

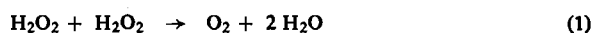
Zur katalatischen und peroxidatischen Aktivität von Cu^{2+} -Komplexen

Von H. Sigel^[*]

Der Zusammenhang zwischen der Struktur von Cu^{2+} -Komplexen und ihrer katalytischen Aktivität beim H_2O_2 -Zerfall läßt sich als „molekulare Sonde“ verwenden, indem er es erlaubt, aus der katalytischen Aktivität eines Cu^{2+} -Komplexes unbekannter Struktur die Zahl der koordinierten Ligandgruppen abzuleiten. Da außerdem nur koordinierte Ligandgruppen durch H_2O_2 oxidiert werden, lassen sich aus der spektrophotometrisch verfolgbaren Oxidation bestimmter Teile eines Liganden weitere Hinweise auf die Beschaffenheit der Koordinationssphäre des Metallions gewinnen. Dies gelang am Beispiel der Cu^{2+} -Komplexe von Amidin, Polyaminosäuren, Nucleotiden, RNS und nativer sowie denaturierter DNS. Kinetische Untersuchungen gestatten Einblicke in die Mechanismen katalatischer und peroxidatischer Reaktionen.

1. Einleitung

Die Katalyse der Disproportionierung von Wasserstoffperoxid durch Metallionen oder deren Komplexe in homogenen Systemen war bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen^[1–3]. Der bekannteste Katalysator für die Reaktion (1) ist wohl die Katalase, ein Fe^{III} -porphyrinhaltiges Enzym^[4].



Bei der „katalatischen“ Disproportionierung (1) wird je ein Molekül H_2O_2 oxidiert bzw. reduziert; ersetzt man eine der beiden durch einen H-Donor, d. h. ein durch H_2O_2 oxidierbares Substrat, so läuft Reaktion (2) ab:



[*] Priv.-Doz. Dr. H. Sigel
Institut für Anorganische Chemie der Universität
CH-4000 Basel (Schweiz), Spitalstraße 51
z.Z. Cornell University
Savage Hall, Ithaca, N.Y. 14850 (USA)

[1] N. Uri, Chem. Reviews 50, 375 (1952); J. H. Baxendale, Advances in Catalysis and Related Subjects 4, 31 (1952).

[2] J. A. Connor u. E. A. V. Ebsworth, Advances inorg. Chemistry and Radiochemistry 6, 279 (1964).

[3] Gmelins Handbuch der Anorganischen Chemie, System-Nr. 3: „Sauerstoff“, Lieferung 7, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1966.

[4] H. R. Mahler u. E. H. Cordes: Biological Chemistry. Harper & Row, New York 1966.

Auch diese „peroxidatische“ Reaktion kann durch Metallionen oder deren Komplexe katalysiert werden; der bekannteste Katalysator ist wiederum ein Fe^{III} -porphyrinhaltiges Enzym, die Peroxidase^[4].

Bei der großen biochemischen Bedeutung der Katalase und der Peroxidase ist es verständlich, daß immer wieder Modelle – d. h. verschiedenartig gebaute, katalytisch mehr oder weniger wirksame Fe^{III} -Komplexe – für diese beiden Enzyme gesucht und auch gefunden werden^[5–8]; allerdings übertrifft die Aktivität der Katalase die aller bekannten Modelle bei weitem^[9].

Alle vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß in homogener Phase als Katalysatoren für die Reaktionen (1) und (2) z. B. von den Elementen der 1. Übergangsreihe nur die Ionen (gegebenenfalls in Form ihrer Komplexe) wirksam sind, die keine gefüllte 3d-Schale haben^[2,9,10], also z. B. Cr, Mn, Fe, Co, Ni und

[5] J. H. Wang, J. Amer. chem. Soc. 77, 822, 4715 (1955); R. C. Jarnagin u. J. H. Wang, ibid. 80, 786, 6477 (1958).

[6] M. T. Beck u. S. Görög, Acta chim. Acad. Sci. hung. 20, 57 (1959).

[7] A. T. Tu, Biochim. biophysica Acta 92, 191 (1964).

[8] G. A. Hamilton, J. P. Friedman u. P. M. Campbell, J. Amer. chem. Soc. 88, 5266 (1966); G. A. Hamilton, J. W. Hanifin jr. u. J. P. Friedman, ibid. 88, 5269 (1966).

[9] Vgl. [3], dort S. 2289, 2290.

[10] H. B. Jonassen u. H. Thielemann, Z. anorg. allg. Chem. 320, 274 (1963).

Cu (vgl. [11]), diejenigen mit gefüllter d-Schale, wie Zn und Cd [10], sind dagegen katalytisch inaktiv. Unter den Komplexen der genannten Ionen fallen diejenigen von Fe^{III} [5] und Cu^{II} [13] als katalytisch besonders aktiv auf; es ist bemerkenswert, daß diese Ionen auch in redox-aktiven Enzym-Systemen häufig auftreten [14].

Während Fe-haltige Enzyme schon seit längerem intensiv untersucht werden [15], treten die Cu-haltigen erst neuerdings stark in den Mittelpunkt des Interesses [12]. Einer der Hauptgründe hierfür ist wohl, daß in einem großen Teil der Fe-haltigen Enzyme das Metallion in einem Porphyrinsystem gebunden ist, d.h. die Ligandatome bekannt und lokalisiert sind, was das Verständnis des Ablaufes einer Katalyse erleichtert. In den Cu-haltigen Enzymen (vgl. z.B. [12]) wie Tyrosinase, Polyphenol-Oxidase, Laccase usw. sind dagegen die Ligandatome weniger offensichtlich; tatsächlich ist noch von keinem Cu-Enzym oder -Protein die Koordinationssphäre des Metallions im einzelnen bekannt, so daß eine grundlegende Voraussetzung für das Verständnis ihrer Wirkung fehlt [16].

Als Haftstellen für Metallionen kommen in Proteinen hauptsächlich in Frage: $-\text{COO}^-$, ArO^- , RS^- , $-\text{NH}_2$, $-\text{CONH}-$ und Imidazol [17]. Dementsprechend wurden mehrfach Cu-Komplexe, die wenigstens einen Teil dieser Ligandgruppen enthalten, als Modelle für Cu-Proteine oder -Enzyme studiert (vgl. z.B. [17–21]).

Im folgenden beschränken wir uns auf die Besprechung der katalytischen und peroxidatischen Aktivität – nach Gl. (1) bzw. (2) – verschieden strukturierter Cu^{2+} -Komplexe, die zum Teil ebenfalls als Modelle im erwähnten Sinn betrachtet werden können. Aus dem Versuch, diese katalytischen Vorgänge näher zu charakterisieren, ergab sich ein einfacher Zusammenhang zwischen Struktur und Aktivität. Dies erlaubt es, den Cu^{2+} -katalysierten H_2O_2 -Zerfall als „molekulare Sonde“ zu verwenden, d.h. aus Art und Verlauf der Katalyse Rückschlüsse auf die Struktur der untersuchten Cu^{2+} -Komplexe zu ziehen.

[11] Die Wertigkeitsstufen von Cu sowie ihre relative Stabilität werden in [12], dort S. 1, diskutiert. Zu Cu^{III} vgl. auch D. P. Graddon: An Introduction to Co-ordination Chemistry. Pergamon Press, Oxford 1961, S. 34.

[12] Chr. K. Jørgensen in J. Peisach, P. Aisen u. W. E. Blumberg: The Biochemistry of Copper. Academic Press, New York 1966.

[13] B. Kirson, Bull. Soc. chim. France 1954, 157.

[14] Vgl. z.B. in [12], dort S. 9 und 131.

[15] A. S. Brill in M. Florkin u. E. H. Stotz: Comprehensive Biochemistry. Elsevier Publishing Co., Amsterdam 1966, Bd. 14, S. 447; H. Hermel u. R. Havemann, Biochim. biophysica Acta 128, 283 (1966); vgl. [42].

[16] Vgl. H. S. Mason, in [12], dort S. 339.

[17] P. Hemmerich, in [12], dort S. 15.

[18] L. L. Ingraham, Arch. Biochem. Biophysics 81, 309 (1959).

[19] L. A. Nikolaev in F. Clark u. R. Syngé: Origin of Life on the Earth. IUB Symposium. Pergamon Press, Oxford 1959, Bd. 1, S. 263; W. E. Blumberg, in [12], dort S. 49.

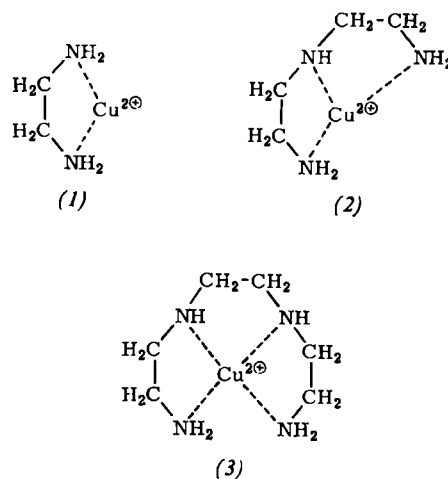
[20] J. Schubert: Copper and Peroxides in Radiobiology and Medicine. Charles C. Thomas, Publ., Springfield, Illinois/USA 1964.

[21] L. Graf u. S. Fallab, Experientia 20, 46 (1964); A. Levitzki, I. Pecht u. M. Anbar, Nature (London) 207, 1386 (1965); J. Amer. chem. Soc. 89, 1587 (1967); M. M. Taqui Khan u. A. E. Martell, ibid. 89, 7104 (1967).

2. Einfluß von Zahl und Art der koordinierten Ligandgruppen auf die Katalyse

2.1. Einfluß der Anzahl koordinierter Ligandgruppen

Es wurde mehrfach darauf hingewiesen [22, 23], daß Metallionen-Komplexe die H_2O_2 -Zersetzung nur dann begünstigen, wenn sie koordinativ nicht abgesättigt sind, d.h. noch hydratisierte, also für H_2O_2 oder HOO^- zugängliche Koordinationsstellen haben; diese seien als „frei“ bezeichnet. Der Zusammenhang zwischen katalytischer Aktivität und freien Koordinationsstellen wurde an den 1:1-Komplexen der „homologen“ Reihe Äthylendiamin (1), Bis(2-aminoäthyl)amin (Diäthylentriamin) (2) und N,N' -Bis(2-aminoäthyl)-1,2-diaminoäthan (Triäthyltetramin) (3) mit Cu^{2+} überprüft [24].



