

## 140. $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexe von Polyaminosäuren in wässriger Lösung Katalytische Aktivität ( $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zerfall) und Struktur<sup>1)</sup>

von H. Sigel und G. Blauer<sup>2)</sup>

Institut für Anorganische Chemie der Universität Basel (Schweiz)

(10. IV. 68)

*Summary.* The decomposition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) catalyzed by complexes of  $\text{Cu}^{2+}$  ( $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) with various oligomers and polymers of glycine, L-lysine or L-glutamic acid was investigated in aqueous solution in the pH range 5–11, at  $24^\circ \text{C}$  and at low ionic strength. Previous investigations have shown that the decomposition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  is catalyzed by  $\text{Cu}^{2+}$ -complexes capable of forming  $\text{Cu}^{2+}$ -peroxocomplexes.

With increasing pH the catalytic activity of  $\text{Cu}^{2+}$ -complexes with glycine or glycyglycine (1:1) increases while the activity of  $\text{Cu}^{2+}$ -complexes with tri- or tetraglycine (1:1) is comparatively small at higher pH values apparently because in the latter cases the coordination positions of the copper become progressively occupied by the peptides. This interpretation is in accordance with the pH-dependence of the light-absorption spectra of the latter complexes.

$\text{Cu}^{2+}$ -complexes with poly- $\alpha$ , L-lysines of various molecular weights (molar ratios  $\text{Cu}^{2+}$ : lysine residues = 1:15) have a catalytic activity comparable to or higher than that of the complex  $\text{Cu}^{2+}$ -ethylenediamine (1:1), indicating two available coordination positions for formation of peroxocomplexes. On the other hand, the system  $\text{Cu}^{2+}$ -L-lysine (1:15) showed no significant activity probably because all coordination positions at the  $\text{Cu}^{2+}$  are occupied by lysine. Despite the excess of ligand groups over  $\text{Cu}^{2+}$  in the polylysine systems the structure of this polyamino acid apparently does not allow its full coordination with these groups under the conditions investigated. Two adjacent chelating  $\epsilon$ -amino groups are considered as the main ligand groups of the polymer to each copper ion.

The  $\text{Cu}^{2+}$ -poly- $\alpha$ , L-glutamic acid complex examined ( $\text{Cu}^{2+}$ : glutamic acid residues = 1:5) shows comparatively little activity. In this case, absorption spectra indicate formation of hydroxocomplexes at higher pH.

Besides the effects of structure, the electrostatic fields of the charged polyelectrolytes polylysine or polyglutamic acid are also considered to affect the rates of catalysis.

Das Ausmass der Katalyse des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zerfalls durch  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexe hängt wesentlich von der Zahl der an  $\text{Cu}^{2+}$  durch  $\text{HOO}^-$  bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ersetzbaren Ligandatome ab. So sinkt die katalytische Aktivität von den stark aktiven  $\text{Cu}^{2+}$ -1:1-Chelaten zweizähliger Liganden über die noch aktiven Chelate dreizähliger Liganden auf praktisch Null bei den Komplexen vierzähliger Liganden [2]. Man kann somit umgekehrt aus dem Ausmass der Katalyse Rückschlüsse auf die Zahl der für  $\text{HOO}^-$  bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$  zugänglichen Koordinationsstellen im untersuchten  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex ziehen [4], d. h., wir haben in dieser Reaktion eine Art «molekulare Sonde» zur Verfügung [5], die Aussagen über die Koordinationssphäre des Zentralions erlaubt.

Die als Enzymmodelle geeigneten [6] Polyaminosäuren wurden in katalytischen Untersuchungen bereits mehrfach eingesetzt [7] [8]. So untersuchte z. B. MORIGUCHI [8] die Katalyse der Oligophosphat-Hydrolyse durch die  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexe von Äthylen-diamin bzw. Poly-L-lysin.

<sup>1)</sup> 17. Mitteilung über «Metallionen und  $\text{H}_2\text{O}_2$ »; 16. Mitteilung: [1].

<sup>2)</sup> Adresse: Department of Biological Chemistry, The Hebrew University of Jerusalem (Israel).

In der vorliegenden Arbeit werden die  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexe von Polyaminosäuren und ihren niedermolekularen Analogen im Hinblick auf die Katalyse des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zerfalls verglichen. Ein Einfluss struktureller Besonderheiten der Polyaminosäuren sowie auch elektrostatischer Feldeffekte auf die Komplexbildung sollte sich mit Hilfe des  $\text{Cu}^{2+}$ -katalysierten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zerfalls nachweisen lassen. Dass dies möglich ist, wird an verschiedenen Glycin-Peptiden<sup>3)</sup>, Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäuren sowie Poly- $\alpha$ ,L-lysinen gezeigt.

**Experimentelles.** – *Reagenzien:* Poly- $\alpha$ ,L-lysin-hydrobromid (durchschnittliches Molekulargewicht 140 000 bzw. 3000, durchschnittlicher Polymerisationsgrad ca. 670 bzw. 14) von SIGMA CHEM. Co., St. Louis, Mo., USA. – Elementaranalysen von Poly- $\alpha$ ,L-lysin-hydrobromid (durchschnittlicher Polymerisationsgrad ca. 58) und L-Lysyl- $\alpha$ ,L-lysin-dihydrochlorid (MILES-YEDA LTD., Rehovoth, Israel) sowie von Poly- $\gamma$ ,Na<sup>+</sup>- $\alpha$ ,L-glutamat (Polymerisationsgrad ca. 270) ergaben befriedigende Resultate. – Die Substanzen wurden vor der Einwaage getrocknet.

Tri- bzw. Tetraglycin, L-Lysin-dihydrochlorid, L-Glutaminsäure und  $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  von FLUKA AG., Buchs, Schweiz;  $\text{H}_2\text{O}_2$  (pro analysi; vgl. hierzu [3]) von MERCK AG., Darmstadt, Deutschland.

Die *Absorptionsspektren*<sup>4)</sup> wurden in 4-cm-Küvetten (Vergleichsküvetten: Wasser) mit einem BECKMAN-Spektrophotometer DB mit automatisch registrierendem Schreiber (PHOTOVOLT CORPORATION, Modell 43) aufgenommen.

