

Zinkkomplexe von Aminosäuren und Peptiden, 4^[1]

Zinkkomplexe von Peptiden mit C-terminalem Cystein

Axel Meißner, Peter Gockel und Heinrich Vahrenkamp*

Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Universität Freiburg,
Albertstraße 21, D-79104 Freiburg, Germany

Eingegangen am 24. Februar 1994

Key Words: Cysteine derivatives / Zinc complexes / Solution equilibria

Zinc Complexes of Amino Acids and Peptides, 4^[1]. – Zinc Complexes of Peptides with C-terminal Cysteine

The cysteine derivatives *N*-Ac-Cys, *N*-Ac-Gly-Cys, *N*-Ac-Ala-Cys, and *N*-Ac-Gly-Gly-Cys with unprotected SH and CO₂H functions (LH₂) were prepared by the mixed anhydride method. Their reactions with basic zinc carbonate resulted in the formation of complexes Zn(LH)₂ which were converted by KOH to complexes K₂[ZnL₂]. Potentiometric ti-

trations revealed ZnL and [ZnL₂]²⁻ as the major solution species. By pD-dependent NMR measurements (¹H, ¹³C) in D₂O carboxylate coordination in acidic solution and carboxylate and thiolate coordination in neutral and basic solution was identified.

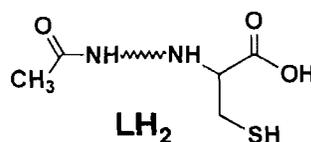
Die Aminosäure Cystein verfügt als Ligand über drei Donorfunktionen, die Thiolat-, die Carboxylat- und die Aminfunktion. Als wichtiger Bindungspartner für Metalle in Proteinen benutzt sie hiervon nur die Thiolatfunktion, da die beiden anderen Funktionen durch die Peptidbindungen blockiert sind. Dieser Zustand läßt sich in Metallkomplexen kurzkettiger Peptide mit innenständigem Cystein nicht reproduzieren, da sich solche Peptide wie einfache organische Thiole verhalten und mit den Metall-Ionen thiolatverbrückte oligomere Spezies bilden^[2-4]. Für die Koordinationschemie einfacher cysteinhaltiger Peptide ist es daher von Vorteil, sich Chelateffekte zunutze zu machen, die möglich werden, wenn das Cystein in der Peptidkette endständig ist.

Bei unseren Untersuchungen zur Aminosäure- und Peptid-Koordinationschemie des Zinks, deren Motive in den vorausgehenden Arbeiten geschildert sind^[1,5], haben wir die Chelatisierungseigenschaften des Cysteins zunächst quantitativ untersucht. Dabei ergab sich, daß die *S,N*-Chelate (Cystein-ethylester) weit stabiler sind als die *S,O*-Chelate (*N*-Acetylcystein) und diese wiederum deutlich stabiler als die *N,O*-Chelate (*S*-Methylcystein)^[6]. Diese Beobachtungen wurden durch die leichte Gewinnung der Zinkkomplexe von Peptiden mit N-terminalem Cystein (*S,N*-Chelate) verifiziert^[1]. In der vorliegenden Arbeit wird nun beschrieben, welche Informationen wir zur *S,O*-Chelatbildung durch Peptide mit C-terminalem Cystein gewinnen konnten.

Materialien und Produkte

Die als Liganden eingesetzten Peptide lassen sich alle durch die Formel LH₂ ausdrücken. In der ungeschützten Form sind sie zweibasige Säuren. Deren zuerst erfolgende Deprotonierung an der Carboxylfunktion erzeugt die Liganden LH⁻, die anschließende Deprotonierung an der Thiolfunktion die Liganden L²⁻. In allen Fällen wurde der N-Terminus der Peptide durch Acetylierung blockiert. Syntheti-

siert und für die Komplexbildung eingesetzt wurden der Cystein-Grundkörper **1a**, die beiden Dipeptide **1b** und **1c** und das Tripeptid **1d**.

LH₂ = NAc – X – Cys

X	-	Gly	Ala	GlyGly
1	a	b	c	d

Als Cysteinbaustein für die Peptidsynthesen wurde L-Cystein eingesetzt, das zunächst in Form des *tert*-Butylesters an den Carboxylatfunktionen geschützt wurde. Kupplungskomponenten waren die *N*-acetylierten Aminosäuren Glycin und Alanin sowie das *N*-acetylierte Dipeptid Glycylglycin. Gekuppelt wurde nach der Methode der gemischten Anhydride^[7] mit Hilfe von Chlorameisensäure-isobutylester und *N*-Methylmorpholin als Hilfsbase in organischen Lösungsmitteln. Zur Gewinnung der ungeschützten Peptide wurde zunächst die Estergruppe durch Säure gespalten. In der letzten Stufe wurde dann unter Luftausschluß die Disulfidbrücke mit Dithioerythrit^[8] zerlegt. Die reinen Peptide wurden aus Trifluoressigsäure isoliert und durch Reversed-Phase-HPLC gereinigt. Die Ausbeuten über alle Schritte lagen bei 25–50%. Die Identität der Zwischenstufen wurde durch NMR-Spektroskopie überprüft, die der ungeschützten Peptide **1b–d** auch durch Elementaranalysen.

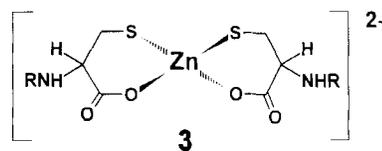
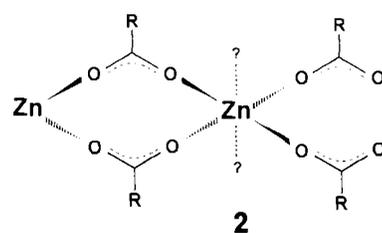
Im Exp. Teil sind die IR- und ¹H-NMR-Daten der deblockierten LH₂-Verbindungen **1a–d** wiedergegeben. Die Daten der Zwischenstufen der Peptidsynthesen sind weitgehend ähnlich. Charakteristisch in den ¹H-NMR-Spektren der *tert*-Butyl-geschützten Cystinderivate sind die *t*Bu-Signale (und als Reinheitskriterium das *t*Bu/NAc-Intensitätsverhältnis), in den IR-Spektren die Amidbanden bei ca. 1660/1530 sowie die der Esterfunktion zugehörigen Banden bei ca. 1730 und 1250 cm⁻¹. Bei den an der Carboxylatfunktion ungeschütz-

ten Cystinderivaten ist das wesentliche $^1\text{H-NMR}$ -Charakteristikum der deutliche Signalabstand der beiden Signale (ca. 0.3 ppm) für die SCH_2 -Gruppen, der für die entsprechenden Cysteinderivate auf weniger als 0.05 ppm schrumpft. Das Fehlen der niederfrequenten Esterbande zeichnet ihre IR-Spektren aus, während sich die andere Carboxylschwingungsbande bei ca. 1725 cm^{-1} zeigt und die Amidbanden praktisch unverändert vorliegen. Letzteres gilt auch für die IR-Spektren der freien Peptide **1**. Hier ist jetzt die SH-Bande bei ca. 2565 cm^{-1} charakteristisch. Da die Peptidderivate in der Carbonsäureform nur in protischen Lösungsmitteln ausreichend löslich sind, war es wegen des H/D-Austauschs nicht möglich, $^1\text{H-NMR}$ -Signale für die CO_2H -, SH- und NH-Funktionen zu lokalisieren.