Als Maß für die katalytische Aktivität diente [23] die Anfangsgeschwindigkeitskonstante k (pseudo-erster Ordnung) des H_2O_2 -Zerfalls nach Gl. (3) [25]:

$$k = (2,30/t) \cdot \log([\text{H}_2\text{O}_2]_0/[\text{H}_2\text{O}_2]_t) \quad (\text{min}^{-1}) \quad (3)$$

Es zeigte sich auch hier, daß die katalytische Aktivität freie Koordinationsstellen erfordert, d.h. mit der Möglichkeit zur Bildung ternärer Cu^{2+} -Peroxo-Ligand-Komplexe – die sich durch das Auftreten einer Absorptionsschulter bei ca. 360 nm nachweisen lassen [23, 24] – zusammenhängt (Abb. 1): Mit der Ab-

[22] W. Langenbeck, Ber. Verh. sächs. Akad. Wiss. Leipzig, math.-naturwiss. Kl. 103, Heft 5, S. 11 (1959); M. Augustin u. W. Langenbeck, J. prakt. Chem. 19, 186 (1963); B. Kirson, Bull. Soc. chim. France 1957, 257; Proc. 7. int. Conf. Coordinat. Chem. 1962, S. 276; Z. Kováts, Magyar kém. Folyóirat (Ung. Z. Chem.) 69, 98 (1963); Chem. Abstr. 59, 2368f (1963).

[23] H. Brintzinger u. H. Erlenmeyer, Helv. chim. Acta 48, 826 (1965).

[24] H. Sigel u. U. Müller, Helv. chim. Acta 49, 671 (1966).

[25] Messungen [24]: Vor der H_2O_2 -Zugabe wurde der pH-Wert mit 2 N NaOH etwas höher als gewünscht eingestellt. Nach der H_2O_2 -Zugabe wurde der pH-Wert gemessen; zur Bestimmung der H_2O_2 -Abnahme wurden in gewissen Zeitabständen Proben entnommen, mit Titanreagens versetzt und die Extinktion bei 410 nm ($\epsilon = 737 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bestimmt; vgl. auch A. C. Egerton, A. J. Everett, G. J. Minkoff, S. Rudrakanchana u. K. C. Salvoja, Analytica Chim. Acta (Amsterdam) 10, 422 (1954). – Wenn nicht anders angegeben, wurde bei $T = 22^\circ\text{C}$ und natürlicher Ionenstärke gemessen.

nahme der Zahl der freien Koordinationsstellen am Cu^{2+} nimmt k in Abhängigkeit vom pH-Wert (= Aktivitätskurve) ebenfalls ab, d. h. es steigt der pH-Wert, bei dem die katalytische Aktivität einsetzt; beim vierfach koordinierten Komplex (3) ist sie praktisch Null. Dieser Zusammenhang sowie das Auftreten ternärer Cu^{2+} -Peroxokomplexe weist darauf hin, daß die Katalyse im Komplexverband stattfindet.

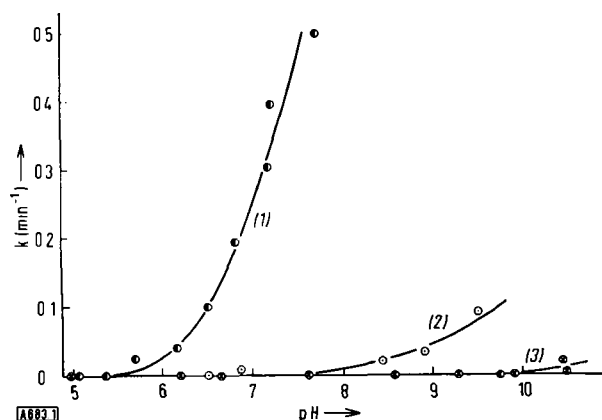


Abb. 1. Abnahme der katalytischen Aktivität der Cu^{2+} -Chelate ($4 \cdot 10^{-4}$ M) mit der Zahl der freien Koordinationsstellen am Metallion, bestimmt als Anfangsgeschwindigkeitskonstante k (min^{-1}) des H_2O_2 -Zerfalls, einer Reaktion pseudo-erster Ordnung in bezug auf H_2O_2 ($8 \cdot 10^{-3}$ M), in Abhängigkeit vom pH-Wert. (1) (●) > (2) (○) > (3) (⊙).

Allgemein gilt, daß bei Cu^{2+} -Komplexen mit zwei freien Koordinationsstellen die Katalyse des H_2O_2 -Zerfalls bereits im neutralen Bereich, bei denen mit einer einzigen freien Koordinationsstelle im schwach alkalischen einsetzt; Cu^{2+} -Komplexe ohne freie Koordinationsstelle sind katalytisch inaktiv [26, 32], wobei diese Angaben auf der Annahme basieren, daß Cu^{2+} unter den Reaktionsbedingungen die Koordinationszahl vier hat.

2.2. Einfluß von Ligandgruppen, die als H-Donoren wirken

Wie wir gezeigt haben, sind Cu^{2+} -Komplexe mit freien Koordinationsstellen katalytisch aktiv; andererseits ist bekannt, daß das $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ -System Brenzcatechin [18] und *o*-Phenylendiamin [31] oxidiert, also peroxidatisch wirksam ist. Somit stellt sich die Frage

[26] Weitere Beispiele für inaktive vierfach koordinierte Cu^{2+} -Komplexe sind diejenigen mit Cyclam (= 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan) [27], Hexamethylcyclam [28] und Äthylendiamintetraessigsäure [29].

Neueste Untersuchungen [27] des Cu^{2+} -Phthalocyanintetrasulfonsäure-Komplexes – eines nach [30] synthetisierten, reineren Präparates – zeigten, daß auch dieses System im Gegensatz zu früheren Befunden [24] katalytisch inaktiv ist. Die Annahme der Koordinationszahl vier für Cu^{2+} in wäßriger Lösung erwies sich auch in anderen Fällen als sinnvoll: D. D. Perrin, I. G. Sayce u. V. S. Sharma, J. chem. Soc. (London) A 1967, 1755.

[27] H. Erlenmeyer, P. Waldmeier u. H. Sigel, Helv. chim. Acta 51, 1795 (1968).

[28] Th. Kaden u. H. Sigel, Helv. chim. Acta 51, 947 (1968).

[29] L. Erdey u. I. Buzás, Acta chim. Acad. Sci. hung. 6, 77 (1955).

[30] J. H. Weber u. D. H. Busch, Inorg. Chem. 4, 469 (1965).

[31] S. Fallab, Chimia 15, 576 (1961).

[32] Geringe katalytische Aktivitäten von Cu^{2+} -Komplexen ohne freie Koordinationsstellen bei $\text{pH} \geq 10,5$ rühren wohl von einer teilweisen Oxidation des Liganden her (vgl. z. B. [6, 28]).

nach dem Zusammenhang zwischen der katalytischen und der peroxidatischen Aktivität von Cu^{2+} -Komplexen.

Da sich die gemessene H_2O_2 -Abnahme in einem derartigen System aus dem katalatischen [Gl. (1)] und dem peroxidatischen [Gl. (2)] H_2O_2 -Verbrauch zusammensetzen wird, sei definiert: katalytische Aktivität (gemessen am H_2O_2 -Verbrauch) = katalatische + peroxidatische Aktivität.

Als Liganden für diese Untersuchungen [33] wurden Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Adenosin-5'-monophosphat-*N*¹-oxid (AMP-*N*¹-oxid) (vgl. [34]) und native Desoxyribonucleinsäure (DNS) gewählt.

Alle drei Liganden haben im UV eine gut ausgeprägte Absorptionsbande – ATP [35] und DNS [36] bei 260 nm, AMP-*N*¹-oxid [37] bei 272 nm – so daß es möglich ist, einen Abbau der Nucleinbasen spektrophotometrisch zu verfolgen. Als Maß für die peroxidatische Aktivität diente die Anfangsgeschwindigkeitskonstante k' pseudo-erster Ordnung in bezug auf den Abbau der Basen [Gl. (4)], gemessen durch die damit verbundene Extinktionsabnahme des Systems:

$$k' = (2,30/t) \cdot \log(E_0/E_t) \quad (\text{min}^{-1}) \quad (4)$$

Die „scheinbare“ [38] Anfangsgeschwindigkeitskonstante k' ist für alle drei Komplexe in Abhängigkeit vom pH-Wert (= peroxidatische Aktivitätskurve) in Abbildung 2 dargestellt.

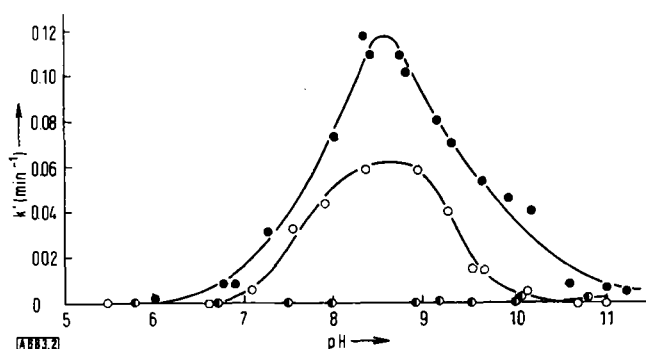


Abb. 2. Peroxidatische Aktivität ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 8 \cdot 10^{-3}$ M), bestimmt als Anfangsgeschwindigkeitskonstante k' des Nucleinbasen-Abbaus, gemessen in 1-mm-Quarzküvetten als Reaktion pseudo-erster Ordnung in bezug auf die Ligandkonzentration in Abhängigkeit vom pH-Wert für die Cu^{2+} -Komplexe ($4 \cdot 10^{-4}$ M) von ATP (●) und AMP-*N*¹-oxid (○) sowie für das Cu^{2+} -DNS-System (●) ([DNS] = 0,04-proz.; $[\text{Cu}^{2+}] = 4 \cdot 10^{-4}$ M, d. h. auf ein Cu^{2+} kommen ca. 2,5 Nucleotid-Einheiten [33]).

Vergleicht man die katalytische [33] Aktivität (Abb. 1) mit der peroxidatischen (Abb. 2) [39], so fällt zweierlei auf:

1. Die peroxidatische Aktivität zeigt bei $\text{pH} \approx 8,5$ ein Maximum (vgl. hierzu [33]), während die katalytische im untersuchten pH-Bereich „gleichmäßig“ zunimmt.

[33] H. Sigel u. H. Erlenmeyer, Helv. chim. Acta 49, 1266 (1966).

[34] Beide Komplexe sind im entscheidenden pH-Gebiet ($\text{pH} \geq 7$) praktisch vollständig ausgebildet; vgl. [33].

[35] R. Phillips, Chem. Reviews 66, 501 (1966).

[36] G. L. Eichhorn, P. Clark u. E. D. Becker, Biochemistry (Washington) 5, 245 (1966).

[37] H. Sigel u. H. Brintzinger, Helv. chim. Acta 47, 1701 (1964); H. Sigel u. B. Priejs, ibid. 50, 2357 (1967).

[38] „Scheinbar“ deshalb, weil die unbekannte Extinktion der Nucleinbasen-Abbauprodukte jeweils von der gemessenen Extinktion abgezogen werden sollte; die Übereinstimmung der k' -Werte zu verschiedenen Zeiten war allerdings recht gut, was auf einen kleinen Extinktionskoeffizienten der Abbauprodukte hindeutet.

[39] In allen drei Fällen werden, wie zu erwarten, auch ternäre Cu^{2+} -Peroxokomplexe gebildet [33].