Die *Einstellung der pH-Werte* erfolgte an einem METROHM-Potentiometer E 353 mit U-Mikroglaselektroden.

Zur *Messung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Abnahme*<sup>4)</sup> wurden zu verschiedenen Zeiten den Lösungen ( $t = 24^\circ \pm 2^\circ$ ) Proben entnommen, mit Titanyl-sulfat in 3N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt und die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration photometrisch bei 410 nm mit einem BECKMAN-Photometer B bestimmt (vgl. [2]).

*Bestimmung des durchschnittlichen Polymerisationsgrades:* Durch Bestimmung des Sedimentationsgleichgewichtes in wässriger 1M NaCl-Lösung bei 20° (vgl. [10]) und Extrapolation auf unendliche Verdünnung (Konzentrationsbereich = 0,12–0,50 g/ml) wurde für das Poly- $\alpha$ ,L-lysin der Firma MILES-YEDA  $\overline{\text{DP}}_w = 58$  gefunden, für das Poly- $\alpha$ ,L-glutamat  $\overline{\text{DP}}_w = 270$ .

**Ergebnisse und Diskussion.** – Die katalytische Aktivität der verschiedenen  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexe wurde durch die Anfangsgeschwindigkeitskonstante  $k = (2,30/t) \times \log ([\text{H}_2\text{O}_2]_0/[\text{H}_2\text{O}_2]_t)$  ( $\text{min}^{-1}$ ) des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zerfalls pseudo-erster Ordnung in bezug auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  charakterisiert [2]–[5].

Wie in allen Fällen, in denen eine katalytische Aktivität zu beobachten ist (vgl. [2]–[5]), treten auch hier ternäre  $\text{Cu}^{2+}$ -Peroxokomplexe auf (Gelbfärbung der Lösungen!).

*Glycin und Glycin-Peptide.* Die katalytische Aktivität der  $\text{Cu}^{2+}$ -1:1-Komplexe von Tri- und Tetraglycin in Abhängigkeit vom pH (= Aktivitätskurven) ist in Figur 1 dargestellt und mit derjenigen der entsprechenden Komplexe von Glycin und Diglycin (aus [2] übernommen) verglichen.

Die katalytische Aktivität des  $\text{Cu}^{2+}$ -Glycin-1:1-Komplexes [2], die infolge Niederschlagsbildung nur in einem kleinen pH-Bereich verfolgt werden konnte, liegt deutlich im Gebiet der Komplexe mit zweizähligen Liganden, die Aktivitätskurve des  $\text{Cu}^{2+}$ -Diglycin-1:1-Komplexes verläuft in der für solche mit dreizähligen Liganden

<sup>3)</sup> Deren Strukturen im Festkörper wurden von FREEMAN [9] untersucht.

<sup>4)</sup> Die spektrophotometrischen Messungen sowie die katalytischen Versuche wurden mit frisch hergestellten Lösungen der Komplexe durchgeführt. – Die in den Figuren angegebenen pH-Werte sind Mittelwerte.

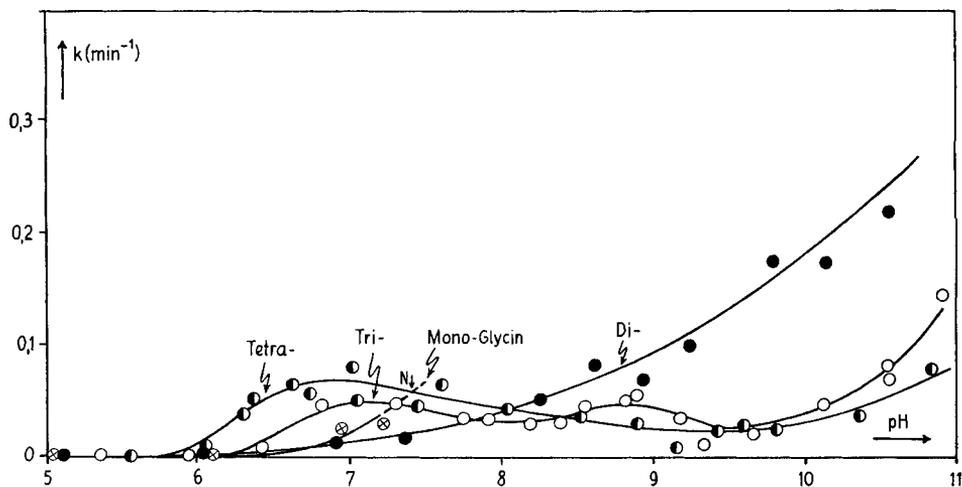


Fig. 1. Katalytische Aktivität der  $\text{Cu}^{2+}$ -1:1-Systeme ( $4 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ) von Glycin ( $\otimes$ ), Di- ( $\bullet$ ), Tri- ( $\circ$ ) und Tetraglycin ( $\odot$ )

gemessen als Anfangsgeschwindigkeitskonstante  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ) pseudo-erster Ordnung in bezug auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $8 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ), in Abhängigkeit vom pH<sup>5)</sup>

typischen Weise [2]. Interessant ist der fast gleiche Verlauf der Aktivitätskurven der  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexe von Tri- und Tetraglycin: Die katalytische Aktivität beginnt bei verhältnismässig tiefen pH-Werten, wird aber mit steigendem pH durch fortschreitenden Ersatz von  $\text{H}_2\text{O}$  an  $\text{Cu}^{2+}$  zunehmend unterdrückt. Ab pH ca. 8 verlaufen die beiden Kurven (Figur 1) unter derjenigen des  $\text{Cu}^{2+}$ -Diglycin-Komplexes, was eine weitgehende Besetzung des  $\text{Cu}^{2+}$  durch die betreffenden Liganden anzeigt.