Zur präparativen Gewinnung von Zinkverbindungen der Peptide **1** wurden diese als Säure zur Auflösung von basischem Zinkcarbonat [$2\text{ ZnCO}_3 \cdot 3\text{ Zn(OH)}_2$] eingesetzt. Auf diese Weise konnte vermieden werden, daß mit dem Zinksalz Anionen eingebracht werden, die mit den Sauerstoff-Donorfunktionen des Peptids um das Zink-Ion konkurrieren können. Zu isolierbaren Verbindungen kam man mit diesem Verfahren bei einem Zink/Ligand-Verhältnis von 1:2. Umsetzungen in wäßriger Lösung erbrachten die Neutralverbindungen **2a–c**. Diese sind aus Wasser nicht kristallisierbar, dagegen auch in sehr polaren organischen Lösungsmitteln recht schwer löslich. Wurden die aus **1a–d** und basischem Zinkcarbonat erhaltenen wäßrigen Lösungen mit KOH auf einen pH-Wert von 8.5 eingestellt, so ließen sich danach durch Fällung mit Aceton die Komplexverbindungen **3a–d** erhalten. Auch diese sind in Wasser sehr gut und sonst sehr wenig löslich. Dieses unvorteilhafte Löslichkeitsverhalten verhinderte die Gewinnung von röntgentauglichen Einkristallen der Verbindungen **2** oder **3**.

Zn(LH)_2 2a–c	$\text{K}_2[\text{ZnL}_2]$ 3a–d			
X in $\text{LH}_2 = \text{NAc-X-Cys}$	–	Gly	Ala	GlyGly
2 bzw. 3	a	b	c	d

Zink-Peptid-Komplexe dieses Typs wurden bisher nicht isoliert. Auch Zinkderivate des *N*-Acetylcysteins sind bisher nur in der Patentliteratur^[9] beschrieben. Zu ihrer Konstitutionsermittlung wurden die unten beschriebenen Lösungsstudien und die IR-Daten (KBr) herangezogen. Diese zeigen für **2a–c** eine SH-Bande bei ca. 2450 cm^{-1} und belegen mithin, daß die anionische Natur der Ligandspezies LH^- in der deprotonierten Carboxylatgruppe lokalisiert ist. Das Fehlen einer SH-Bande für **3a–d** bestätigt, daß hier die CO_2H - und die SH-Funktion deprotoniert sind. Die Schwingungsbanden für die Carboxylatgruppen finden sich für **2a–c** bei ca. 1730 und 1430 cm^{-1} . Ihre Lage und ihr großer Abstand von 300 cm^{-1} sind nach Erfahrungswerten^[10,11] so zu interpretieren, daß die Carboxylatgruppen als zweizählige verbrückende Liganden vorliegen. Für die Komplexe **3a–d** finden sich die entsprechenden CO-Schwingungsbanden bei ca. 1650 und 1430 cm^{-1} . Hier muß analog zu Lit.^[11] geschlossen werden, daß die Carboxylatgruppen einzählige koordiniert sind. Für den festen Zustand sind damit die Koordinations-



verhältnisse wahrscheinlich so, wie sie durch die Formelbilder **2** und **3** wiedergegeben werden.

Für die Verbindungen **2** soll das Formelbild die Möglichkeit fünf- oder sechsfacher Koordination des Zinks im festen Zustand andeuten. Eine tetraedrische Koordination mit vier Sauerstoff-Donoren ist für das Zink-Ion untypisch^[12]. Es liegt deshalb nahe, daß weitere N- oder O-Atome der Peptidliganden an das Zink gebunden sind. Die Lösungsmethoden (s.u.) lassen hierzu keine Aussage zu, da in verdünnter Lösung (Potentiometrie) die Zn(LH)_2 -Spezies praktisch nicht vorkommen und in konzentrierter Lösung (NMR) sich die bei pH 3–4 vorkommenden Spezies nicht deutlich genug von den bei pH 8–9 vorkommenden Spezies $[\text{ZnL}_2]^{2-}$ unterscheiden. Für letztere jedoch legen die Feststoff-Messungen (IR) und die Lösungsmessungen (Potentiometrie) konsistent die angegebene tetraedrische ZnS_2O_2 -Koordination fest.

Lösungsstudien

Da die mangelnde Kristallisationsneigung der Zinkverbindungen eine Festkörper-Strukturanalyse unmöglich machte, wurde auf Lösungsmethoden zurückgegriffen, um weiteren Aufschluß über ihre Zusammensetzung und Konstitution zu gewinnen. Als Methoden, die eine Speziesermittlung über den ganzen pH-Bereich zulassen, wurden die potentiometrische Titration und die pH-variable NMR-Vermessung wäßriger Lösungen eingesetzt. Erstere haben wir für die Zinkkomplexe des *N*-Acetylcysteins (**1a**) schon angewendet^[6], letztere hatte uns Aufschluß über die Speziesverteilung bei Zinkkomplexen des *N*-Acetylhistidins gegeben^[5].

Aus den potentiometrischen Messungen ergab sich jetzt, daß die Peptide **1b–d** ein sehr ähnliches Säure-Base- und Koordinationsverhalten zeigen wie ihr Grundkörper **1a**^[6]. In Tab. 1 sind die ermittelten Gleichgewichtskonstanten aufgeführt. Alle vier Cysteinderivate haben praktisch dieselben Dissoziationskonstanten von ca. 3.0 für die Carbonsäure- und ca. 9.6 für die Thiofunktion. Auch die je drei Komplexstabilitätskonstanten ($\lg \beta$) von durchschnittlich 5.4 für ZnL und 11.3 für ZnL_2^{2-} liegen so nahe beieinander, daß eine separate Diskussion nicht nötig ist. Die große Verwandtschaft von **1a–d** belegt gleichzeitig, daß in allen Fällen nur der Cysteinbaustein als Komplexligand wirkt.