2. Obwohl alle drei Systeme katalytisch aktiv sind, werden nur die Basen der beiden Nucleotid-Komplexe, nicht aber die des Cu^{2+} -DNS-Systems abgebaut (vgl. Abb. 2).

Aus diesen Befunden läßt sich schließen:

1. Der peroxidatische Abbau der Nucleinbasen erfolgt nicht durch frei auftretende radikalische Folgeprodukte des katalytischen H_2O_2 -Zerfalls – beide Reaktionen müßten sonst parallel verlaufen. Freie Radikale – z.B. HO^\bullet – würden zudem auch beim Cu^{2+} -DNS-System wohl bis zu den Nucleinbasen in die Helix eindringen (vgl. Abschnitt 4.2.–4.4.).

2. Der Abbau läuft offenbar in der Koordinationssphäre des Metallions ab und hat somit zur Voraussetzung, daß die Nucleinbasen komplex gebunden sind, was beim Cu^{2+} -ATP-^[35] und AMP- N^1 -oxid-Komplex^[37] der Fall ist, nicht jedoch im Cu^{2+} -DNS-System^[36].

3. Da offenbar sowohl die katalytische als auch die peroxidatische Reaktion im Komplexverband ablaufen, ist zu vermuten, daß äußere Faktoren bestimmen, ob der gemeinsame „Zwischen“-Komplex die eine oder die andere Reaktion^[40] eingeht (vgl. auch^[33]).

Die bisher zusammengefaßten Beobachtungen über den Einfluß der Zahl und der Art der koordinierten Ligandgruppen auf das katalytische und peroxidatische Verhalten von Cu^{2+} -Komplexen deuten auf die Möglichkeit hin, aus diesem „strukturspezifischen“ Verhalten von Cu^{2+} -Komplexen unbekannter Struktur Rückschlüsse auf die Koordinationssphäre dieser Komplexe zu ziehen, d.h. den Metallionen-katalysierten H_2O_2 -Zerfall als „molekulare Sonde“ zu verwenden.

3. Die katalytische Aktivität als „Sonde“

3.1. N,N' -Diglycyläthylendiamin und „Homologe“

Als Modell zur Klärung der Korrelation zwischen katalytischer Aktivität und Anzahl freier Koordinationsstellen bei Cu^{2+} -Komplexen schienen die von Zuberbühler und Fallab^[43] auf ihre Komplexbildung untersuchten homologen Liganden N,N' -Diglycyläthylendiamin, N,N' -Diglycyl-1,3-diaminopropan und N,N' -Diglycyl-1,5-diaminopentan, die wie Polypeptide Amid- und Aminogruppen als Haftstellen aufweisen, besonders geeignet^[44].

Der Cu^{2+} -Komplex (6) katalysiert den H_2O_2 -Zerfall sehr stark (s. Abb. 3): Die Aktivitätskurve verläuft im

Bereich der Cu^{2+} -Komplexe mit zwei freien Koordinationsstellen (vgl. Abb. 1). Der Cu^{2+} -Komplex (5) hingegen ist inaktiv, analog den untersuchten Cu^{2+} -Komplexen ohne „freie“ Koordinationsstelle am Zentralion.

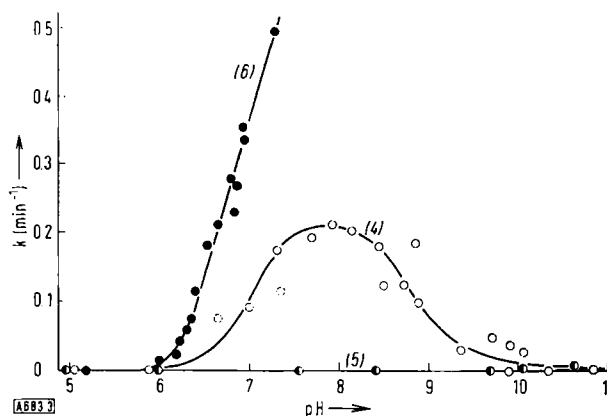
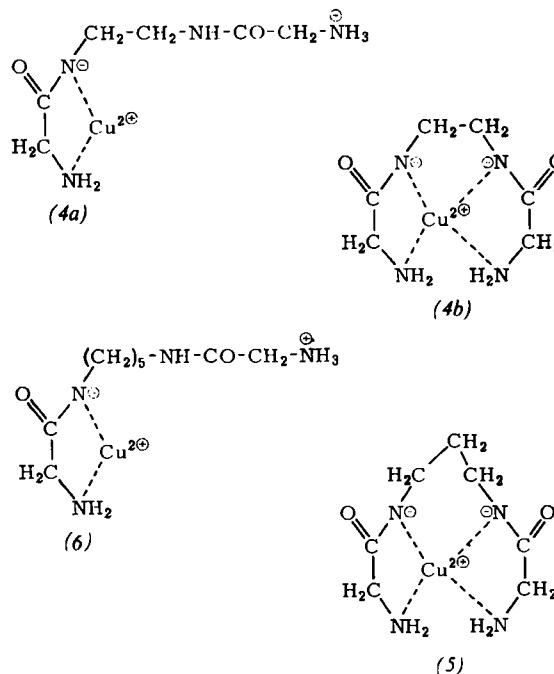


Abb. 3. Katalytische Aktivität der Cu^{2+} -Komplexe ($4 \cdot 10^{-4}$ M) (4) (○), (5) (●) und (6) (●), bestimmt als Anfangsgeschwindigkeitskonstante k (min^{-1}) einer Reaktion pseudo-erster Ordnung in bezug auf H_2O_2 ($8 \cdot 10^{-3}$ M).

Beim Cu^{2+} -Komplex (4) erreicht die Aktivität bei $\text{pH} \approx 8$ ein Maximum und sinkt dann bei $\text{pH} \approx 10$ wiederum auf praktisch Null; der Cu^{2+} -Komplex (4a) mit zwei freien Koordinationsstellen geht offenbar in den vierfach koordinierten Komplex (4b) über.



[40] Ähnliches wurde von Kremer [41] bei einer Studie über die häminkatalysierte Oxidation von Ascorbinsäure gefunden. – Auch die Katalase zeigt peroxidatische Eigenschaften, falls sich im Reaktionsmilieu relativ wenig H_2O_2 , dafür aber ein H-Donor [42] befindet. Auch hier kann also die Reaktion durch die Wahl der Versuchsbedingungen in die eine oder andere Richtung gelenkt werden.

[41] M. L. Kremer, Trans. Faraday Soc. 63, 1208 (1967).

[42] H. Aebi u. A. Hassan, Helv. chim. Acta 43, 544 (1960).

[43] A. Zuberbühler u. S. Fallab, Helv. chim. Acta 50, 889 (1967).

[44] H. Erlenmeyer, U. Müller u. H. Sigel, Helv. chim. Acta 49, 681 (1966).

Diesen Befunden^[44] entsprechen die aus potentiometrischen und spektrophotometrischen Daten abgeleiteten Strukturen^[43], wonach N,N' -Diglycyläthylendiamin in Abhängigkeit vom pH-Wert Cu^{2+} -Komplexe mit zwei freien Koordinationsstellen sowie Komplexe ohne solche Stellen bilden kann.

Der primär ohne Deprotonierung der Amidgruppe gebildete Cu^{2+} -Komplex verliert bei $\text{pH} = 5,49$ ein Amidproton unter Bildung des katalytisch aktiven (4a); mit $\text{pK}_\text{A} = 6,51$ tritt ein Ammoniumproton und mit $\text{pK}_\text{A} = 8,21$ unter Bildung

des inaktiven (4b) das Proton der zweiten Amidgruppe aus. — Bei *N,N'*-Diglycyl-1,5-diaminopentan verliert der primäre Komplex bei pH = 5,49 ein Amidproton unter Bildung von (6). Die Ammoniumgruppe wird bei $pK_A = 7,47$ deprotoniert, koordiniert aber nach [43] nicht, sodaß — in Übereinstimmung mit den katalytischen Befunden — in diesem Bereich ein Komplex mit zwei freien Koordinationsstellen vorliegt. Erst nach Deprotonierung der zweiten Amidgruppe ($pK_A = 10,30$) wird ein (4b) analoger Komplex gebildet [43].

N,N'-Diglycyl-1,3-diaminopropan bildet bei pH = 5,61 mit Cu^{2+} unter Besetzung aller vier Koordinationsstellen den katalytisch inaktiven Komplex (5); das zweite Ammonium- und ebenso das zweite Amidproton werden in einem Schritt mit $pK_{A(2H)} = 11,33$ abgegeben [43].

Die pH-abhängige Extinktion bei 360 nm (= Extinktionskurven, Abb. 4), die das Auftreten ternärer Peroxokomplexe anzeigt, verläuft bei allen drei Liganden analog den entsprechenden Aktivitätskurven von Abbildung 3 [44].

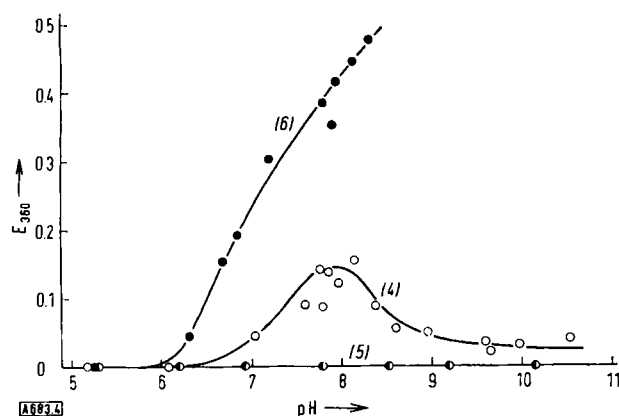


Abb. 4. Bildung ternärer Cu^{2+} -Peroxokomplexe in H_2O_2 -haltigem Milieu ($8 \cdot 10^{-3}$ M), gemessen an der Extinktionszunahme bei 360 nm (1-cm-Quarzkuvetten) in Abhängigkeit vom pH-Wert für die Cu^{2+} -Komplexe ($4 \cdot 10^{-4}$ M) (4) (O), (5) (●) und (6) (●).

Die mit diesen Liganden erzielten Ergebnisse bestätigen demnach die Schlüssigkeit der ermittelten Korrelation zwischen katalytischer Aktivität von Cu^{2+} -Komplexen und Zahl der freien Koordinationsstellen.

3.2. Glycinamid

Die Aktivitätskurve (Abb. 5) [44] des Cu^{2+} -Glycinamid-(1:1)-Chelates (7a) beginnt wie zu erwarten im Bereich der Cu^{2+} -Komplexe mit zwei freien Koordinationsstellen (vgl. Abb. 1), jedoch bei etwas höherem pH-Wert als diejenige des Komplexes (6), zu welcher sie dann aber zunächst etwa parallel verläuft. Der etwas spätere Beginn (vgl. Abb. 3) rührt daher, daß der primär gebildete Cu^{2+} -Glycinamid-Komplex sein Amidproton [45] unter Übergang in den aktiveren Komplex (7a) [46] erst bei höherem pH-Wert verliert als der entsprechende Komplex von *N,N'*-Diglycyl-

[45] Daß der Cu^{2+} -Komplex von Glycinamid sein Amidproton verliert, haben schon S. P. Datta u. B. R. Rabin festgestellt, Biochim. biophysica Acta 19, 572 (1956); vgl. auch N. C. Li, B. E. Doody u. J. M. White, J. Amer. chem. Soc. 79, 5859 (1957).