Tri- und Tetraglycin mit ihren vier bzw. fünf potentiellen Haftstellen könnten *a priori* alle vier Koordinationsstellen eines  $\text{Cu}^{2+}$ -Ions besetzen, was sie mit steigendem pH offensichtlich weitgehend tun. Der gleichartige Verlauf der beiden Aktivitätskurven entspricht den von KIM und MARTELL [11] angegebenen Stabilitäts- bzw. Aciditätskonstanten, die (soweit vergleichbar) für beide  $\text{Cu}^{2+}$ -1:1-Komplexe von annähernd derselben Grössenordnung sind. Die – wenn auch geringe – Aktivitätszunahme der beiden Komplexe oberhalb pH 10 hängt wahrscheinlich mit der steigenden  $\text{HOO}^-$ -Konzentration ( $\text{p}K_{\text{H}_2\text{O}_2}^{\text{H}} = 11,8$  [12]) zusammen, die wohl die Ausbildung eines Peroxokomplexes unter Verdrängung eines koordinierten Ligandatoms ermöglicht<sup>6)</sup>. Gestützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung von KIM und MARTELL [11], wonach z. B. im  $\text{Cu}^{2+}$ -Triglycin-1:1-Komplex (mit  $\text{p}K_{\text{A}} = 10,9$ )  $\text{OH}^-$  eine der koordinierten Ligandgruppen verdrängen kann.

Die in Figur 2 und 3 in Abhängigkeit vom pH dargestellten molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$ <sup>7)</sup> für die  $\text{Cu}^{2+}$ -Triglycin- (vgl. auch [13]) bzw.  $\text{Cu}^{2+}$ -Tetraglycin-1:1-

<sup>5)</sup>  $\text{N}\downarrow$  = Niederschlagsbildung.

<sup>6)</sup> Dünnschichtchromatographische Untersuchungen weisen ausserdem darauf hin, dass der  $\text{Cu}^{2+}$ -Tetraglycin-1:1-Komplex in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei pH ca. 10,5 in geringem Masse abgebaut wird.

<sup>7)</sup>  $\epsilon$  ist der dekadische Extinktionskoeffizient in  $1 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , bezogen auf ein Grammatom  $\text{Cu}^{2+}$ .

Systeme sind bis pH 6 praktisch identisch. Die Absorptionzunahme wie auch die Verschiebung der Maxima nach kürzeren Wellenlängen mit steigendem pH bringen in beiden Komplexen die fortschreitende Besetzung der Koordinationsstellen des  $\text{Cu}^{2+}$  durch den mehrzähligen Liganden – in Übereinstimmung mit den Beobachtungen bei

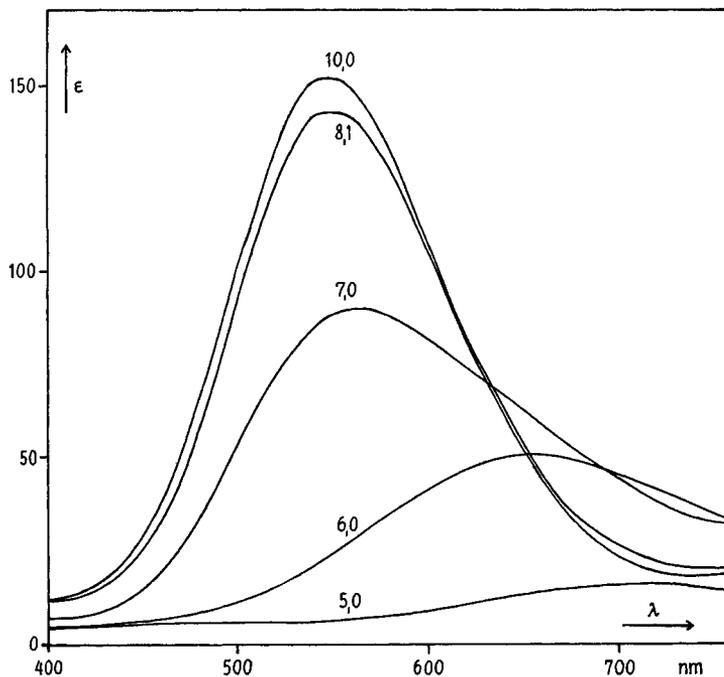


Fig. 2. Absorptionsspektren<sup>7)</sup> des  $\text{Cu}^{2+}$ -Triglycin-1:1-Systems ( $1,5 \cdot 10^{-3}$  M) bei verschiedenen pH-Werten

der Katalyse (Figur 1) – deutlich zum Ausdruck<sup>8)</sup>. Die bei pH 9 bis 11 einsetzende weitere Verschiebung der Absorptionsbande des  $\text{Cu}^{2+}$ -Tetraglycin-Komplexes von 565 nm nach ca. 510 nm rührt – in Übereinstimmung mit den Angaben von KIM und MARTELL [11] – von der Deprotonierung bzw. N-Koordination der dritten Amidgruppe an  $\text{Cu}^{2+}$  her. Die in den Glycin- und Glycinpeptid-Systemen gebildeten  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexe weisen also mit Zunahme der potentiellen Haftstellen – wie erwartet – immer weniger für  $\text{HOO}^-$  verfügbare Koordinationsstellen am Kupfer auf.

*L-Lysin und Poly- $\alpha$ ,L-lysin-Peptide.* Als Beispiel höher polymerisierter Systeme mit einer grösseren Anzahl von potentiellen Haftstellen untersuchten wir drei Poly- $\alpha$ ,L-lysin-Präparate vom durchschnittlichen Polymerisationsgrad 670, 58 bzw. 14; die katalytische Aktivität ihrer  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexe, verglichen mit derjenigen der  $\text{Cu}^{2+}$ -

<sup>8)</sup> Die Absorptionsspektren der  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexe mussten aus experimentellen Gründen in etwas konzentrierteren  $\text{Cu}^{2+}$ -Lösungen gemessen werden als die katalytische Aktivität; im folgenden wird die Annahme gemacht, die Aussage der Spektren gelte auch für die etwas verdünnten Lösungen der Katalysmessungen.