Abb. 1 zeigt als charakteristisches Beispiel die Speziesverteilung in Lösungen von **1d**. Unterhalb von pH = 4–5 sind

in Lösung keine Komplexe nachweisbar, obwohl hier die Carbonsäurefunktionen der Peptide schon deprotoniert sind. Dies hängt damit zusammen, daß Zink-Carboxylatkomplexe einschließlich derer von einfachen Aminosäuren nur eine geringe Stabilität besitzen^[13,14] und daher bei den zur Potentiometrie verwendeten Konzentrationen weitgehend dissoziiert sind. Die Peptidderivate **1a–d** erweisen sich deshalb unter diesen Bedingungen erst bei $\text{pH} > 5$ als Liganden. Die zunächst dominierende Lösungsspezies ist der Monoligandkomplex ZnL , der der Koordination einer Peptideinheit über Carboxylat- und Thiolatfunktion entspricht. Dies ist in zweierlei Hinsicht bemerkenswert. Einmal ist die Spezies ZnL nicht mit den bei $\text{pH} = 4$ isolierten Verbindungen $\text{Zn}(\text{LH})_2$ (**2**) identisch, in denen die Thiol-Einheit nicht koordiniert ist. Zum anderen bedeutet die Thiolatkoordination bei $\text{pH} = 5–6$ eine Deprotonierung der Thiolatfunktion um ca. 4 pH-Einheiten unterhalb ihres Äquivalenzpunktes ($\text{p}K_s \approx 9.6$).

Tab. 1. Thermodynamische Daten zur Acidität der Peptide **1** und zur Stabilität ihrer Komplexe

	$\text{H}_2\text{L} = \mathbf{1a}$ NAC-Cys	$\text{H}_2\text{L} = \mathbf{1b}$ NAC-Gly-Cys	$\text{H}_2\text{L} = \mathbf{1c}$ NAC-Ala-Cys	$\text{H}_2\text{L} = \mathbf{1d}$ NAC-Gly-Gly-Cys
$\text{p}K_{a1}(\text{H}_2\text{L})$	3.08(2)	2.95(8)	3.16(6)	2.94(6)
$\text{p}K_{a2}(\text{HL}^-)$	9.62(2)	9.62(8)	9.74(5)	9.47(6)
$\log \beta(\text{ZnL})$	4.90(13)	5.67(6)	5.89(13)	5.12(7)
$\log \beta(\text{ZnL}_2^{2-})$	11.48(2)	10.90(9)	11.65(5)	11.23(5)
$\log \beta(\text{ZnL}_2\text{H}^-)$	18.39(4)	---	18.68(4)	18.03(10) ^{a)}
$\log \beta(\text{ZnLOH}^-)$	2.71(3)	-2.39(8)	---	-2.17(10)

^{a)} Spezies nur bei $\text{Zn:L} = 1:4$ detektierbar.

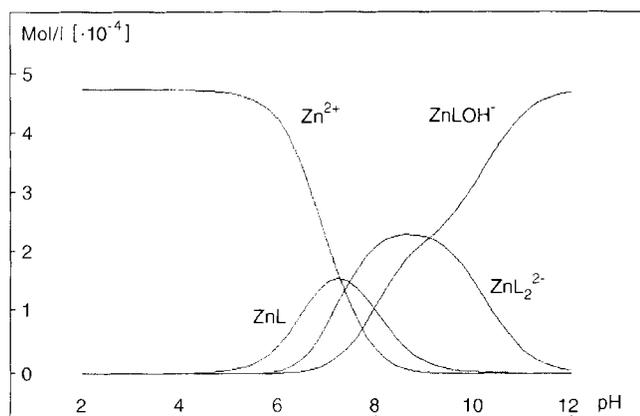


Abb. 1. Speziesverteilung in Lösung von *N*-Ac-Gly-Gly-Cys/ $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (1:1)

Erst bei $\text{pH} = 7–10$ zeigen die potentiometrischen Messungen die Bildung der Komplexe $[\text{ZnL}_2]^{2-}$, die auch bei diesen pH-Werten aus der Lösung als Kaliumsalze isolierbar sind (s.o.). Erneut drängt sich hier aber mit steigendem pH eine Spezies in den Vordergrund, die nicht isolierbar ist.

Diese ab $\text{pH} = 11$ praktisch allein vorliegende Spezies ZnLOH^- resultiert wohl aus der Deprotonierung eines Wassermoleküls in der Ligandensphäre von ZnL . Der Vergleich der präparativen und potentiometrischen Ergebnisse erinnert also nachdrücklich daran, wie wenig man bei dieser Art von Komplexchemie aus der Isolierung und Strukturanalyse von Substanzen über die Verhältnisse in Lösung erfährt.

Weitere Hinweise über das Verhalten der beteiligten Spezies in Lösung ergaben sich aus der pH (genauer pD)-variablen NMR-Spektroskopie. Hierzu wurden die Substanzen in D_2O gelöst und der pD-Wert mit $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$ und NaOD auf Werte zwischen 1 und 11 eingestellt. Dieses Verfahren hat sich z.B. bei der Untersuchung von Glutathion (Glu-Cys-Gly) und seinen Metallkomplexen bewährt^[15] und wird von uns regelmäßig zur Untersuchung der Zinkkomplexe von wasserlöslichen Peptiden eingesetzt. Hier wurden der Grundkörper **1a** und sein Alaninderivat **1c** allein und in Gegenwart eines halben Moläquivalents $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ vermessen. Die dabei beobachteten ^1H -NMR-Effekte waren nicht signifikant genug, um sie zu diskutieren: Die Signallagen der Acetylgruppe und der Alanylprotonen zeigten keinen pH-Effekt, und das SCH_2 -Signal wanderte von pH 2 bis pH 11 um 0.15 ppm zu höherem Feld. Allein das Signal für das der Carboxylatgruppe benachbarte C_α -H-Atom wanderte um 0.6 ppm zu höherem Feld. Diese Variation war jedoch praktisch linear. Alle auf die Gegenwart der Zink-Ionen zurückzuführenden Signalverschiebungen betragen stets weniger als 0.1 ppm. Mithin waren die beiden Deprotonierungen von LH_2 und die Koordination der Donorgruppen an das Zink ^1H -NMR-spektroskopisch nicht auszumachen.