[46] Für den nicht deprotonierten Komplex wäre eine ähnliche Aktivität wie beim Cu^{2+} /Glycin(1:1)-System zu erwarten (vgl. [24]).

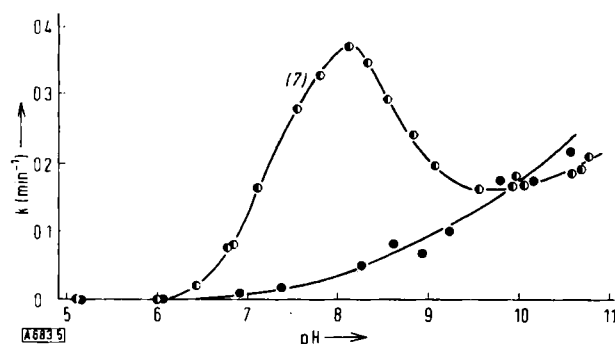
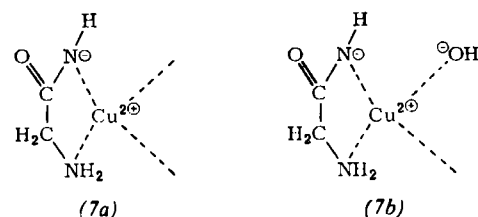


Abb. 5. Katalytische Aktivität von Cu^{2+} -Glycinamid (7) (O) ($4 \cdot 10^{-4}$ M) sowie zum Vergleich von Cu^{2+} -Glycylglycin (●) — bestimmt als Anfangsgeschwindigkeitskonstante k (min⁻¹) des H_2O_2 -Zerfalls, einer Reaktion pseudo-erster Ordnung in Bezug auf H_2O_2 ($8 \cdot 10^{-3}$ M).

1,5-diaminopentan. Der nicht koordinierte „Rest“ in (6) scheint somit die katalytische Aktivität nicht zu beeinflussen.

Erstaunlich ist nun, daß sich diese Parallelität in der Aktivität von (6) und (7a) auf den niedrigen pH-Bereich beschränkt: Die katalytische Aktivität des Cu^{2+} -Glycinamid-Komplexes erreicht bei pH ≈ 8 ein Maximum, nimmt dann wieder ab und erreicht bei pH ≈ 9,5 ungefähr diejenige der Cu^{2+} -Komplexe mit einer einzigen freien Koordinationsstelle (Abb. 5). Dies führte zur Vermutung, daß bei pH > 8 eine der beiden freien Koordinationsstellen durch OH^- besetzt wird und ein Komplex der Struktur (7b) entsteht.



Diese Befunde ließen sich potentiometrisch [47] bestätigen: Der primäre Cu^{2+} -Glycinamid-1:1-Komplex wird mit $pK_{CuHL}^H = 7,01$ deprotoniert und bildet den Komplex (7a) mit zwei freien Koordinationsstellen; dieser hydrolysiert mit $pK_{CuL(H_2O)_x}^H = 8,07$ und geht in (7b) mit einer freien Koordinationsstelle über.

Die Extinktionskurve von (7) bei 360 nm [44] zeigt im Gegensatz zur Aktivitätskurve kein Maximum, sondern ab pH ≈ 7 Sättigungscharakter. Die Bildung des gelben ternären Komplexes wird also durch die Besetzung der dritten Koordinationsstelle durch OH^- nicht beeinflusst [48], d.h. er benötigt zu seiner Bildung nur eine freie Koordinationsstelle, der für die Katalyse verantwortliche „aktive“ Komplex dagegen offenbar zwei [49] (vgl. auch [24, 33] und Abschnitt 5.).

[47] H. Sigel, Angew. Chem. 80, 124 (1968); Angew. Chem. internat. Edit. 7, 137 (1968).

[48] $[HOO^-]$ beträgt bis pH ≈ 10,5 jeweils ungefähr das 1,2-fache der entsprechenden $[OH^-]$ bei einem bestimmten pH. — $pK_{H_2O_2}^H = 11,81$; V. A. Kargin, Z. anorg. allg. Chem. 183, 77 (1929).

[49] In Übereinstimmung hiermit verläuft die katalytische Aktivität bei den dreifach besetzten Cu^{2+} -Chelaten entgegen der spektrochemischen Reihe, d.h. sie nimmt mit zunehmender Ligandfeldstärke und Komplexstabilität ab, weil mit dieser das Freimachen einer zweiten Koordinationsstelle immer schwieriger wird [24].

3.3. Poly- α ,L-lysin-Peptide

Da Polyamino-säuren als Enzymmodelle besonders geeignet sind [50], wurden die Cu^{2+} -Komplexe von Poly- α ,L-lysin-670, -58 und -14 [51] mit den Cu^{2+} -Komplexen von L-Lysin und L-Lysyl- α ,L-lysin im Hinblick auf die Katalyse des H_2O_2 -Zerfalls verglichen [52]. Dabei zeigte sich erstaunlicherweise, daß trotz der großen Zahl potentieller Haftstellen der Poly- α ,L-lysine die katalytische Aktivität ihrer Cu^{2+} -Systeme (Abb. 6) im Gebiet der Cu^{2+} -Komplexe mit zwei freien Koordinationsstellen liegt (vgl. Abb. 1) [53].

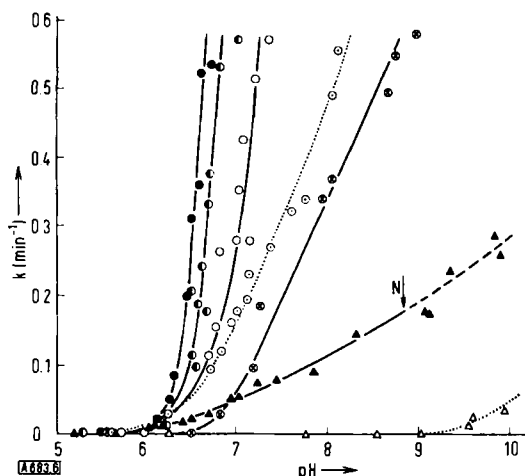


Abb. 6. Katalytische Aktivität der Cu^{2+} -Systeme (Cu^{2+} :Lysin-Einheit = 1:15; $[\text{Cu}^{2+}] = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) von Poly- α ,L-lysin-670 (●) und -58 (○) sowie der Cu^{2+} :1:1-Systeme ($4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) von Poly- α ,L-lysin-14 (○), L-Lysyl- α ,L-lysin (⊕) und L-Lysin (Δ), gemessen als Anfangsgeschwindigkeitskonstante k (min^{-1}) pseudo-erster Ordnung in bezug auf H_2O_2 ($8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) in Abhängigkeit vom pH-Wert. Zum Vergleich (punktierter Kurven) ist k auch für das Poly- α ,L-lysin-14-(2:1)-System (○) (d.h. 2 Cu^{2+} pro Ligand-Molekül) und das Cu^{2+} -L-Lysin-(1:15)-System (Δ) aufgetragen (s. auch [52]).

Da, wie in Abschnitt 2.2. gezeigt, Ligandgruppen durch H_2O_2 nur dann oxidiert werden, wenn sie sich in der Koordinationssphäre des Cu^{2+} befinden [33] und einige Cu^{2+} -Peptid-Komplexe [54] durch H_2O_2 tatsächlich abgebaut werden, wurde im Cu^{2+} -Poly- α ,L-lysin-58-System vor und nach der katalytischen Reaktion [55] das Molekulargewicht bestimmt [52]. Daß das durchschnittliche Molekulargewicht nur um 30–40% abnimmt, deutet auf eine nur geringe Beteiligung der Amidgruppe an der Komplexbildung in diesem pH-

[50] E. Katchalski, M. Sela, H. I. Silman u. A. Berger in H. Neurath: The Proteins. Academic Press, New York 1964, 2. Aufl., Bd. 2, S. 405.

[51] Die dem Namen angefügte Zahl gibt den Polymerisationsgrad an.

[52] H. Sigel u. G. Blauer, Helv. chim. Acta 51, 1246 (1968).

[53] Der Vergleich der Aktivitätskurve des Cu^{2+} -L-Lysin (Abb. 6) mit derjenigen des Cu^{2+} -Glycylglycin(1:1)-Komplexes (Abb. 5) deutet auf eine wenigstens zum Teil dreifache Besetzung des Cu^{2+} im Lysin-Komplex hin. Diese ist denkbar (Kalottenmodell), obwohl ein solcher Komplex sicherlich nicht sehr stabil ist. Vielleicht wird die dritte Koordinationsstelle auch durch OH^- besetzt, ähnlich wie beim Cu^{2+} -Glycinamid-Komplex (vgl. 3.2.). — Zum Einfluß der Endgruppen und des positiven Feldes des Polymeren auf die Katalyse vgl. [52].

[54] H. Erlenmeyer, H. Sigel, H. Ch. Curtius u. P. Anders, Helv. chim. Acta 49, 19 (1966).

[55] Die Reaktionslösung stand einen Tag bei $\text{pH} = 7$; übrige Bedingungen wie in Abb. 6 angegeben.

Gebiet hin — was auch aus rein koordinationschemischen Gründen zu erwarten ist [56] —, so daß diese wohl vorwiegend über zwei ϵ -Aminogruppen erfolgt. Dies stimmt mit der Interpretation von Moriguchi [58] überein, der eine Beteiligung von Amidgruppen bei der Komplexbildung zwischen Cu^{2+} und Poly- α ,L-lysin erst im pH-Gebiet um 12 annimmt.

Auch bei den Cu^{2+} -Komplexen von Glycylglycinamid, Polymyxin B [44] sowie bei einigen Oligo- oder Polymeren von Glycin und L-Glutaminsäure [52] lassen sich mit dieser „Sonde“ aufgrund der katalytischen Aktivität Aussagen über die Komplexstruktur gewinnen [59].

4. Die peroxidatische Aktivität als „Sonde“

In Abschnitt 2.2. wurde gezeigt, daß eine peroxidatische Aktivität dann auftreten kann, wenn sich eine oxidierbare Gruppe in der Koordinationssphäre des Metallions befindet. Umgekehrt soll nun gezeigt werden, daß eine Aussage über den Ort, an dem ein Metallion koordiniert ist, dadurch möglich ist, daß der peroxidatische Abbau einer bestimmten Gruppe nachgewiesen wird.