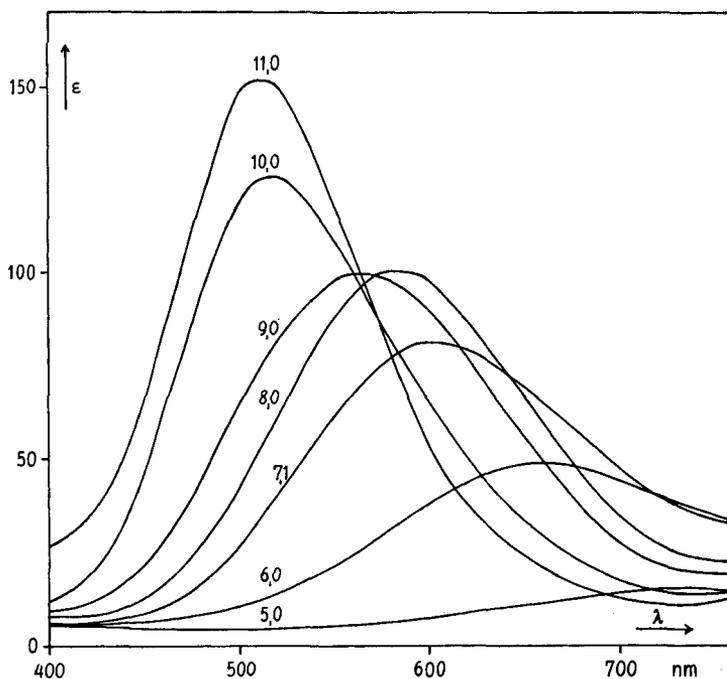


Fig. 3. Absorptionsspektren<sup>9)</sup> des  $\text{Cu}^{2+}$ -Tetraglycin-1:1-Systems ( $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) bei verschiedenen pH-Werten

Komplexe von L-Lysin und L-Lysyl-L-lysin ist in Figur 4 dargestellt. Auch bei höheren pH-Werten ( $> 7,5$ ) war an den  $\text{Cu}^{2+}$ -Poly-L-lysin-Systemen keine Abnahme der katalytischen Aktivität zu beobachten, denn die Geschwindigkeitskonstanten  $k$ , die in diesem pH-Bereich nur geschätzt werden können, sind durchwegs grösser als  $0,6 \text{ min}^{-1}$ .

Spektrophotometrische Untersuchungen hatten gezeigt, dass bei pH 9,5 die Poly-L-lysine-(670)<sup>9)</sup> bzw. -(58) auf etwa 15 Lysin-Einheiten nicht mehr als ein  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion ohne Niederschlagsbildung aufnehmen können, während Poly-L-lysin-(14) maximal zwei  $\text{Cu}^{2+}$  pro Mol, also ein  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion pro 7 Lysin-Reste band. Für die katalytischen Untersuchungen wurde bei konstanter  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration ( $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) die Ligandkonzentration so variiert, dass bei Poly-L-lysin-(670) bzw. -(58) auf 15 Lysin-Einheiten, bzw. bei -(14) auf eine Polyamino-säure (also 14 Lysin-Einheiten) ein  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion kam.

Erstaunlich ist die sehr grosse katalytische Aktivität der Komplexe der drei Poly-L-lysin-Präparate; obwohl pro  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion etwa 30 potentielle Haftstellen (je ca. 15  $\epsilon$ -Amino- und Amid-Gruppen) zur Verfügung stehen, ist dieses offensichtlich nicht vollständig besetzt. Dass die katalytische Aktivität in diesen Systemen von der Struktur der Komplexe abhängt, und nicht von der der Liganden, ergibt sich aus folgenden Befunden: Weder Poly-L-lysin allein<sup>10)</sup>, noch das L-Lysin: $\text{Cu}^{2+} = 15:1$ -System, in wel-

<sup>9)</sup> Die dem Namen angefügte Zahl gibt den Polymerisationsgrad der verwendeten Poly- $\alpha$ ,L-lysin-Präparate an.

<sup>10)</sup> Geprüft mit Poly-L-lysin-(14) in  $5,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  Lösungen (pro Peptid-Einheit) bei pH 7,8 und 8,8.

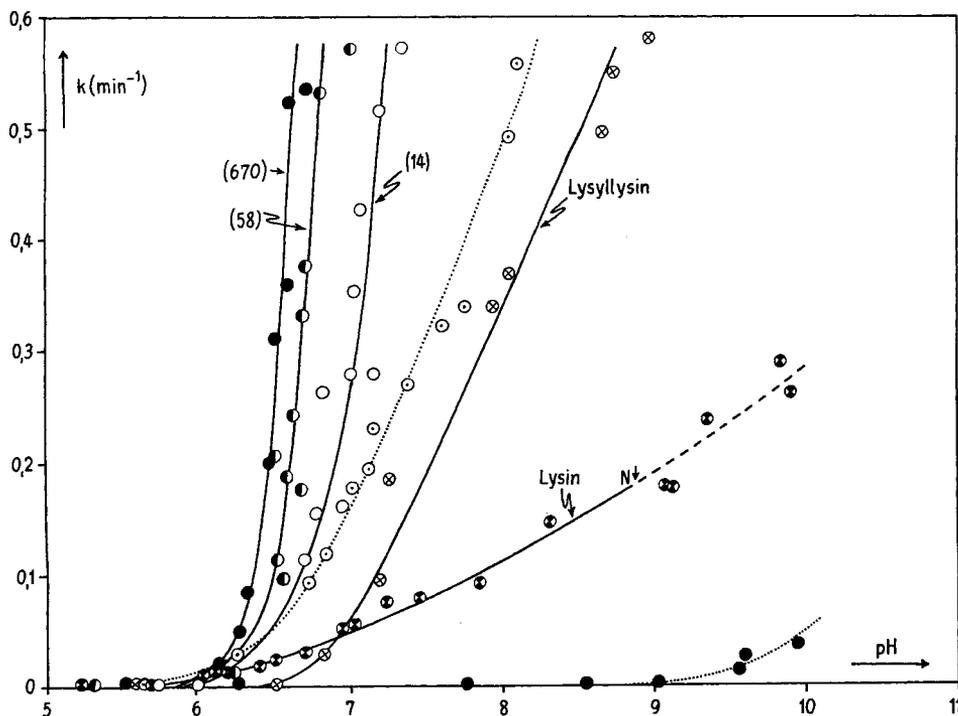


Fig. 4. Katalytische Aktivität der  $\text{Cu}^{2+}$ -Systeme ( $\text{Cu}^{2+}$ :Lysin-Reste = 1:15;  $[\text{Cu}^{2+}] = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) von Poly-L-lysin-(670) (●) und -(58) (●) sowie der  $\text{Cu}^{2+}$ -1:1-Systeme ( $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) von Poly-L-lysin-(14) (○), L-Lysyl-L-lysin (⊗) und L-Lysin (⊙)<sup>5</sup>

gemessen als Anfangsgeschwindigkeitskonstante  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ) pseudo-erster Ordnung in bezug auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ), in Abhängigkeit vom pH. Zum Vergleich (punktierte Kurven) ist  $k$  für das  $\text{Cu}^{2+}$ -Poly-L-lysin-(14)-2:1-System (d. h. 2  $\text{Cu}^{2+}$  pro Molekel) und das  $\text{Cu}^{2+}$ -L-Lysin-1:15-System (●) aufgetragen

chem  $\text{Cu}^{2+}$  praktisch vollständig durch die Aminosäure besetzt ist, katalysieren den  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zerfall (vgl. Figur 4).