Aussagestärker waren die ^{13}C -NMR-Verschiebungen in den Meßserien von **1a** und **c**, die in Abb. 2 für *N*-Acetylalanyl-cystein dargestellt sind. Man erkennt deutlich, daß beide Signale der Acetylgruppe in ihrer Lage nicht pH-abhängig sind. Gleiches gilt für alle Signale des Alanin-Bausteins. Die pH-Effekte sind damit allein auf den Cystein-Baustein beschränkt, der ja zweimal deprotoniert wird. Für das freie *N*-Acetylalanyl-cystein zeigt das Carboxylat-signal die Deprotonierung um $\text{pH} = 3$ durch eine Verschiebung um 3 ppm an. Das C_β -Signal und weniger deutlich das C_α -Signal ziehen mit kleineren ppm-Sprüngen mit. Auf die SH-Deprotonierung ab $\text{pH} = 9$ spricht erstaunlicherweise das Signal des benachbarten C_β -Atoms weniger an als die C_α - und $\text{C}_{\text{Carboxyl}}$ -Signale. Das Säure-Base-Verhalten von **1a** (LH_2) wird so ^{13}C -NMR-spektroskopisch recht genau erfaßt.

Die Gegenwart von Zink-Ionen ruft charakteristische Veränderungen der ^{13}C -NMR-Spektren hervor. Deren wichtigste ist eine Koordinationsverschiebung von 1–2 ppm zu tieferem Feld für die Cystein-Signale $\text{C}_{\text{Carboxyl}}$ und C_β , die in geringerem Maße auch bei C_α auftritt. Diese Verschiebung setzt mit der Deprotonierung ab $\text{pH} = 2.5$ ein und ist bei $\text{pH} = 4.5$ voll ausgeprägt. Sie kann nur so interpretiert werden, daß in Lösung Zinkkomplexe vorliegen. Daß diese nur hier, aber mit der Potentiometrie nicht beobachtbar sind, muß mit den Konzentrationen der Spezies in Lösung erklärt werden, die beim NMR-Experiment um 3 Zehnerpotenzen höher sind als bei der elektrochemischen Messung. Umgekehrt zeigen die NMR-Messungen im pH-Bereich von 5–8 keine deutlichen

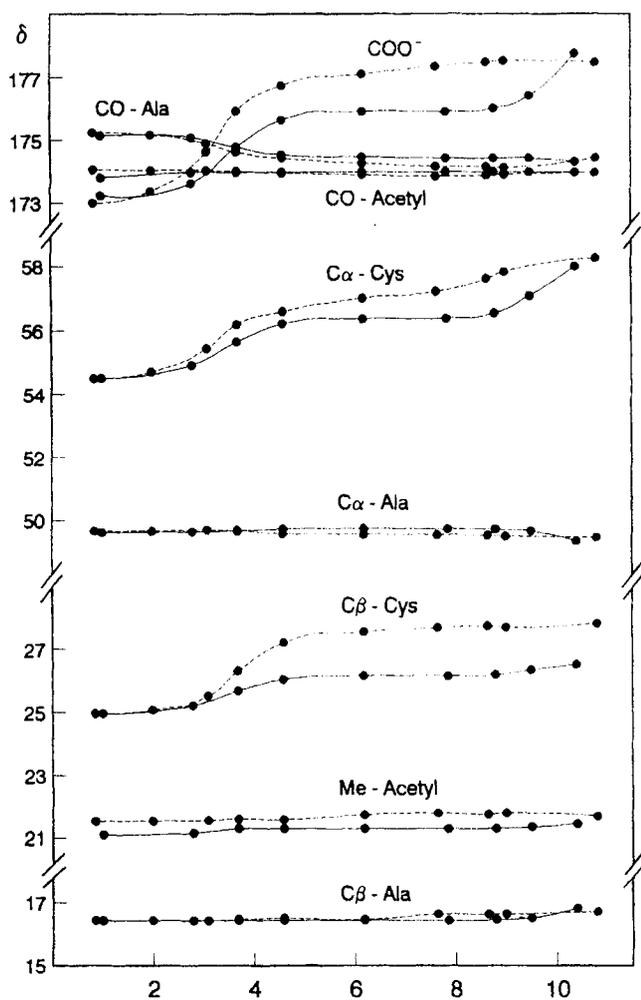


Abb. 2. pH-Abhängigkeit der ^{13}C -NMR-Signallagen von *N*-Ac-Ala-Cys in D_2O . Ausgezogene Linien: freies Peptid. Gestrichelte Linien: in Gegenwart von 0.5 Äquivalenten $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$

Signalverschiebungen. Der einzige Hinweis auf die hier auftretenden Spezies besteht in starken Signalverbreitungen für $\text{C}_{\text{Carboxyl}}$ und C_β , was auf Austauschphänomene zwischen den verschiedenen Komplexen in Lösung (s.o.) schließen läßt. Im höheren pH-Bereich verändern sich die Signallagen für die zinkhaltigen Lösungen kaum noch, was bedeutet, daß die beobachteten Koordinationsverschiebungen deutlich absinken. Das ist zu erwarten, denn eine SH-Deprotonierung findet in diesen Lösungen ja weit unterhalb von $\text{pH} = 9$ statt.

Die ^{13}C -NMR-Daten sind damit komplementär zu den potentiometrischen Daten, indem sie im Gegensatz zu diesen nur die Carboxylat-Koordination eindeutig ausweisen. Warum die Thiolatkoordination unentdeckt bleibt, ist schwer zu erklären. Möglicherweise liegt in den Zinkderivaten der ersten Deprotonierungsstufe (LH^-) eine $\text{S}-\text{H}\cdots\text{O}$ -Wasserstoffbrücke vor, die bezüglich ihrer NMR-Effekte dem $\text{S}-\text{Zn}-\text{O}$ -Chelatkomplex ähnelt, der im mittleren pH-Bereich aus ihr hervorgeht.

Die Vergleichbarkeit der aus den potentiometrischen und den NMR-Titrations erhältlichen Informationen wird durch Abb. 3 noch einmal verdeutlicht, in der die Meßeffekte für *N*-Acetylcystein als relative Größen gegen den pH-Wert

aufgetragen sind. Man erkennt für den reinen Liganden, wie beide Methoden zwei Dissoziationsstufen bei $\text{pH} \approx 3$ und ≈ 10 sichtbar machen. In Gegenwart der Zink-Ionen zeigt die potentiometrische Kurve deutlich nur die pH-Depression für die SH-Gruppe infolge der Komplexbildung. Das NMR-Experiment spricht dagegen am deutlichsten auf die Carboxylat-Koordination an. Durch die Auftragung der Shift-Differenzen werden aber auch die Effekte durch die Thiolatkoordination sichtbar.