4.1. 5'-Triphosphate der Ribonucleoside Adenosin, Inosin, Guanosin, Cytidin, Uridin und Thyminid [60]

Vom Cu^{2+} -Komplex des ATP ist bekannt (s. Abschnitt 2.2.) [35], daß neben der Triphosphatkette auch das Adeninsystem unter Bildung eines Makrochelates an das Metallion koordiniert ist und daß dementsprechend das Adeninsystem durch H_2O_2 abgebaut wird. Beim Cu^{2+} -ITP-Komplex nehmen Schneider und Brintzinger [61] ebenfalls ein derartiges Makrochelate an; nachgewiesen wurde ein solches kürzlich im Co^{2+} -ITP-Komplex von Sternlicht et al. [62]. Durch Messen der peroxidatischen Aktivität ließ sich nun eine Aussage auch über die Komplexstrukturen anderer Cu^{2+} -Nucleosidtriphosphatkomplexe gewinnen [63, 64].

Die „scheinbaren“ [38] Anfangsgeschwindigkeitskonstanten k' des peroxidatischen Abbaus der Nucleinbasen in den Cu^{2+} -Komplexen von ATP (vgl. Abschnitt 2.2.), ITP, GTP, CTP, UTP und TTP sind in

[56] Die Beteiligung der Amidgruppe an der Komplexbildung ist koordinationschemisch [57] nicht sehr wahrscheinlich: So bildet z. B. Glycinamid mit Cu^{2+} einen an der Amidgruppe deprotonierten Komplex [47], β -Alaninamid dagegen nicht mehr [57].

[57] P. Hemmerich, Th. Kaden u. H. Sigel, unveröffentlicht.

[58] Y. Moriguchi, Bull. chem. Soc. Japan 39, 2656 (1966).

[59] Für Ni^{2+} -Komplexe vgl. R. Zell u. H. Sigel, Helv. chim. Acta 49, 870 (1966); H. Sigel u. H. Ch. Curtius, Experientia 22, 649 (1966).

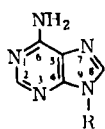
[60] Abkürzungen für die 5'-Triphosphate: ATP, ITP, GTP, CTP, UTP, TTP.

[61] P. W. Schneider u. H. Brintzinger, Helv. chim. Acta 47, 1717 (1964).

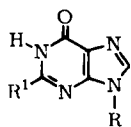
[62] H. Sternlicht, R. G. Shulman u. E. W. Anderson, J. chem. Physics 43, 3133 (1965).

[63] H. Sigel, Helv. chim. Acta 50, 582 (1967).

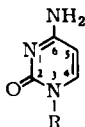
[64] Der Cu^{2+} -ATP-Komplex ist ab $\text{pH} = 7$, also im entscheidenden pH-Gebiet, zu mehr als 96% ausgebildet [33]. Dasselbe gilt wohl auch für die übrigen Cu^{2+} -Nucleotid-Komplexe (vgl. hierzu [63]).



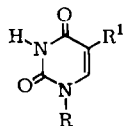
ATP



ITP: $R^1 = H$
GTP: $R^1 = NH_2$



CTP



UTP: $R^1 = H$
TTP: $R^1 = CH_3$ $R = \text{Ribosyl-5'-triphosphat}$

Abhängigkeit vom pH-Wert in Abbildung 7 dargestellt. Abbildung 8 gibt die katalytische Aktivität wieder; wie zu erwarten, lassen sich in allen Fällen auch Extinktionskurven messen (vgl. [63]). Bei allen untersuchten Nucleotid-Komplexen ist aus der – wenn auch unterschiedlichen – peroxidatischen Aktivität (Abb. 7) zu schließen, daß die Basen an der Komplexbildung – in Analogie zum Cu^{2+} -ATP-Komplex [35] – unter Bildung von Makrochelaten beteiligt sind (vgl. [65]).

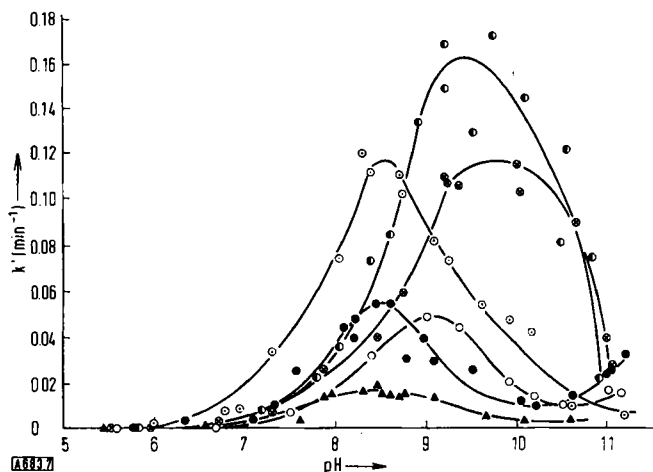


Abb. 7. Peroxidatische Aktivität ($[H_2O_2] = 8 \cdot 10^{-3} M$), bestimmt als Anfangsgeschwindigkeitskonstante k' (min^{-1}) des Nucleinbasen-Abbaus, gemessen als Reaktion pseudo-erster Ordnung in bezug auf die Ligandkonzentration, in Abhängigkeit vom pH-Wert für die Cu^{2+} -Komplexe ($4 \cdot 10^{-4} M$) von ATP (○), ITP (□), GTP (○), CTP (▲), UTP (●) und TTP (○). (Die Extinktionen wurden jeweils beim Maximum oder bei pH-abhängigen Spektren am isosbestischen Punkt gemessen [63].)

Die katalytische Aktivität (Abb. 8) nimmt bei den Cu^{2+} -Komplexen von CTP, UTP, TTP und ATP über den ganzen Bereich mit steigendem pH-Wert zu, bei den Komplexen von ITP und GTP erreicht sie dagegen bei $pH \approx 10$ ein Maximum und fällt dann bis $pH \approx 11$ wieder steil ab. Dies hängt wohl damit zusammen, daß die Nucleinbasen von ITP und GTP zwei potentielle Koordinationsstellen haben, nämlich N-7 und den Sauerstoff an C-6. Die gleichzeitige Koordination von Cu^{2+} an diese Haftstellen sowie an zwei Phosphatgruppen – wie sie vom Cu^{2+} -ATP-Komplex bekannt ist [35] – führt zu einem inaktiven Komplex (vgl. [63, 66]).

[65] H. Sigel, European J. Biochem. 3, 530 (1968).

[66] Daß die peroxidatische Aktivität (Abb. 7) in allen Fällen wieder abnimmt, hängt wahrscheinlich mit der beobachteten Hydrolyse [65] der Cu^{2+} -Nucleotid-Komplexe zusammen.

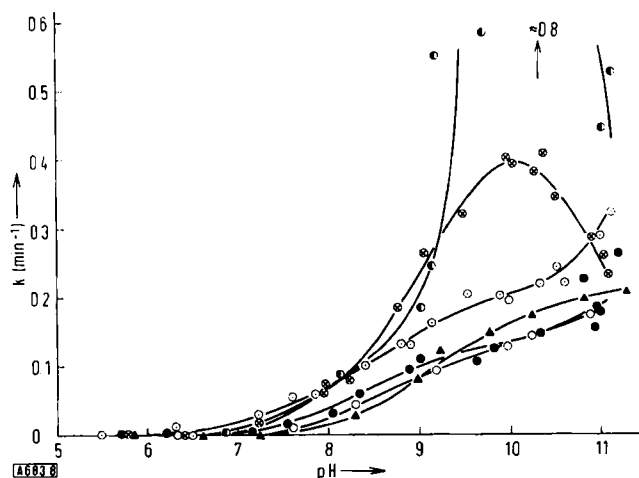


Abb. 8. Katalytische Aktivität, bestimmt als Anfangsgeschwindigkeitskonstante k (min^{-1}) des H_2O_2 -Zerfalls, gemessen als Reaktion pseudo-erster Ordnung in bezug auf H_2O_2 ($8 \cdot 10^{-3} M$), in Abhängigkeit vom pH-Wert für die Cu^{2+} -Komplexe ($4 \cdot 10^{-4} M$) von ATP (○), ITP (□), GTP (○), CTP (▲), UTP (●) und TTP (○).

Daß in den untersuchten Nucleotid-Komplexen die Base – zumindest im Gleichgewicht – an der Komplexbildung beteiligt ist, sollte sich im Falle von ITP, GTP, UTP und TTP, die an N-1 ein Proton tragen, in der Senkung des pK_A -Wertes dieses Protons äußern. Dies konnte tatsächlich eindeutig gezeigt werden [65]:

$$\Delta pK_A = pK_{HL}^H - pK_{CuHL}^H \quad (5)$$

Die Acidifizierung [Gl. (5)] [67] des N-1-Protons infolge der Komplexbildung mit Cu^{2+} beträgt in allen vier Fällen $\approx 2,0$ pK-Einheiten; sie ist also von derselben Größenordnung wie im Cu^{2+} -Guanosin-Komplex ($\Delta pK_A = 2,2$ [65]), in welchem das Metallion nur über die Nucleinbase koordiniert. Dies bestätigt die Teilnahme der Nucleinbasen an der Komplexbildung in den untersuchten Cu^{2+} -Nucleotid-Komplexen [68]. Die Frage, an welchen Stellen der Nucleinbase das Metallion koordiniert, wurde bereits früher diskutiert [63].

4.2. Native RNS und native sowie durch Cu^{2+} denaturierte DNS

Für die Sekundär- und die Tertiärstruktur von Desoxyribonucleinsäure (DNS) wurde von Watson und Crick sowie weiteren Autoren [4] ein Helix-Modell entwickelt, das heute allgemein anerkannt ist. In Analogie zur DNS ist auch bei der Ribonucleinsäure (RNS) eine räumlich geordnete Struktur sowie eine gewisse Basenpaarung [4] zu erwarten. Die Nucleinbasen sind hier jedoch offenbar weniger „geschützt“ als bei der DNS. Dies stimmt mit der peroxidatischen

[67] $K_{HL}^H = [H^+][L]/[HL]$; $K_{CuHL}^H = [H^+][CuL]/[CuHL]$.

[68] Verdrängt man in den Cu^{2+} -Nucleotid-Komplexen die Nucleinbasen aus der Koordinationsphäre des Cu^{2+} durch die Komplexbildung mit 2,2'-Bipyridyl (vgl. [69]), so sinkt die Acidifizierung auf nur noch ca. 0,6 pK-Einheiten [65].

[69] H. Sigel, K. Becker u. D. B. McCormick, Biochim. biophys. Acta 148, 655 (1967). Zur Bedeutung ternärer Komplexe vgl. [70].

[70] H. Sigel, Chimia 21, 489 (1967).

Aktivität (gemessen bei 260 nm) überein^[71]: Die Nucleinbasen im Cu^{2+} -RNS-System werden – im Gegensatz zu denjenigen des Cu^{2+} -DNS-Systems – durch H_2O_2 abgebaut, d. h. Cu^{2+} muß hier mindestens zum Teil an die Nucleinbasen gebunden sein.