Wie ein Vergleich der Aktivitäten der  $\text{Cu}^{2+}$ -Poly-L-lysin-Systeme und des  $\text{Cu}^{2+}$ -Äthylendiamin-1:1-Komplexes zeigt (Figur 5), liegen die Aktivitätskurven der drei  $\text{Cu}^{2+}$ -Poly-L-lysin-Systeme im Gebiet der Komplexe mit zwei zugänglichen Koordinationsstellen am  $\text{Cu}^{2+}$  (vgl. auch [2]). Hingegen deutet der Vergleich der Aktivitätskurve des  $\text{Cu}^{2+}$ -L-Lysin-1:1-Komplexes mit derjenigen des  $\text{Cu}^{2+}$ -Glycylglycin-1:1-Komplexes auf eine wenigstens zum Teil dreifache Besetzung des  $\text{Cu}^{2+}$  im Lysin-Komplex hin (Figur 5).

Die katalytische Aktivität der  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexe nimmt in der Reihe zu (Figur 4): L-Lysin < L-Lysyl-L-lysin < Poly-L-lysin-(14) < Poly-L-lysin-(58) < Poly-L-lysin-(670). Hierfür bestehen nach [2]–[5] *a priori* folgende drei Erklärungsmöglichkeiten:

1. Eine zu einem kleineren Anteil vorhandene dreifache Besetzung (z. B. unter Beteiligung der Endgruppen) des  $\text{Cu}^{2+}$  in den Poly-L-lysin-Komplexen nimmt mit zunehmendem Polymerisationsgrad ab. Diese Erklärung erscheint unwahrscheinlich,

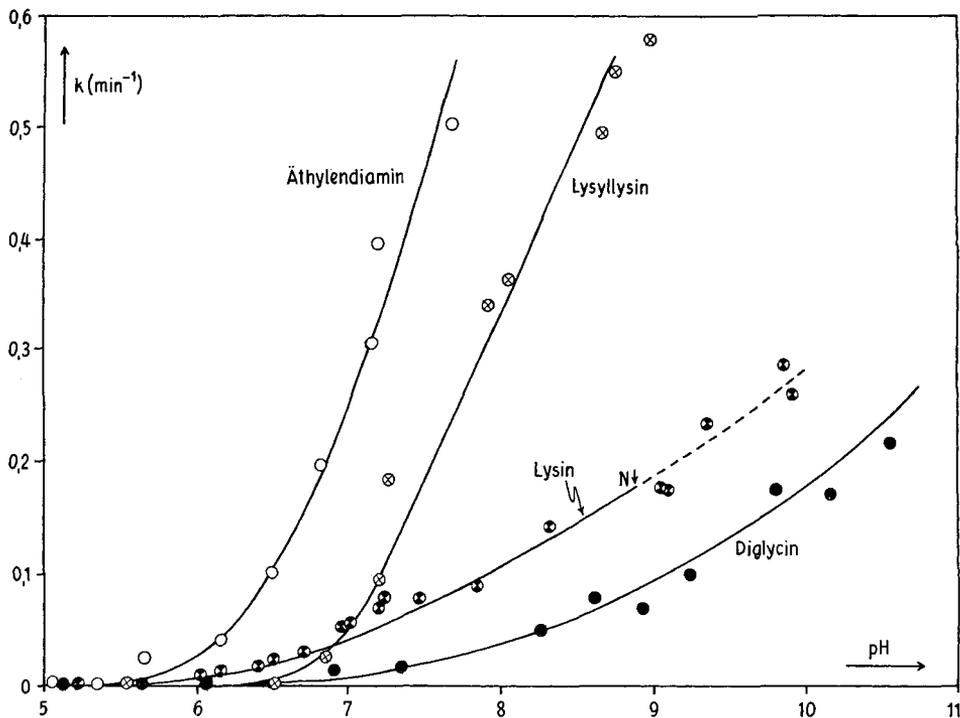


Fig. 5. Katalytische Aktivität der  $\text{Cu}^{2+}$ -1:1-Systeme ( $4 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ) von L-Lysyl-L-lysine ( $\otimes$ ), L-Lysin ( $\odot$ )<sup>5</sup>, Äthylendiamin ( $\circ$ ) und Diglycin ( $\bullet$ ) gemessen als Anfangsgeschwindigkeitskonstante  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ) pseudo-erster Ordnung in bezug auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $8 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ), in Abhängigkeit vom pH

da ein in dieser Weise dreifach besetzter  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex wohl keine grosse Stabilität aufweisen dürfte.

2. Der Anteil eines Komplexes mit einem O-Liganden (endständige Carboxylgruppe) nimmt mit zunehmendem Polymerisationsgrad ab. – Nach früheren Beobachtungen katalysieren N-Ligand-Komplexe den  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zerfall besser als O-Ligand-Komplexe [2] [3].

3. Das positive Feld der Polymeren – auch im  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex sind die freien  $\epsilon$ -Aminogruppen bis ca. pH 9 wohl zum grossen Teil noch protoniert – nimmt mit dem Polymerisationsgrad zu [14]; diese Zunahme erleichtert die Deprotonierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. die Anlagerung von  $\text{HOO}^-$  an das komplexgebundene  $\text{Cu}^{2+}$ .