Insgesamt haben für das untersuchte Reaktionssystem die drei Arten der Untersuchung (Isolierung von Feststoffen,

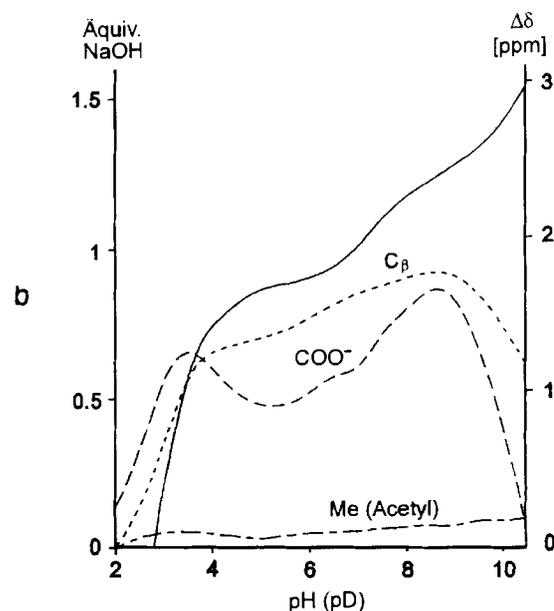
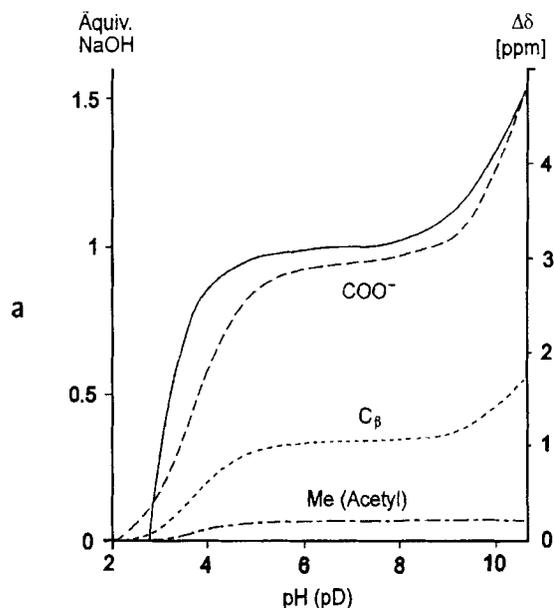


Abb. 3. Vergleich der pH-abhängigen potentiometrischen und NMR-Effekte bei *N*-Acetylcystein (1a). Ausgezogene Linien (Ordinaten links): Titrationskurven. Gestrichelte Linien (Ordinaten rechts): ^{13}C -NMR-Verschiebungen. In Abb. 3a sind die $\Delta\delta$ -Werte für den freien Liganden relativ zu ihrem jeweiligen Ausgangswert bei $\text{pD} = 2$ aufgetragen. Abb. 3b zeigt als $\Delta\delta$ -Werte die Koordinationsverschiebungen, d.h. die durch die Zink-Ionen hervorgerufenen Shift-Differenzen beim jeweiligen pD -Wert

Tab. 2. Darstellung der geschützten Peptide

Peptid ^{a)}	Säurekomponente g (mmol)	Aminokomponente ^{b)} g (mmol)	Ausb. g (%)
1b	<i>N</i> -Ac-GlyOH 0.57 (5.0)	Cystin 1.06 (2.5)	0.90 (65)
2b	<i>N</i> -Ac-Ala-OH 0.79 (6.0)	Cystin 1.28 (3.0)	1.18 (85)
3b	<i>N</i> -Ac-Gly-Gly- OH 0.96 (5.5)	Cystin 1.17 (2.8)	1.04 (56)

^{a)} In der S-S-verknüpften Form als *L*-Cystin-di-*tert*-butylester. –

^{b)} *L*-Cystin-di-*tert*-butylester-dihydrochlorid.

elektrochemische Vermessung sehr verdünnter und NMR-Spektroskopie recht konzentrierter Lösungen) zu drei verschiedenen Antworten bezüglich der Identität der betroffenen Spezies geführt. Unsere weiteren Studien müssen klären,

inwieweit dies für Zink-Peptid-Komplexe charakteristisch ist.

Diese Arbeit wurde von der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und vom *Fonds der chemischen Industrie* unterstützt. Wir danken Prof. A. Zuberbühler, Basel, für die Überlassung seiner Software für die potentiometrische Titration.

Experimenteller Teil

Alle Untersuchungen wurden in frisch destillierten Lösungsmitteln durchgeführt; bei Auftreten von freien Cystein-SH-Funktionen wurde unter Stickstoff gearbeitet. Die Zinksalze, *N*-Acetylcystein, Cystin und die Kupplungskomponenten *N*-Acetylglycin, *N*-Acetylalanin und *N*-Acetylglycylglycin sind käuflich. Alle Komponenten waren Derivate der reinen *L*-Aminosäuren. Die Meß- und Trenntechniken waren wir beschrieben^[1]. Die NMR-Daten der neuen Produkte sind in Tab. 3 und 4, ihre Analysendaten in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 3. ¹H-NMR-Daten der Peptide und Zinkkomplexe (in D₂O, δ-Werte)