Auch im Cu^{2+} -DNS-System kann jedoch ein Nucleinbasen-Abbau nachgewiesen werden, nämlich dann, wenn man eine DNS-Lösung nach Zusatz von Cu^{2+} eineinhalb Tage stehen läßt und erst dann auf ihre peroxidatische Aktivität untersucht^[71]. Eine Vergleichslösung, der Cu^{2+} erst kurz vor der Messung zugesetzt wurde, ist hingegen peroxidatisch inaktiv. Cu^{2+} destabilisiert also bei längerer Einwirkung die Watson-Crick-Struktur (vgl. auch^[36]) und dringt in die Doppelhelix der so denaturierten DNS ein. Dieses Ergebnis ergänzt die Befunde von *Hiai*^[72], nach welchen Cu^{2+} die thermische Denaturierung von DNS fördert. Von Metallionen ist ein derartiges Verhalten zu erwarten, da sie in der Lage sind, H-Brücken unter Koordination zu spalten.

Eine katalytische Aktivität, wenn auch von unterschiedlicher Stärke, ist in allen drei Systemen zu beobachten, ebenso das Auftreten ternärer Peroxokomplexe^[71].

4.3. Thermisch denaturierte DNS

Bei der Denaturierung durch Hitze ändert DNS ihre Extinktion bei 260 nm^[36, 72]. Dies wird auf eine teilweise Aufhebung der Nucleinbasenpaarung zurückgeführt, die sich auch in einer Zunahme der peroxidatischen Aktivität äußern sollte. Denaturiert man DNS-Lösungen durch Erhitzen und fügt Cu^{2+} und H_2O_2 zu^[71], so zeigt sich, daß die peroxidatische Aktivität mit zunehmender Denaturierung der DNS steigt (Abb. 9). Dies bestätigt, daß die Denaturierung mit dem Öffnen der Doppelhelix gekoppelt ist und hierdurch die Basen für eine Komplexbildung mit Cu^{2+} freigelegt werden. Die Untersuchung der peroxidatischen Aktivität eines Cu^{2+} -DNS-Systems kann somit zur Unterscheidung von nativer und denaturierter DNS dienen.

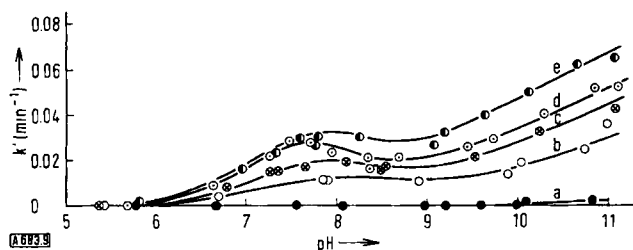


Abb. 9. Peroxidatische Aktivität der Cu^{2+} -Komplexe von thermisch denaturierter DNS ([DNS] = 0,04-proz.; $[\text{Cu}^{2+}] = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$), bestimmt als Anfangsgeschwindigkeitskonstante k' (min^{-1}) des Nucleinbasen-Abbaus (pseudo-erster Ordnung), gemessen in 1-mm-Quarzküvetten bei 260 nm. DNS-Lösungen (0,1-proz.): a) nicht denaturiert (●) — als Vergleich; b) auf 50 °C erwärmt (○); c) auf 95 °C erwärmt und 1 min so belassen (⊙); d) auf 95 °C erwärmt und 5 min so belassen (⊗); e) auf 95 °C erwärmt und 15 min so belassen (⊕).

[71] H. Sigel, B. Prijs u. H. Erlenmeyer, *Experientia* 23, 170 (1967).

[72] S. Hiai, *J. molecular Biol.* 11, 672 (1965).

Die katalytische Aktivität (vgl.^[71]) nimmt mit zunehmender Denaturierung mehr zu als es dem H_2O_2 -Verbrauch infolge zunehmender peroxidatischer Aktivität entspricht, woraus folgt, daß auch die katalytische Aktivität steigt. Dies hängt wohl damit zusammen, daß *N*-Chelate katalytisch aktiver sind als *O*-Chelate^[23, 24]: Die unterschiedliche Ladung der Komplexe — *N*-Chelate sind meist positiv und *O*-Chelate meist negativ geladen — wirkt sich sicherlich auf die Bildung ternärer Cu^{2+} -Peroxokomplexe mit HOO^- aus (vgl.^[70]).

4.4. Denaturierung von DNS in Abhängigkeit vom pH-Wert — stabilisierender Einfluß von LiCl, NaCl, KCl und MgCl_2

Es wurden 0,05-proz. wäßrige DNS-Lösungen bereitet, indem je 7,5 mg DNS in 15 ml H_2O während 16 Std. ($T = 22^\circ \text{C}$) bei verschiedenen pH-Werten unter langsamen Rühren gelöst wurden. Nach dieser Zeit wurden mehrere Proben entnommen, mit Cu^{2+} und H_2O_2 versetzt und zwischen pH = 5,5 und 10,5 auf ihre peroxidatische Aktivität (bei 260 nm) untersucht^[73]. Aus den so gewonnenen Kurven der peroxidatischen Aktivität (Abb. 10) wird der Einfluß der H^+ -Konzentration auf die Stabilität der DNS deutlich: Die peroxidatische Aktivität der Proben ist umso größer, je größer die H^+ -Konzentration der DNS-Lösungen war^[74].

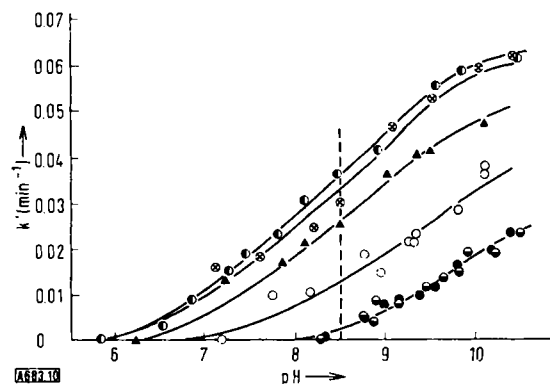


Abb. 10. Peroxidatische Aktivität der Cu^{2+} -Komplexe von 16 Std. bei verschiedenen pH-Werten [pH = 3,0 (●); pH = 4,0 (⊙); pH = 4,5 (▲); pH = 5,0 (○); pH = 6,0 (●); pH = 10,0 (⊗)] gealterten DNS-Lösungen (0,05-proz.; $T = 22^\circ \text{C}$), bestimmt als Anfangsgeschwindigkeitskonstante (pseudo-erster Ordnung) k' (min^{-1}) des Nucleinbasen-Abbaus. Konzentrationen der Meßlösungen: [DNS] = 0,01-proz.; $[\text{Cu}^{2+}] = 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, gemessen bei 260 nm in 2-mm-Quarzküvetten.

Ermittelt man durch Messung der peroxidatischen Aktivität der Cu^{2+} -Komplexe das Ausmaß der Denaturierung bei pH-Werten zwischen 3 und 13 (vgl. Abb. 10) und trägt die für k' aus den so erhaltenen Kurven bei pH = 8,5 abgelesenen Werte gegen den pH-Wert der DNS-Lösungen auf, so erhält man eine Kurve mit „wannenförmigem“ Verlauf (Abb. 11), wie ihn auch *Grechko et al.*^[75] fanden, welche die Denaturierung durch die Hyperchromie und die Veränderung der Viskosität charakterisierten. Abbildung 11 zeigt ein-

[73] H. Erlenmeyer, R. Griesser, B. Prijs u. H. Sigel, *Biochim. biophysica Acta* 157, 637 (1968).

[74] Ein Vergleich von Abb. 9 und 10 zeigt, daß verdünntere DNS-Lösungen gegen Denaturierung anfälliger sind als konzentriertere.

[75] V. Grechko, R. N. Maslova, L. Shkarenkova u. Ya. M. Varshavsky, *Abh. dtsh. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Med.* 1964, 295.

drücklich, daß die DNS nur in den "extremen" pH-Bereichen merklich denaturiert wird. In Lösungen mit pH = 6 bis 11 ist die Helix der DNS weitgehend stabil, und die Nucleinbasen sind damit für Cu^{2+} nicht zugänglich.

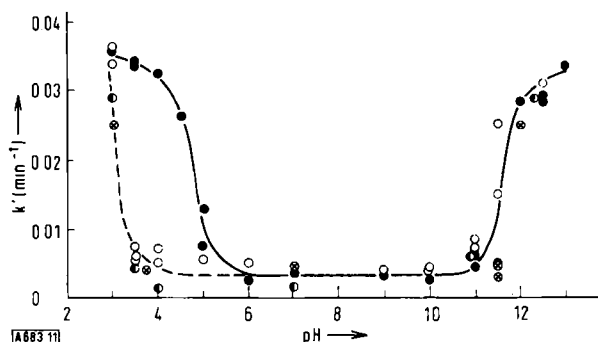


Abb. 11. Denaturierung von DNS unter dem Einfluß des pH-Wertes (●) der Lösung sowie stabilisierender Einfluß von LiCl (⊗), NaCl (○) und KCl (⊙). Als Maß für die Denaturierung der DNS diente die peroxidatische Aktivität (k') nach Zugabe von Cu^{2+} und H_2O_2 , wobei die Messungen wie in Abbildung 10 gezeigt durchgeführt wurden. In der Abbildung sind die aus solchen Aktivitätskurven bei pH = 8,5 (vgl. Abb. 10) entnommenen k' -Werte eingezeichnet.

Führt man die Denaturierung^[73] in 0,05 M LiCl-, NaCl- oder KCl-Lösung durch, so findet man ab pH ≈ 6 etwa den gleichen Aktivitätsverlauf. Im unteren pH-Gebiet üben die Salze jedoch eine Schutzwirkung aus; der Aktivitätsanstieg setzt erst bei einem $\approx 1,5$ Einheiten niedrigeren pH-Wert ein (vgl. Abb. 11). Die Schutzwirkung von MgCl_2 ist noch ausgeprägter: $5 \cdot 10^{-4}$ M MgCl_2 übte etwa die gleiche Wirkung aus wie die einwertigen Salze in 0,05 M Lösung. Diese größere stabilisierende Wirkung von Mg^{2+} wurde auch von Barber^[76] festgestellt. Sie beruht wohl auf der größeren Komplexbildungstendenz von Mg^{2+} gegenüber Phosphatgruppen^[35].

Auf den Zusammenhang zwischen peroxidatischer Aktivität und Komplexstruktur wurden auch der Cu^{2+} -Komplex von Adenosin-5'-diphosphat – bei dem der Adeninring an der Komplexbildung beteiligt ist^[61] – und der Cu^{2+} -Komplex von Adenosin-5'-monophosphat^[33] untersucht, in welchem ebenfalls eine Cu^{2+} -Adeninring-Wechselwirkung (Bildung eines Makrochelates) wahrscheinlich ist^[33,69,77]. Auch Proteine wie γ -Globulin werden in Gegenwart von Cu^{2+} und H_2O_2 peroxidatisch abgebaut^[78]. In ähnlicher Weise ließen sich auch der Cu^{2+} -^[54] und der Ni^{2+} -Komplex^[79] des cyclischen Dekapeptids Polymyxin B sowie die Ni^{2+} -Komplexe des linearen Oktapeptids Val⁵-Angiotensin-II-Asp¹- β -amid^[80] und des Tetracosapeptids β^{1-24} -Corticotropin^[81] durch H_2O_2 spalten. Radhakrishnan und Meister^[82] sowie Macholdán^[83] konnten zeigen, daß α -Aminosäuren in 2 N NaOH in Gegenwart von Cu^{2+} durch H_2O_2 primär zu Ketosäuren oxidiert werden.

