **259**, 14354–14356 (1984).
  26. Buda, F., Ensing, B., Gribnau, M. C. & Baerends, E. J. DFT study of the active intermediate in the Fenton reaction. *Chemistry (Easton)*. **7**, 2775–2783 (2001).
  27. Sharpe, M. A., Robb, S. J. & Clark, J. B. nitric oxide and Fenton/Haber-Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations. *J. Neurochem.* **87**, 386–394 (2003).
  28. Marcus, S. R. & Dharmalingam, M. Iron, Oxidative Stress and Diabetes. in *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants* (ed. Preedy, V. R.) 51–64 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-405885-9.00006-1.
  29. Nichol, A. W., Hendry, I. & Morell, D. B. Mechanism of formation of sulphhaemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta* **156**, 97–108 (1969).
  30. Oliver, J. & Brittain, T. A comparison between the ease of haemoglobin oxidation and modification by sulphide. *Comp. Biochem. Physiol.* **76B**, 579–583 (1983).
  31. Pietri, R., Roman-Morales, E. & Lopez-Garriga, J. Hydrogen sulfide and heme proteins: knowledge and mysteries. *Antioxid Redox Signal* **15**, 393–404 (2011).
  32. Román-Morales, E. *et al.* Structural determinants for the formation of sulfhemeprotein complexes. *Biochem Biophys Res Commun* **400**, 489–492 (2010).
  33. Ríos-González, B. B., Román-Morales, E. M., Pietri, R. & López-Garriga, J. Hydrogen Sulfide Activation in Hemeproteins: The Sulfheme Scenario. *J Inorg Biochem* **133**, 78–86 (2015).
  34. Makarov, S. V., Horváth, A. K., Silaghi-Dumitrescu, R. & Gao, Q. *Sodium Dithionite, Rongalite and Thiourea Oxides. Sodium Dithionite, Rongalite and Thiourea Oxides: Chemistry and Application* (World Scientific (Europe), 2016). doi:10.1142/q0028.
  35. Rudenco, O. *et al.* Versatility of thiourea dioxide as redox agent in globins: case study with



- myoglobin. *Inorg. Chim. Acta* 121474 (2023) doi:10.1016/J.ICA.2023.121474.
36. Salnikov, D. S., Makarov, S. V. & Koifman, O. I. The radical: versus ionic mechanisms of reduced cobalamin inactivation by tert -butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in aqueous solution. *New J. Chem.* **45**, 535–543 (2021).
  37. Dereven'kov, I. A., Salnikov, D. S., Silaghi-Dumitrescu, R., Makarov, S. V & Koiffman, O. I. Redox chemistry of cobalamin and its derivatives. *Coord. Chem. Rev.* **309**, 68–83 (2016).
  38. Gebicka, L. & Banasiak, E. Hypochlorous acid-induced heme damage of hemoglobin and its inhibition by flavonoids. *Toxicol. Vitr.* **26**, 924–929 (2012).
  39. Silaghi-Dumitrescu, R. Halide activation by heme peroxidases: Theoretical predictions on putative adducts of halides with compound I. *Eur. J. Inorg. Chem.* 5404–5407 (2008) doi:DOI 10.1002/ejic.200800732.
  40. Chiang, R., Rand Meir, T., Makino, R. & Hager, L. P. Compound X. An intermediate in enzymatic halogenation. *J. Biol. Chem.* **251**, 6340–6346 (1976).