1a	2.06(s, CH ₃ Ac, 3H); 2.93(dd, J ₂ =5.9Hz, J ₃ =14.2Hz, C _β Hb, Cys, 1H); 3.01(dd, J ₁ =5.3Hz, J ₃ =14.2Hz, C _β HaCys, 1H); 4.62(dd, J ₁ =5.3Hz, J ₂ =5.9Hz, C _α HCys, 1H).
1b	2.08(s, CH ₃ Ac, 3H); 2.98(dd, J ₁ =5.9Hz, J ₃ =15.9Hz, C _β HbCys, 1H); 3.05(dd, J ₂ =5.5Hz, J ₃ =15.9Hz, C _β HaCys, 1H); 3.99(s, C _α HGly, 2H); 4.69(dd, J ₁ =5.9Hz, J ₂ =5.5Hz, C _α HCys, 1H).
1c	1.40(d, J ₃ =7.2Hz, C _β H ₃ A1a, 3H); 2.03(s, CH ₃ Ac, 3H); 2.98(dd, J ₁ =6.2Hz, J ₄ =14.5Hz, C _β HbCys, 1H); 3.05(dd, J ₂ =5.2Hz, J ₄ =14.5Hz, C _β HaCys, 1H); 4.35(q, J ₃ =7.3Hz, C _α HA1a, 1H); 4.65(dd, J ₁ =6.1Hz, J ₂ =5.3Hz, C _α HCys, 1H).
1d	2.08(s, CH ₃ Ac, 3H); 3.01(dd, J ₁ =6.3Hz, J ₃ =14.2Hz, C _β HbCys, 1H); 3.06(dd, J ₂ =5.2Hz, J ₃ =14.2Hz, C _β HaCys, 1H); 3.97(s, C _α HGly ₂ , 2H); 4.02(s, C _α HGly ₁ , 2H); 4.68(dd, J ₁ =6.3Hz, J ₂ =5.2Hz, C _α HCys, 1H).
2a	2.04(s, CH ₃ Ac, 3H); 2.95(d, J ₁ =5.4Hz, C _β HCys, 2H); 4.38(t, J ₁ =5.4Hz, C _α HCys, 1H).
2b	2.03(s, CH ₃ Ac, 3H); 2.92(d, J ₁ =5.5Hz, C _β HCys, 2H); 3.92(s, C _α HGly, 2H); 4.43(t, J ₁ =5.4Hz, C _α HCys, 1H).
2c	1.37(d, J ₂ =7.1Hz, C _β HA1a, 3H); 2.01(s, CH ₃ Ac, 3H); 2.91(d, J ₁ =5.5Hz, C _β HCys, 2H); 4.32(q, J ₂ =7.1Hz, C _α HA1a, 1H); 4.36(t, J ₁ =5.5Hz, C _α HCys, 1H).
3a	2.03(s, CH ₃ Ac, 3H); 2.89(mc; C _β HCys, 2H); 4.19(t, J ₁ =4.4Hz, C _α HCys, 1H).
3b	2.02(s, CH ₃ Ac, 3H); 2.96(d, J ₁ =5.4Hz, C _β HCys, 2H); 3.95(s, C _α HGly, 2H); 4.35(t, J ₁ =5.5Hz, C _α HCys, 1H).
3c	1.38(d, J ₂ =7.2Hz, C _β HA1a, 3H); 2.01(s, CH ₃ Ac, 3H); 2.89(d, J ₁ =6.5Hz, C _β HCys, 2H); 4.23(t, J ₁ =6.5Hz, C _α HCys, 1H); 4.36(q, J ₂ =7.2Hz, C _α HA1a, 1H).
3d	2.03(s, CH ₃ Ac, 3H); 2.97(d, J ₁ =5.5Hz, C _β HCys, 2H); 3.93(s, C _α HGly ₂ , 2H); 3.98(s, C _α HGly ₁ , 2H); 4.36(t, J ₁ =5.4Hz, C _α HCys, 1H).

Tab. 4. ^{13}C -NMR-Daten der Peptide und Zinkkomplexe (in D_2O , δ -Werte)

1a	21.67(CH_3, Ac); 25.14($\text{C}_\beta, \text{Cys}$); 54.64($\text{C}_\alpha, \text{Cys}$); 173.39(CO, Cys); 174.13(CO, Ac).
1b	21.56(CH_3, Ac); 25.00($\text{C}_\beta, \text{Cys}$); 42.34($\text{C}_\alpha, \text{Gly}$); 54.45($\text{C}_\alpha, \text{Cys}$); 171.44(CO, Gly); 173.06(CO, Cys); 174.76(CO, Ac).
1c	16.41(CH_3, Ala); 21.08(CH_3, Ac); 25.21($\text{C}_\beta, \text{Cys}$); 49.64($\text{C}_\alpha, \text{Ala}$); 54.51($\text{C}_\alpha, \text{Cys}$); 173.23(CO, Cys); 173.97(CO, Ac); 174.76(CO, Ala).
1d	21.67(CH_3, Ac); 25.02($\text{C}_\beta, \text{Cys}$); 42.22($\text{C}_\alpha, \text{Gly1}$); 42.55($\text{C}_\alpha, \text{Gly2}$); 54.54($\text{C}_\alpha, \text{Cys}$); 171.22($\text{CO}, \text{Gly1}$); 172.21($\text{CO}, \text{Gly2}$); 173.00(CO, Cys); 174.91(CO, Ac).
2a	21.84(CH_3, Ac); 26.72($\text{C}_\beta, \text{Cys}$); 56.01($\text{C}_\alpha, \text{Cys}$); 173.71(CO, Ac); 175.88(CO, Cys).
2b	21.65(CH_3, Ac); 26.41($\text{C}_\beta, \text{Cys}$); 42.50($\text{C}_\alpha, \text{Gly}$); 56.01($\text{C}_\alpha, \text{Cys}$); 170.93(CO, Gly); 174.76(CO, Ac); 175.87(CO, Cys).
2c	16.45(CH_3, Ala); 21.56(CH_3, Ac); 26.30($\text{C}_\beta, \text{Cys}$); 49.72($\text{C}_\alpha, \text{Ala}$); 56.20($\text{C}_\alpha, \text{Cys}$); 174.03(CO, Ac); 174.89(CO, Ala); 175.92(CO, Cys).
3a	22.02(CH_3, Ac); 27.98($\text{C}_\beta, \text{Cys}$); 58.25($\text{C}_\alpha, \text{Cys}$); 173.52(CO, Ac); 177.97(CO, Cys).
3b	21.82(CH_3, Ac); 28.30($\text{C}_\beta, \text{Cys}$); 42.52($\text{C}_\alpha, \text{Gly}$); 56.86($\text{C}_\alpha, \text{Cys}$); 170.64(CO, Gly); 174.65(CO, Ac); 177.20(CO, Cys).
3c	16.62(CH_3, Ala); 21.76(CH_3, Ac); 27.70($\text{C}_\beta, \text{Cys}$); 49.51($\text{C}_\alpha, \text{Ala}$); 57.82($\text{C}_\alpha, \text{Cys}$); 173.88(CO, Ac); 174.04(CO, Ala); 177.47(CO, Cys).
3d	21.96(CH_3, Ac); 27.89($\text{C}_\beta, \text{Cys}$); 42.44($\text{C}_\alpha, \text{Gly1}$); 42.79($\text{C}_\alpha, \text{Gly2}$); 57.03($\text{C}_\alpha, \text{Cys}$); 170.53($\text{CO}, \text{Gly1}$); 170.94($\text{CO}, \text{Gly2}$); 174.84(CO, Ac); 177.22(CO, Cys).