Mit der Annahme eines Einflusses der endständigen Carboxylgruppe auf die Komplexbildung gemäss Punkt (2) stimmt folgende Beobachtung überein: Verringert man in einer Lösung mit gleicher  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration wie bei den bisherigen Versuchen die Konzentration an Poly-L-lysin-(14) um die Hälfte, so dass sich ein Verhältnis von  $\text{Cu}^{2+}$ :Lysin-Einheit von 1:7 ergibt, so sinkt die katalytische Aktivität (Figur 4; obere punktierte Linie).

Dieser zunächst sehr erstaunliche Befund lässt sich wohl zwanglos mit der stärkeren Beteiligung der Carboxylgruppe an der Komplexbildung (Punkt (2)) erklären. Da sich zudem das positive Feld gleichsinnig mit dem Polymerisationsgrad ändert, kommt die erwähnte Reihe wahrscheinlich durch eine Addition der Effekte (2) und (3) zustande.

Die angeführten Versuche und Überlegungen machen wahrscheinlich, dass in den  $\text{Cu}^{2+}$ -Poly-L-lysin-Systemen hauptsächlich zwei Stickstoffatome am  $\text{Cu}^{2+}$  koordinieren. Sieht man von der endständigen  $\alpha$ -Aminogruppe ab<sup>11)</sup>, so können sich zwei Arten von Komplexen bilden – solche mit einer  $\epsilon$ -Amino- und einer Amidgruppe oder solche mit zwei  $\epsilon$ -Aminogruppen –, die beide eine ähnliche katalytische Aktivität aufweisen sollten [2].

Da gemäss früheren Befunden [5] nur solche Ligandgruppen durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxydiert werden, die sich in der Koordinationssphäre des  $\text{Cu}^{2+}$  befinden, und da  $\text{Cu}^{2+}$ -Peptid-Komplexe durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  abgebaut werden [15] [1], wurde in einem  $\text{Cu}^{2+}$ -Poly-L-lysin-(58)-System (Bedingungen wie für Fig.4 angegeben) das Molekulargewicht des Polylysins vor und nach Ablauf der katalytischen Reaktion<sup>12)</sup> bestimmt. Das durchschnittliche scheinbare Molekulargewicht nahm im Verlaufe der Reaktion nur um etwa 30–40 Prozent ab. Dies deutet auf eine nur geringe Beteiligung der Amidgruppen<sup>13)</sup> an der Komplexbildung in diesem pH-Gebiet hin, so dass diese wohl vorwiegend über zwei  $\epsilon$ -Aminogruppen erfolgt. Dies stimmt mit der Interpretation von MORIGUCHI [8] überein, der die Beteiligung von Amidgruppen bei der Komplexbildung zwischen  $\text{Cu}^{2+}$  und Poly-L-lysin erst im pH-Gebiet von 12 annimmt<sup>14)</sup>.

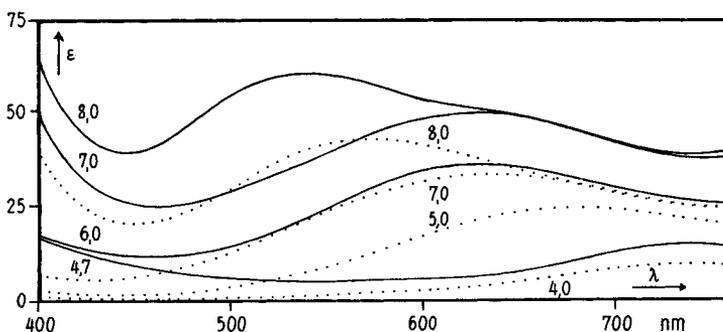


Fig.6. Absorptionsspektren<sup>7)</sup> des  $\text{Cu}^{2+}$ -Poly-L-lysin-(14)-1:1- ( $[\text{Cu}^{2+}] = 6,8 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ) – durchgezogene Linien – und des  $\text{Cu}^{2+}$ -Äthylendiamin-1:1-Systems ( $[\text{Cu}^{2+}] = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ) – punktierte Linien – bei verschiedenen pH-Werten

<sup>11)</sup> Diese spielt zumindest bei Poly-L-lysin-(670) bzw. -(58) eine untergeordnete Rolle, da in diesen Systemen die Zahl der Endgruppen im Vergleich mit  $\text{Cu}^{2+}$  gering ist.

<sup>12)</sup> Die Reaktionslösung stand einen Tag bei pH 7.

<sup>13)</sup> Die Beteiligung der Amidgruppe an der Komplexbildung ist auch von rein koordinationschemischen Gesichtspunkten aus nicht sehr wahrscheinlich: So bildet z.B. Glycinamid mit  $\text{Cu}^{2+}$  einen an der Amidgruppe deprotonierten Komplex [16a],  $\beta$ -Alaninamid dagegen nicht mehr [16b].

<sup>14)</sup> Prinzipiell müssten auch intermolekulare Vernetzungen durch  $\text{Cu}^{2+}$  sowie intramolekulare Bindungen zweier nicht benachbarter  $\epsilon$ -Aminogruppen berücksichtigt werden; diese Bindungsweisen sind allerdings infolge der elektrostatischen Wechselwirkungen wohl nicht begünstigt.

Durch die Koordination zweier benachbarter  $\epsilon$ -Aminogruppen würde eine «Cu<sup>2+</sup>-äthylendiamin-komplex-ähnliche» Struktur entstehen, was mit den in Figur 6 wiedergegebenen Spektren weitgehend in Einklang steht. Figur 6 zeigt die molare Extinktion  $\epsilon$  für das Cu<sup>2+</sup>-Poly-L-lysin-(14)-1:1-System und für das Cu<sup>2+</sup>-Äthylendiamin-1:1-System in Abhängigkeit vom pH. Die Cu<sup>2+</sup>-Poly-L-lysin-(58)- und -(670)-Systeme zeigen ähnliche Spektren, wobei sich aber mit zunehmendem Polymerisationsgrad die Absorptionsmaxima – insbesondere bei höheren pH – zu etwas längeren Wellenlängen verschieben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den Cu<sup>2+</sup>-Poly-L-lysin-Komplexen das Cu<sup>2+</sup> vorwiegend zweifach koordiniert wird, offenbar vorzugsweise über zwei benachbarte  $\epsilon$ -Aminogruppen.