[76] R. Barber, Biochim. biophysica Acta 134, 207 (1967).

[77] H. Sigel, Experientia 22, 497 (1966).

[78] R. A. Phelps, K. E. Neet, L. T. Lynn u. F. W. Putnam, J. biol. Chemistry 236, 96 (1961).

[79] H. Ch. Curtius, P. Anders, R. Zell, H. Sigel u. H. Erlenmeyer, Helv. chim. Acta 49, 2256 (1966).

[80] H. Ch. Curtius, P. Anders, H. Erlenmeyer u. H. Sigel, Helv. chim. Acta 51, 896 (1968).

[81] H. Erlenmeyer u. H. Sigel, unveröffentlicht.

[82] A. N. Radhakrishnan u. A. Meister, J. biol. Chemistry 226, 559 (1957).

[83] L. Macholdán, Naturwissenschaften 46, 357 (1959).

5. Zur Kinetik und zum Mechanismus katalytischer und peroxidatischer Reaktionen

Da der direkte Zerfall von H_2O_2 eine Aktivierungsenergie von mindestens 48 kcal/mol erfordert^[9], geht die thermische Zersetzung unter Bedingungen, bei denen wäßrige Lösungen existenzfähig sind, nur auf katalytischem Wege vor sich. Wie bereits erwähnt, sind in homogener Phase vor allem Ionen und Komplexe der Übergangsmetalle katalytisch wirksam^[9]. Für den speziellen Fall der Cu^{2+} -Komplexe wurde der Zusammenhang zwischen Struktur und katalytischer Aktivität gezeigt: Das komplex gebundene Cu^{2+} muß demnach freie Koordinationsstellen haben, damit die für die Katalyse erforderlichen ternären Cu^{2+} -Peroxo-Ligand-Komplexe gebildet werden können. Über den Reaktionsablauf ist damit aber noch wenig ausgesagt.

Glasner^[84] sowie Erdey und Inczédy^[85] untersuchten die Katalyse des H_2O_2 -Zerfalls durch das Cu^{2+} -Citrat-System im alkalischen Bereich. Sie fanden, daß der Komplex $[\text{Citrat-Cu-OH}]^{3-}$ als Katalysator wirkt und die Zersetzungsgeschwindigkeit proportional zur photometrisch gemessenen Konzentration des Cu^{2+} -Peroxidkomplexes und zu $[\text{H}_2\text{O}_2]^{0,5}$ ist^[85,86]. Bei der Oxidation von Brenzcatechin in Gegenwart von Cu^{2+} und H_2O_2 hängt die Geschwindigkeit von der Konzentration an H_2O_2 , Brenzcatechin und Cu^{2+} ab^[18]. Nach den kinetischen Untersuchungen ist das oxidierende Agens in diesem System wohl die Partikel $[\text{CuOOH}]^+$ (vgl. auch^[87]).

Weitere Aufschlüsse ergaben die im folgenden beschriebenen kinetischen Untersuchungen. Auf die Zugabe von Puffern wurde hierbei verzichtet (vgl. ^[25]), da diese als schwache Säuren oder Basen wiederum zur Komplexbildung mit Cu^{2+} und damit zu einer Komplizierung der Systeme geführt hätten.

Gemessen wurde die Abnahme der H_2O_2 -Konzentration^[25] mit der Zeit. Die Steigung der Tangente dieser Kurve für die Zeit $t = 0$ ergibt die Anfangsgeschwindigkeit $v_0 = -d[\text{H}_2\text{O}_2]/dt$ der Reaktion. Sodann wurde der Logarithmus von v_0 gegen den Logarithmus der variierten Konzentration $[X]$ aufgetragen. Die so erhaltenen Punkte lagen auf Geraden, aus deren Steigung die Zusammenhänge zwischen der Geschwindigkeit der Katalyse und der Konzentration von X entnommen wurden (vgl. z. B. ^[88]).

5.1. Das Cu^{2+} -Äthylendiamin- H_2O_2 -System

Die kinetischen Untersuchungen bei der Ionenstärke $I = 0,5$ (NaClO_4) und $T = 22^\circ\text{C}$ im pH-Bereich ≈ 6 bis 8 zeigten^[28], daß die Anfangsgeschwindigkeit v_0 der H_2O_2 -Abnahme zu $1/[\text{H}^+]$, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ und $[\text{Cu}^{2+}]^2$ proportional ist, wobei die maximale katalytische Aktivität beim Verhältnis $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} : [\text{en}]_{\text{tot}} = 1:1,5$

[84] A. Glasner, J. chem. Soc. (London) 1951, 904.

[85] L. Erdey u. I. Inczédy, Acta chim. Acad. Sci. hung. 17, 93 (1958).

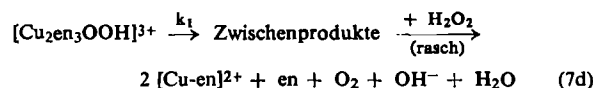
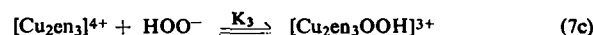
[86] Vgl. [3], dort S. 2392.

[87] S. Fallab, Z. naturwiss. med. Grundlagenforsch. 1, 333, 358 (1963).

[88] A. A. Forst u. R. G. Pearson: Kinetics and Mechanism. J. Wiley, New York 1953.

erreicht wird (en = Äthylendiamin). Diese Resultate lassen sich in Gl. (6) zusammenfassen und durch die in Gl. (7a) bis (7d) wiedergegebenen Reaktionen deuten, wenn man annimmt, daß $[\text{Cu}_2\text{en}_3]^{4+}$ und $[\text{Cu}_2\text{en}_3\text{OOH}]^{3+}$ nur in sehr kleinen Konzentrationen vorliegen^[28].

$$v_0 = - \frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = k \cdot \frac{[\text{Cu-en}]^2 \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]}{[\text{H}^+]} \cdot f([\text{en}]_{\text{tot}}) \quad (6)$$



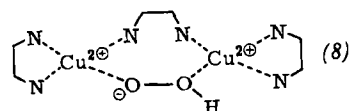
Aus Gl. (7) läßt sich – als Spezialfall von Gl. (6) – die Gl. (8) ableiten.

$$v_0 = - \frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = k_1 \cdot [\text{Cu}_2\text{en}_3\text{OOH}] = k_1 \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot \frac{[\text{Cu-en}]^2 \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]}{[\text{H}^+]} \cdot [\text{en}] \quad (8)$$

Die maximale katalytische Aktivität bei $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}}$: $[\text{en}]_{\text{tot}} = 1:1,5$ spiegelt sich in Gl. (7b) und (9) wider,



denn bei diesem Verhältnis ist eine maximale Bildung des postulierten Zwischenproduktes $[\text{Cu}_2\text{en}_3]^{4+}$ – oder $[\text{Cu}_2\text{en}_3\text{OOH}]^{3+}$ – zu erwarten. Dem aktiven Komplex kann demnach eine binucleare Struktur, etwa (8), zugeordnet werden^[89]. (Die Folgereaktionen der



Partikel $[\text{Cu}_2\text{en}_3\text{OOH}]^{3+}$ wurden in^[28] diskutiert.) Bei längerer Einwirkung von H_2O_2 (> 20 min) auf das Cu^{2+} -en-System treten dünnsschichtchromatographisch nachweisbare Oxidationsprodukte wie Glycin auf^[28].

5.2. Das Cu^{2+} -Diäthylentriamin- H_2O_2 -System

Versuche^[28] mit dem Cu^{2+} -Komplex des dreizähligen Diäthylentriamins (= dien) als Katalysator (vgl. Abschnitt 2.1.) für den H_2O_2 -Zerfall im pH-Bereich $\approx 7,5$ bis 9,5 zeigten, daß in diesem Fall die Reaktion wahrscheinlich anders verläuft. Die kinetischen Ergebnisse sind in Gl. (10) zusammengefaßt.

$$v_0 = - d[\text{H}_2\text{O}_2]/dt = k \cdot [\text{Cu-dien}] [\text{H}_2\text{O}_2] / [\text{H}^+] \quad (10)$$

[89] Eine ähnliche Struktur wird für die binucleare Partikel $[\text{Fe}_2(\text{EDTA})\text{O}_2]$ von M. T. Beck, Rec. chem. Progr. (1) 27, 37, 53 (1966), vorgeschlagen; vgl. auch M. T. Beck, S. Görög u. Z. Kiss, Acta chim. Acad. Sci. hung. 42, 321 (1964).

Die dünnsschichtchromatographische Untersuchung bei $\text{pH} \approx 9,2$ zeigte bereits nach einer Reaktionszeit von 1 bis 5 Minuten mindestens vier Reaktionsprodukte, darunter Iminodiessigsäure. Dies erschwert die Interpretation.

5.3. Das Cu^{2+} -2,2'-Bipyridyl- H_2O_2 -System

Aus den kinetischen Untersuchungen^[90a] mit dem Cu^{2+} -1:1-Komplex des 2,2'-Bipyridyls (Bipy) ergab sich bei $\text{pH} \approx 5,5$ bis 7,5 (natürliche Ionenstärke; $T = 25^\circ\text{C}$), daß die Anfangsgeschwindigkeit v_0 des H_2O_2 -Zerfalls proportional ist zu $1/[\text{H}^+]$, $[\text{H}_2\text{O}_2]^2$ (vgl. Abb. 12) und $[\text{Cu}^{2+}\text{-Bipy}]$; mit steigender $[\text{Bipy}]$ – bei konstanter $[\text{Cu}^{2+}]$ – nimmt v_0 ab. Es ergibt sich der

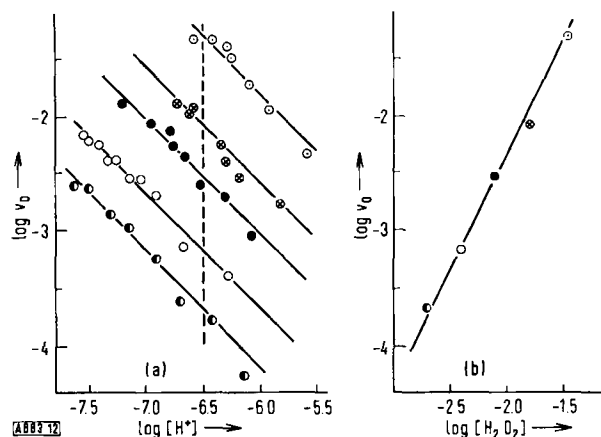
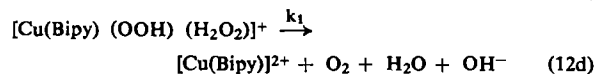
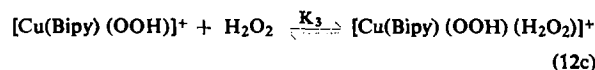
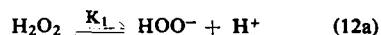