Tab. 5. Charakterisierung der Peptide und Zinkkomplexe

	Summenformel (Molmasse)		Analyse			Zn
			C	H	N	
1c · H ₂ O	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₄ S (252.3)	Ber.	38.05	6.34	11.10	–
		Gef.	38.39	6.02	11.56	–
1d · H ₂ O	C ₉ H ₁₇ N ₃ O ₆ S (295.3)	Ber.	36.60	5.80	14.23	–
		Gef.	36.94	5.14	13.54	–
2a · H ₂ O	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₇ S ₂ Zn (407.8)	Ber.	29.45	4.45	6.87	16.03
		Gef.	29.39	4.32	6.73	16.15
2b	C ₁₄ H ₂₂ N ₄ O ₈ S ₂ Zn (503.8)	Ber.	33.37	4.36	11.12	12.98
		Gef.	32.53	4.24	11.10	13.12
2c · H ₂ O	C ₁₆ H ₂₈ N ₄ O ₉ S ₂ Zn (549.6)	Ber.	34.93	5.09	10.19	11.90
		Gef.	34.76	4.97	10.13	12.10
3a · 3 H ₂ O	C ₁₀ H ₂₀ K ₂ N ₂ O ₉ S ₂ Zn (520.1)	Ber.	23.10	3.88	5.39	12.57
		Gef.	23.40	3.72	5.42	12.46
3b · 2 H ₂ O	C ₁₄ H ₂₄ K ₂ N ₄ O ₁₀ S ₂ Zn (616.1)	Ber.	27.29	3.93	9.10	10.61
		Gef.	27.54	3.74	9.25	10.42
3c · 2 H ₂ O	C ₁₆ H ₂₈ K ₂ N ₄ O ₁₀ S ₂ Zn (644.1)	Ber.	29.81	4.35	8.69	10.15
		Gef.	29.96	4.43	8.64	10.42

L-Cystin-di-*tert*-butylester-dihydrochlorid: 1.92 g (8.00 mmol) *L*-Cystin wurden in 3.11 ml (35.0 mmol) Trifluormethansulfonsäure gelöst. Die entstandene violette Lösung wurde mit 50 ml Essigsäure-*tert*-butylester versetzt und 3 d bei Raumtemp. gerührt. Die erhaltene graue Suspension wurde mit 80 ml 1 M NaHCO₃-Lösung neutrali-

siert. Dabei wurde zuerst eine klare Lösung erhalten, aus der in der Kälte ein farblos Niederschlag ausfiel. Nach vollständiger Fällung während ca. 12 h bei +4°C wurde das Produkt abgesaugt, in Ether aufgenommen und die Lösung zweimal mit je 10 ml einer 1 M NaHCO₃-Lösung und zweimal mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen mit Na₂SO₄ wurde der Ether i. Vak. entfernt. Das erhaltene braune Öl wurde in 100 ml wasserfreiem Ether gelöst und in die klare Lösung HCl-Gas eingeleitet. Der entstandene farblose Niederschlag wurde abgesaugt, mit Ether gewaschen und i. Vak. getrocknet, wobei 1.39 g (41%) des Produkts^[16] vom Schmp. 208–209°C anfielen.

Darstellung der geschützten Peptide (Details s. Tab. 2): Eine Lösung von ca. 5 mmol der Säurekomponente (*N*-Acetylaminosäure) in 40 ml wasserfreiem THF wurde im Kältebad (Eis/Kochsalz-Mischung) bei < –12°C mit 0.55 ml (0.51 g, 5.0 mmol) *N*-Methylmorpholin versetzt. Nach 15 min wurde eine äquivalente Menge, z.B. 0.65 ml (0.68 g, 5.0 mmol), Chlorameisensäure-isobutylester zugegeben. Gleichzeitig wurde eine Suspension von ca. 2.5 mmol Cystin-di-*tert*-butylester-dihydrochlorid in 40 ml wasserfreiem THF im Kältebad bei < –12°C mit einer äquivalenten Menge, z.B. 0.55 ml (0.51 g, 5.0 mmol), *N*-Methylmorpholin versetzt. Nach 30 min wurde die Lösung der Aminokomponente zu der Lösung der aktivierten Säurekomponente gegeben und in der Kälte wurde 4 h und anschließend bei Raumtemp. ca. 12 h gerührt. Dann wurde i. Vak. bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde durch Zugabe von 100 ml Essigester und 10 ml Wasser aufgenommen. Die wäßrige Phase wurde ab-

getrennt, und die Essigesterphase wurde viermal mit je 10 ml 5proz. Essigsäure-Natriumacetat-Puffer (pH 4), dreimal mit je 10 ml Wasser, viermal mit je 10 ml 5proz. NaHCO₃-Lösung und viermal mit je 10 ml Wasser gewaschen. Die Essigesterphase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. bis zur Trockne eingengt. Zum Entfernen von anhaftendem Essigester wurden die Produkte mehrfach in CHCl₃ aufgenommen und die Lösungen i. Vak. wieder bis zur Trockne eingengt. Die Produkte fielen als farblose Schäume an, deren Reinheit durch ¹H-NMR-Spektroskopie sichergestellt wurde.

Abspaltung der tert-Butylester-Schutzgruppe: Jeweils 1–3 mmol der zuvor beschriebenen geschützten Peptide wurden in 3–5 ml wasserfreier Trifluoressigsäure gelöst. Nach 30 min wurde die braune klare Lösung mit 3 Tropfen bidest. Wasser versetzt. Nach weiteren 30 min wurde i. Vak. bis zur Trockne eingengt, in 30 ml Wasser aufgenommen und filtriert. Aus dem Filtrat wurden durch Gefriertrocknen die Peptide **1b–d** in Form ihrer S–S-verknüpften Cystinderivate als farblose hygroskopische Pulver erhalten, die sich bei ca. 200°C zersetzen und deren Reinheit ¹H-NMR-spektroskopisch sichergestellt wurde.

Für **1b** entstanden so aus 0.65 g (1.18 mmol) Edukt 0.39 g (78%) Produkt; für **1c** aus 1.65 g (2.85 mmol) Edukt 1.18 g (89%) Produkt; für **1d** aus 1.04 g (1.56 mmol) Edukt 0.75 g (87%) Produkt.

Freisetzung der ungeschützten Peptide: Eine Lösung von 1–2 mmol der zuvor beschriebenen Cystinderivate in 40 ml bidest. Wasser wurde mit einem 10–20proz. Überschub an Dithioerythrit (DTE) in 30 ml bidest. Wasser versetzt, mit 0.2 M NaOH auf pH 8.5 eingestellt und 3 h gerührt. Dann wurde mit einem Überschub Trifluoressigsäure angesäuert, i. Vak. auf ca. 5 ml eingengt und gefriertrocknet. Das erhaltene farblose Pulver wurde mit 15–30 ml kaltem Ether gewaschen und dann wieder i. Vak. getrocknet. Dieses Rohprodukt wurde durch HPLC gereinigt. Nach abschließender Gefriertrocknung hinterblieben die ungeschützten Peptide als analysenreine Monohydrate, die sich oberhalb von 200°C zersetzen.

1b: Aus 0.39 g (0.89 mmol) Edukt mit 0.18 g (1.16 mmol) DTE und 0.14 ml TFA. Eluens Wasser mit 7% Acetonitril und 0.1% TFA. Ausb. 0.36 g (92%) farbloses hochviskoses Öl, nicht ganz analysenrein.