*L-Glutaminsäure und Poly- $\alpha$ ,L-glutaminsäure-(270)*. Wir haben ferner die katalytische Aktivität des Cu<sup>2+</sup>-Komplexes der Poly-L-glutaminsäure-(270) untersucht und mit derjenigen der Cu<sup>2+</sup>-L-Glutaminsäure-1:1- und -1:5-Systeme verglichen (Figur 7).

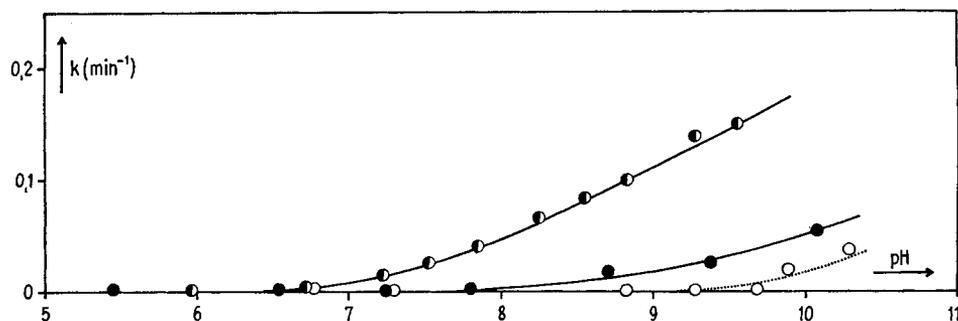


Fig. 7. Katalytische Aktivität des Cu<sup>2+</sup>-Poly-L-glutaminsäure-(270)-Systems (●) (Cu<sup>2+</sup>:Glutaminsäure-Einheit = 1:5; [Cu<sup>2+</sup>] = 4 · 10<sup>-4</sup> M) sowie des Cu<sup>2+</sup>-L-Glutaminsäure-1:1- (●) und des Cu<sup>2+</sup>-L-Glutaminsäure = 1:5-Systems (○) (punktierte Kurve) ([Cu<sup>2+</sup>] = 4 · 10<sup>-4</sup> M) gemessen als Anfangsgeschwindigkeitskonstante  $k$  (min<sup>-1</sup>) pseudo-erster Ordnung in bezug auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8 · 10<sup>-3</sup> M), in Abhängigkeit vom pH

Die Aktivitätskurve des Cu<sup>2+</sup>-L-Glutaminsäure-1:1-Komplexes ist mit derjenigen des Cu<sup>2+</sup>-Glycylglycin-Komplexes (Figur 1) praktisch identisch, d. h. sie verläuft im Gebiet der dreifach koordinierten Cu<sup>2+</sup>-Komplexe. Dies ist etwas überraschend, da eine Glutaminsäuremolekel wohl nur schwierig drei Koordinationsstellen eines Cu<sup>2+</sup>-Ions besetzen kann (Kalottenmodell<sup>15</sup>) (vgl. auch [9]). Bei einem fünffachen L-Glutaminsäure-Überschuss verschwindet die Katalyse fast ganz, was eine vollständige Blockierung des Cu<sup>2+</sup> anzeigt.

Das System Cu<sup>2+</sup>-Poly-L-glutaminsäure mit fünf Glutaminsäure-Resten pro Cu<sup>2+</sup> ist nur wenig aktiver (Figur 7) als das Cu<sup>2+</sup>-Glutaminsäure-1:5-System, was auf eine weitgehende Besetzung der Koordinationsstellen des Cu<sup>2+</sup> durch die Polyamino-säure hinweist. Zu bedenken ist hierbei allerdings, dass Poly-L-glutaminsäure im untersuchten pH-Gebiet stark negativ geladen ist – durch die Komplexbildung mit Cu<sup>2+</sup> werden die negativen Ladungen wohl nur zum Teil kompensiert –, so dass infolge elektrostati-

<sup>15</sup>) Denkbar wäre die Besetzung einer Koordinationsstelle durch OH<sup>-</sup> (vgl. [4]).

scher Wechselwirkung die Ausbildung ternärer Peroxokomplexe mit  $\text{HOO}^-$  und damit die Katalyse des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zerfalls erschwert sein dürfte.

Wie auch von TAKESADA *et al.* [17] beobachtet wurde, nimmt die Extinktion im System  $\text{Cu}^{2+}$ :Glutaminsäure-Rest = 1:5 mit steigendem pH sowohl bei 700 nm (Figur 8) als auch bei 250 nm (Maximum) ab. Bei etwa pH 4,8 erreicht die Extinktion der Lösung ein Maximum; bei tieferen pH-Werten treten Niederschläge auf – wohl die

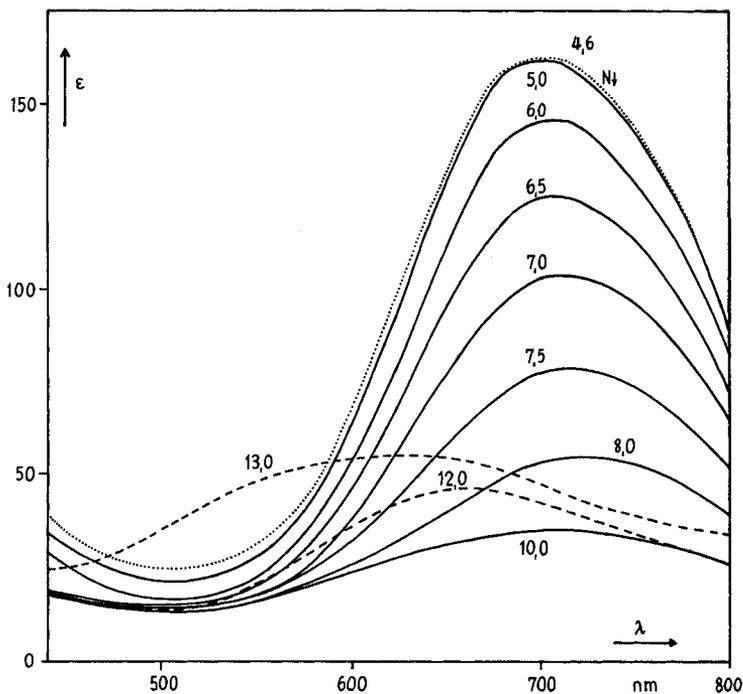


Fig. 8. Absorptionsspektren<sup>7)</sup> des  $\text{Cu}^{2+}$ -Poly-L-glutaminsäure-(270)-Systems ( $\text{Cu}^{2+}$ : Glutaminsäure-Einheit = 1:5) bei verschiedenen pH-Werten ( $[\text{Cu}^{2+}] = 8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ )<sup>5)</sup>