Abb. 12. a) Katalytische Aktivität des Cu^{2+} -2,2'-Bipyridyl-Systems ($[\text{Cu}^{2+}] = [\text{Bipy}] = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) bei verschiedenen H_2O_2 -Anfangskonzentrationen (\circ $3,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; \square $1,6 \cdot 10^{-2} \text{ M}$; \bullet $8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; \circ $4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) in Abhängigkeit vom pH-Wert, bestimmt als Anfangsgeschwindigkeit v_0 ($\text{mol l}^{-1} \text{ min}^{-1}$) des H_2O_2 -Zerfalls ($v_0 \sim [\text{H}^+]^{-1}$). – b) Auswertung der Ergebnisse von (12a) bei $\text{pH} = 6,5$ ($v_0 \sim [\text{H}_2\text{O}_2]^2$).

kinetische Ausdruck (11), der sich durch Gl. (12a) bis (12d) deuten läßt, wenn man annimmt, daß $[\text{Cu}(\text{Bipy}) (\text{OOH})]^+$ und $[\text{Cu}(\text{Bipy}) (\text{OOH}) (\text{H}_2\text{O}_2)]^+$ nur in sehr

$$v_0 = - \frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = k \cdot \frac{[\text{Cu-Bipy}] [\text{H}_2\text{O}_2]^2}{[\text{H}^+]} \quad (11)$$

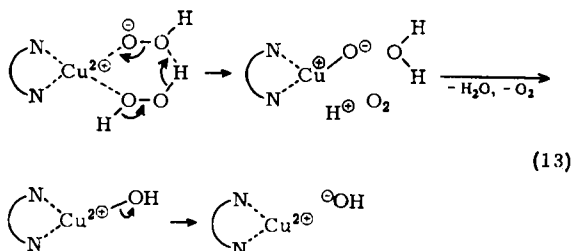


kleinen Konzentrationen vorliegen. Aus dem vorgeschlagenen Reaktionsablauf ist wiederum Gl. (11) ableitbar, wobei k in $k_1 \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot K_3$ übergeht.

Für den aktiven Komplex und dessen Folgereaktionen läßt sich z. B. das in Gl. (13) gezeigte Schema entwerfen (vgl. auch^[91]).

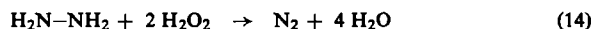
[90] a) H. Sigel, C. Flierl u. R. Griesser, J. Amer. chem. Soc., im Druck; b) H. Erlenmeyer, C. Flierl u. H. Sigel, ibid., im Druck; c) Chimia 22, 433 (1968).

[91] L. Erdey u. I. Inczédy, Acta chim. Acad. Sci. hung. 7, 93 (1955).



5.4. Das Cu^{2+} -2,2'-Bipyridyl- H_2O_2 - $\text{H}_2\text{N-NH}_2$ -System

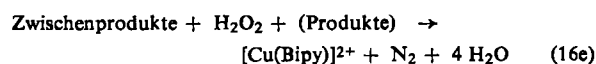
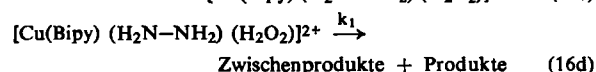
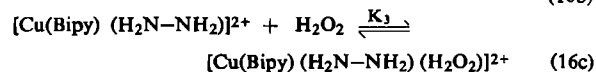
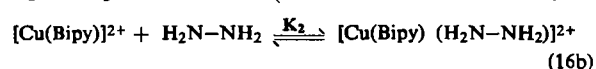
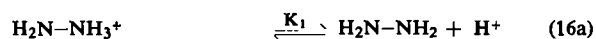
Für die metallionenkatalysierte peroxidatische Reaktion (14) mit Hydrazin^[92] findet man für die Anfangsgeschwindigkeit v_0 der H_2O_2 -Abnahme^[90b] in



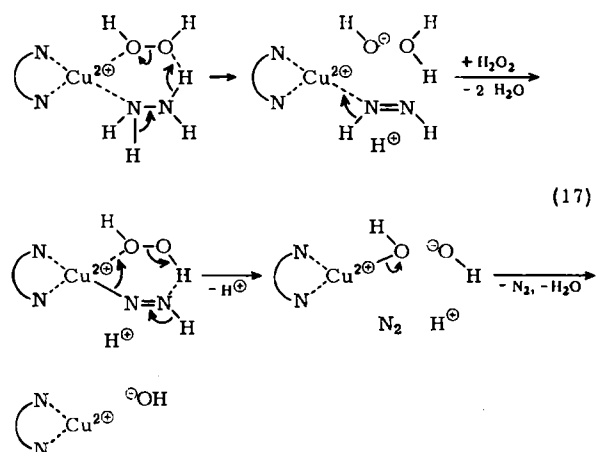
Gegenwart von Cu^{2+} -Bipy (pH-Bereich $\approx 5-6,5$; natürliche Ionenstärke; $T = 25^\circ\text{C}$):

$$v_0 = -\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = k \cdot \frac{[\text{Cu-Bipy}][\text{H}_2\text{O}_2][\text{H}_2\text{N-NH}_3^+]}{[\text{H}^+]} \quad (15)$$

Da $\text{H}_2\text{N-NH}_2$ hier protoniert vorliegt ($\text{pK}_A = 8,1$ ^[90c]), läßt sich folgender Reaktionsablauf vorschlagen, der – sofern die Gleichgewichte (16b) und (16c) weitgehend auf der linken Seite liegen – mit den kinetischen Befunden in Einklang ist [$k = k_1 \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot K_3$ in (15)]:



Für die Struktur des aktiven Komplexes und die anschließenden Reaktionsschritte läßt sich das in Gl. (17) dargestellte Schema formulieren [vgl. auch Gl. (13)].



Die peroxidatische Reaktion zwischen H_2O_2 und Hydroxylamin wird ebenfalls durch den Cu^{2+} -Bipy(1:1)-Komplex katalysiert^[90b], wobei wahrscheinlich vorwiegend N_2

[92] F. A. Cotton u. G. Wilkinson: Anorganische Chemie. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1967, S. 313.

entsteht, daneben eventuell aber auch N_2O , NO_2^- und NO_3^- ^[93,94]. Die Anfangsgeschwindigkeit v_0 der H_2O_2 -Abnahme ist bei $\text{pH} \approx 4,5-6,0$ (natürliche Ionenstärke; $T = 25^\circ\text{C}$) proportional zu $1/[\text{H}^+]$, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ und $[\text{Cu}^{2+}\text{-Bipy}]$, dagegen möglicherweise unabhängig von der Konzentration an NH_2OH (das während der Reaktion allerdings verbraucht wird). Mit steigender $[\text{Bipy}]$ nimmt v_0 wiederum ab.

Für dieselbe Reaktion zwischen H_2O_2 und NH_2OH mit dem freien Cu^{2+} -Ion als Katalysator^[90b] wurde für die Anfangsgeschwindigkeit v_0 H_2O_2 -Abnahme ein kinetischer Ausdruck – analog Gl. (11) und (15) – gefunden:

$$v_0 = -d[\text{H}_2\text{O}_2]/dt = k \cdot [\text{Cu}^{2+}][\text{H}_2\text{O}_2][\text{NH}_2\text{OH}]/[\text{H}^+]$$

Auch für dieses System lassen sich ein Reaktionsablauf wie in Gl. (12) und (16) und ein aktiver Komplex wie in Gl. (13) und (17) entwerfen.

Falls das Metallion bei diesen Reaktionen während der Katalyse einen Wertigkeitswechsel erfährt, ist anzunehmen, daß er zwischen Cu^{I} und Cu^{II} und nicht Cu^{III} stattfindet, da einerseits Cu^{II} sowohl durch NH_2NH_2 ^[95] als auch durch NH_2OH ^[95,96] in alkalischem Milieu zu gelbem Kupfer(I)-oxid reduziert wird und sich andererseits Cu^{I} durch H_2O_2 wieder zu Cu^{II} ^[97] oxidieren läßt (vgl. auch^[111]).

6. Schluß

Die hier besprochenen Systeme geben einerseits einen Hinweis auf die Vielfalt und Verschiedenartigkeit der möglichen Reaktionen beim Abbau von H_2O_2 , andererseits zeigen die Beispiele in Abschnitt 5.3. und 5.4. deutlich den Zusammenhang zwischen katalytischer und peroxidatischer Aktivität. Für die erwähnten Systeme lassen sich ähnliche aktive Komplexe mit Folgereaktionen [s. Gl. (13) und (17)] entwerfen, wobei sich eins der H_2O_2 -Moleküle durch einen H-Donor, z. B. $\text{H}_2\text{N-NH}_2$ oder NH_2OH , ersetzen läßt (vgl. ^[90b]). Der Cu^{2+} -2,2'-Bipyridyl-1:1-Komplex kann also – je nach den Reaktionsbedingungen – sowohl die katalytische (1) als auch die peroxidatische Reaktion (2) katalysieren. Dieser Katalysator verhält sich somit ähnlich wie es auch von Enzymen (vgl. ^[40,42]) bekannt ist. Der in dieser Übersicht gezeigte Zusammenhang zwischen der Struktur von Cu^{2+} -Komplexen und ihrer katalytischen Aktivität ist in ähnlicher Weise wohl auch für Komplexe anderer Metallionen zu erwarten.

Es ist anzunehmen, daß die Bedingungen, die ein Cu^{2+} -Komplex erfüllen muß, damit er den katalytischen oder peroxidatischen H_2O_2 -Zerfall katalysiert, auch bei kupferhaltigen Enzymen eine Rolle spielen.

Viele Anregungen verdanke ich Prof. Dr. H. Erlenmeyer†. Für die Bereitschaft zur Diskussion der auftretenden Probleme danke ich Prof. Dr. S. Fallab, Dr. B. Prijs und Dr. R. Griesser. Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung bin ich für die Unterstützung unserer Arbeiten dankbar.

Eingegangen am 1. April 1968 [A 683]

[93] Vgl. [3], dort S. 2293; vgl. auch Gmelins Handbuch der Anorganischen Chemie. System-Nr. 23: „Ammonium“, Verlag Chemie, Berlin 1936, S. 572.

[94] C. P. Lloyd u. W. F. Pickering, J. inorg. nuclear Chem. 29, 1907 (1967); N. Hlasivcová, J. Novák u. J. Zýka, Collect. czechoslov. chem. Commun. 32, 4403, 4410 (1967).

[95] T. R. Bhat, D. Radhamma u. J. Shankar, J. inorg. nuclear Chem. 27, 2641 (1965).

[96] J. H. Anderson, Analyst 91, 532 (1966); 89, 357 (1964).

[97] A. Zuberbühler, Helv. chim. Acta 50, 466 (1967).