1c: Aus 1.13 g (2.43 mmol) Edukt mit 0.39 g (2.54 mmol) DTE und 0.30 ml TFA. Eluens Wasser mit 2% Acetonitril und 0.1% TFA. Ausb. 0.76 g (67%) farbloses Pulver.

1d: Aus 0.75 g (1.36 mmol) Edukt mit 0.23 g (1.49 mmol) DTE und 0.25 ml TFA. Eluens Wasser mit 7% Acetonitril und 0.1% TFA. Ausb. 0.47 g (59%) farbloses Pulver.

Darstellung der Zinkkomplexe 2: Eine Lösung von 2–5 mmol der Peptide **1** in je 25 ml Wasser wurde zu einer Suspension der halbmolaren Menge von basischem Zinkcarbonat [3 Zn(OH)₂ · 2 ZnCO₃] in 25 ml Wasser gegeben. Es wurde 12 h gerührt, dann die klare Lösung auf ca. 15 ml eingengt. Durch Zugabe von 10 ml Aceton wurde der Komplex ausgefällt, der Niederschlag mit Aceton/Wasser (3:1) gewaschen und i. Vak. getrocknet. Zur Reinigung wurde das erhaltene Pulver in ca. 10 ml Methanol gelöst, die Lösung über ein Membranfilter filtriert und i. Vak. zur Trockne eingengt. Die Komplexe **2** fielen als farblose Pulver an, die sich bei 230–250°C zersetzen. Wegen der beschränkten Verfügbarkeit von **1d** wurde dieses nur zur Synthese von **3d** eingesetzt. – Aus 0.75 g (4.60 mmol) **1a** und 0.25 g Zinksalz (2.30 mmol Zn) entstanden 0.50 g (78%) **2a**; aus 0.10 g (0.47 mmol) **1b** und 0.026 g Zinksalz (0.23 mmol Zn) 0.08 g (68%) **2b**; aus

0.50 g (1.98 mmol) **1c** und 0.11 g Zinksalz (1.00 mmol Zn) 0.44 g (81%) **2c**.

Darstellung der Zinkkomplexe 3: Eine Lösung von 1.5–4 mmol des Peptids **1** in 25 ml Wasser wurde zu einer Suspension der halbmolaren Menge von basischem Zinkcarbonat [3 Zn(OH)₂ · 2 ZnCO₃] in 25 ml Wasser gegeben. Es wurde 12 h gerührt und die klare Lösung mit 0.2 M KOH vorsichtig auf pH 8.5 eingestellt. Dann wurde auf ca. 20 ml eingengt und der Komplex **3** mit 20–30 ml Aceton ausgefällt. Nach Waschen des Niederschlags mit 5 ml kaltem Aceton/Wasser (3:1) und mit 10 ml Aceton hinterblieben die Komplexe **3** als farblose und (bis auf **3d**) analysenreine Pulver mit Zersetzungspunkten von 200–210°C. – Aus 0.75 g (4.60 mmol) **1a** und 0.25 g Zinksalz (2.30 mmol Zn) entstanden so 0.89 g (75%) **3a**; aus 0.36 g (1.63 mmol) **1b** und 0.09 g Zinksalz (0.81 mmol Zn) 0.39 g (81%) **3b**; aus 0.76 g (3.01 mmol) **1c** und 0.17 g Zinksalz (1.50 mmol Zn) 0.70 g (72%) **3c**; aus 0.47 g (1.69 mmol) **1d** und 0.09 g (0.81 mmol) Zinksalz (0.81 mmol Zn) 0.49 g (82%) **3d**.

Potentiometrische Titrations: Apparatur, Eich- und Kontrollverfahren, Messungen und ihre Auswertung waren wie beschrieben^[6]. Als Zinksalz wurde Zn(NO₃)₂ verwendet, als Leitsalz KNO₃ (exakt 0.100 M), als Säure HNO₃ (2.9 · 10⁻³ M), als Base NaOH (0.200 M). Es wurden Titrations bei einem Zn/Ligand-Verhältnis von 0:1, 1:1, 1:2 und 1:4 durchgeführt, wobei die Konzentration des Peptidliganden bei 1–5 · 10⁻³ M lag.

- [1] 3. Mitteilung: H. Albrich, H. Vahrenkamp, *Chem. Ber.* **1994**, *127*, 1223–1233, voranstehend.
- [2] Übersichtsartikel über Metall-Peptid-Komplexe: S. H. Laurie in *Comprehensive Coordination Chemistry* (Hrsg.: G. Wilkinson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty), Pergamon Press, Oxford, **1987**, Bd. 2, S. 739–776; *Biocoordination Chemistry: Coordination Equilibria in Biologically Active Systems* (Hrsg.: K. Burger), Ellis Horwood, New York, **1990**.
- [3] Übersichtsartikel über Metall-Thiolate: P. J. Blower, J. R. Dilworth, *Coord. Chem. Rev.* **1987**, *76*, 121–185; I. G. Dance, *Polyhedron* **1986**, *5*, 1037–1104.
- [4] Eigene Arbeiten: H. Albrich, A. Meißner, P. Gockel, A. Stange, R. Burth, H. Vahrenkamp, unveröffentlicht.
- [5] M. Förster, R. Burth, A. K. Powell, T. Eiche, H. Vahrenkamp, *Chem. Ber.* **1993**, *126*, 2643–2648.
- [6] P. Gockel, H. Vahrenkamp, A. Zuberbühler, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 511–520.
- [7] M. Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer, Heidelberg, **1984**.
- [8] W. W. Cleland, *Biochemistry* **1964**, *3*, 480–482; W. L. Zahler, W. W. Cleland, *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 716–719.
- [9] T. Martin (Mead Johnson & Co.) US-Pat. 3.749.770, **1973**; *Chem. Abstr.* **1973**, *79*, P 83474 n.
- [10] G. Deacon, R. Philips, *Coord. Chem. Rev.* **1980**, *33*, 227–250.
- [11] H. Shindo, T. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1904–1909.
- [12] R. H. Prince in *Comprehensive Coordination Chemistry* (Hrsg.: G. Wilkinson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty), Pergamon Press, Oxford **1987**, Bd. 5, S. 925–1045.
- [13] R. C. Cannon, A. Kilbrick, *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 2314–2320; M. Yasuuda, K. Yamasuki, H. Oktaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1960**, *23*, 1067–1071.
- [14] S. Chabarok, A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 6021–6025.
- [15] D. L. Rabenstein, R. Guevremont, C. A. Evans in *Amino Acids and Derivatives as Ambivalent Ligands* (Hrsg.: H. Sigel), Marcel Dekker, New York, **1979**, S. 103–141.
- [16] J. Amaral, A. Macedo, I. Oliveira, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1977**, 205–206.

[72/94]