protonierte Poly-L-glutaminsäure. Diese Abnahme der Extinktion bedeutet, dass die Komplexbildung mit der Polyaminosäure sich verändert<sup>16)</sup>, was zumindest teilweise auf einer zunehmenden Verdrängung von Polyaminosäure-Haftstellen am  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion durch  $\text{OH}^-$  beruhen könnte. Allerdings tritt bei hohen pH-Werten kein Niederschlag auf, so dass das wohl zum Teil hydrolysierte  $\text{Cu}^{2+}$  noch über Carboxylgruppen an die Polyaminosäure gebunden sein muss. Die Deprotonierung einer Amidgruppe infolge Komplexbildung mit  $\text{Cu}^{2+}$  findet – wenn überhaupt – erst bei pH-Werten von mindestens 12 statt, denn erst dann verschiebt sich das Absorptionsmaximum zu kürzeren Wellenlängen (vgl. Fig. 8).

Im Gegensatz zum  $\text{Cu}^{2+}$ -Poly-L-glutaminsäure-System nimmt im  $\text{Cu}^{2+}$ -Glutaminsäure-1:1-System wie erwartet bei pH 3–7 die Extinktion mit dem pH zu (zunehmende Komplexbildung). Bei höheren pH-Werten setzt Hydrolyse ein (vgl. auch

<sup>16)</sup> Über Korrelationen zwischen Extinktion und Helixgehalt vgl. [17].

15)), die sich in einer Verschiebung des Maximums zu kürzeren Wellen und einer Niederschlagsbildung äussert. Auch bei Erhöhung der Glutaminsäure-Konzentration findet man das übliche Verhalten; im  $\text{Cu}^{2+}$ :Glutaminsäure = 1:5-System nimmt die Extinktion mit steigendem pH von 2 bis 7 zu, von pH 7 bis 11 ändert sich das Spektrum nicht mehr, was auf koordinative Sättigung des  $\text{Cu}^{2+}$  durch die Glutaminsäure hinweist. Das eigenartige Verhalten des  $\text{Cu}^{2+}$ -Poly-L-glutaminsäure-Systems (Figur 8) ist demnach eine Eigenschaft des Polymeren und nicht des Monomeren.

Die vorliegenden Untersuchungen der Systeme  $\text{Cu}^{2+}$ -Poly-L-lysin und  $\text{Cu}^{2+}$ -Poly-L-glutaminsäure zeigen, wie schwierig es ist, Vorhersagen über das Ausmass der Komplexbildung sowie über die Struktur und die katalytische Aktivität der entstehenden Komplexe zu machen, da in derartigen polymeren Systemen sowohl sterische als auch elektrostatische Faktoren wirksam sind. Für die Poly-L-lysin-Systeme zeigt sich eindeutig, dass nur ein beschränkter Teil aller potentiellen Haftstellen an der Koordination von Metallionen beteiligt ist.

Herrn Dr. B. PRIJS danken wir für sein Interesse an der vorliegenden Arbeit. Frä. S. REIMANN sowie Frau E. CHRISTEN-LÖHNERT und Frau E. WIEBER-DALLE CARBONARE gilt unser Dank für ihre sorgfältige Hilfe bei den Experimenten und dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG für seine Unterstützung.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. CH. CURTIUS, P. ANDERS, H. ERLÉNMEYER† & H. SIGEL, *Helv.* 51, 896 (1968).
- [2] H. SIGEL & U. MÜLLER, *Helv.* 49, 671 (1966).
- [3] H. BRINTZINGER & H. ERLÉNMEYER, *Helv.* 48, 826 (1965).
- [4] H. ERLÉNMEYER, U. MÜLLER & H. SIGEL, *Helv.* 49, 681 (1966).
- [5] H. SIGEL, B. PRIJS & H. ERLÉNMEYER, *Experientia* 23, 170 (1967); H. SIGEL, *Helv.* 50, 582 (1967).
- [6] E. KATCHALSKI, M. SELA, H. I. SILMAN & A. BERGER, in «The Proteins», edited by H. NEURATH, Vol. 2, Academic Press, New York, second ed., 1964, p. 405.
- [7] A. LEVITZKI, I. PECHT & M. ANBAR, *Nature* 207, 1386 (1965).
- [8] Y. MORIGUCHI, *Bull. chem. Soc. Japan* 39, 2656 (1966).
- [9] H. C. FREEMAN, «Crystal Structure Studies of Cupric-Peptide Complexes» in «The Biochemistry of Copper», edited by J. PEISACH, PH. AISEN & W. E. BLUMBERG, Academic Press, New York und London, 1966, p. 77.
- [10] G. BLAUER & Z. B. ALFASSI, *Biochim. biophys. Acta* 133, 206 (1967).
- [11] M. K. KIM & A. E. MARTELL, *J. Amer. chem. Soc.* 88, 914 (1966).
- [12] V. A. KARGIN, *Z. anorg. allg. Chem.* 183, 77 (1929).
- [13] H. DOBBIE & W. O. KERMAK, *Biochem. J.* 59, 257 (1955); M. SHEINBLATT & E. D. BECKER, *J. biol. Chemistry* 242, 3159 (1967).
- [14] C. TANFORD, «Physical Chemistry of Macromolecules», Wiley, New York und London, 1961, Kapitel 7.
- [15] H. ERLÉNMEYER, H. SIGEL, H. CH. CURTIUS & P. ANDERS, *Helv.* 49, 19 (1966); H. CH. CURTIUS, P. ANDERS, R. ZELL, H. SIGEL & H. ERLÉNMEYER, *Helv.* 49, 2256 (1966).
- [16] a) H. SIGEL, *Angew. Chem.* 80, 124 (1968); *Angew. Chem. internat. Edit.* 7, 137 (1968). – b) P. HEMMERICH, TH. KADEN & H. SIGEL, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [17] H. TAKESADA, H. YAMAZAKI & A. WADA, *Biopolymers* 4, 713 (1966).