

Fachbereich Chemie der Universität Dortmund

**NMR-spektroskopische Untersuchungen
binärer Palladium-Peptid-Komplexe
sowie ternärer Komplexe mit Desoxyribonucleotiden
unter besonderer Berücksichtigung der Strukturänderung
der Liganden
bei der Metallkoordination.**

Hye-Seo Park

Dem Fachbereich Chemie der Universität
Dortmund

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigte Dissertation

Referent: Prof. Dr. B. Lippert

Korreferent: Prof. Dr. T. N. Mitchell

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 07. 2000

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 1995 bis Mai 1999 am Lehrstuhl für Anorganische Chemie III des Fachbereichs Chemie der Universität Dortmund.

Mein besonderer Dank gilt meinem Lehrer

Herrn Professor Dr. B. Lippert

für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, sein fachliches und menschliches Engagement und die freundliche und vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Herrn Professor Dr. T. N. Mitchell danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein Dank gilt ferner

allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises für die freundliche Atmosphäre, die humorvolle Zusammenarbeit sowie die ständige wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft während meiner Promotionszeit.

Ich möchte mich nochmals bei meinem Lehrer, Herrn Professor Dr. B. Lippert, herzlich für seine ständige Unterstützung, wertvollen Anregungen und die stets freundliche Zusammenarbeit bedanken. Mit seiner beispiellosen Hilfsbereitschaft hat er meinen Studienaufenthalt in Deutschland fruchtbar gemacht.

Nicht zuletzt bin ich meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben, und meinem Mann und meiner Tochter Ji-Woo zu Dank verpflichtet, die mich während meines Aufenthalts in Deutschland stets ermutigt und mit vollem Verständnis begleitet haben.

Inhaltsverzeichnis

A. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
---	----------

B. HAUPTTEIL	7
---------------------------	----------

KAPITEL I

Einführung und Grundlagen	7
--	----------

1. Koordinationseigenschaften von Peptiden	7
1.1. Koordinationseigenschaften von Dipeptiden	9
1.2. Koordinationseigenschaften von kurzen Oligopeptiden	10
2. Erkennung von Teilstrukturen durch NMR.....	11

Kapitel II

Dipeptid-Komplexe	17
--------------------------------	-----------

1. Verwendete Dipeptide.....	17
1.1. Glycyl-L-Lysin (GlyLys)	17
1.2. L-Lysyl-Glycin (LysGly)	19
1.3. L-Tyrosyl-L-Lysin (TyrLys)	20
2. Binäre Palladium(II)-Komplexe mit lysinhaltigen Dipeptiden.....	24

2.1. Binäre Pd(II)-Komplex mit L-Tyr-L-Lys.....	25
2.1.1. Einleitung.....	25
2.1.2. Charakterisierung von Pd(TyrLys)Cl (1).....	26
2.2. Darstellung und Charakterisierung von Pd(GlyLys)Cl (3)	31
2.3. Darstellung und Charakterisierung von Pd(LysGly)Cl (5)	34
3. Ternäre Komplexe : Umsetzungen von Desoxyribonucleotiden mit monofunktionellen Palladium(II)-Dipeptid-Komplexen.....	37
3.1. Umsetzungen mit 5'dGMP.....	41
3.1.1. Charakterisierung von Pd(L-Tyr-L-Lys)(5'dGMP) (7).....	41
3.1.1.1. ¹ H-NMR-Untersuchungen.....	41
3.1.1.2. Zuordnung der Protonenresonanzen anhand zweidimensionaler NMR-Spektroskopie	44
3.1.1.3. Konformationsanalyse von koordinierter 5'dGMP Liganden.....	48
3.1.1.4. Untersuchungen der räumlichen Anordnung der koordinierten Liganden im ternären Komplex.....	57
3.1.2. Charakterisierung von Pd(Gly-L-Lys)(5'dGMP) (10).....	63
3.1.2.1. ¹ H-NMR-Untersuchungen.....	63
3.1.2.2. Zuordnung der Protonenresonanzen anhand zweidimensionaler NMR-Spektroskopie	65
3.1.2.3. Untersuchungen der Konformation des koordinierten 5'dGMP-Liganden und der räumlichen Anordnung der koordinierten Liganden im ternären Komplex	67
3.1.3. Charakterisierung von Pd(L-Lys-Gly)(5'dGMP)	70
3.2. Umsetzungen mit 5'dCMP.....	76

3.2.1. Charakterisierung von Pd(L-Tyr-L-Lys)(5'dCMP).....	76
3.2.1.1. ¹ H-NMR-Untersuchungen.....	76
3.2.1.2. Zuordnung der Protonenresonanzen anhand zweidimensionaler NMR-Spektroskopie	78
3.2.1.3. Konformationsanalyse des koordinierten 5'dCMP- Liganden.....	82
3.2.1.4. Untersuchung der räumlichen Anordnung der koordinierten Liganden im ternären Komplex.....	84
3.2.2. Charakterisierung von Pd(Gly-L-Lys)(5'dCMP)	89

Kapitel III

Binäre Palladium(II)-Komplexe mit Oligopeptiden 96

1. Darstellung und Charakterisierung des Pd(II)-Komplexes mit L-Arg- L-Lys-L-Asp.....	96
1.1. Einführung.....	96
1.2. Der Ligand L-Arg-L-Lys-L-Asp (TP3).....	96
1.3. Pd-Komplex (21).....	99
1.3.1. ¹ H-NMR-spektroskopische Charakterisierung	99
1.3.2. ESI-MS Spektrum.....	103
1.3.3. Zusammenfassung und Diskussion.....	104
2. Darstellung und Charakterisierung von Pd(II)-Komplex mit ATCUN <i>motif</i>	106
2.1. Einführung.....	106

2.2. Die freien Liganden.....	108
2.2.1. Gly-L-Lys-L-His (GlyLysHis).....	108
2.2.2. L-Asp-L-Ala--L-His-Lys (AspAlaHisLys).....	110
2.3. Palladium(II)-Komplexe	111
2.3.1. ¹ H-NMR-spektroskopische Charakterisierung	111
2.3.2. ESI-MS-Spektrum.....	116
2.3.3. Zusammenfassung und Diskussion.....	117
C. EXPERIMENTELLER TEIL.....	119
1. Meßgeräte und spektroskopische Aufnahmebedingungen.....	119
1.1. NMR-Spektroskopie.....	119
1.2. Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	119
1.3. pH/pD-Wert-Bestimmungen	120
2. Ausgangsverbindungen und allgemeine Arbeitsvorschriften.....	120
3. Präparative Vorschriften.....	121
D. ZUSAMMENFASSUNG	122
E. ANHANG	126
1. Literaturverzeichnis	126
2. Übersicht über die beschriebenen Verbindungen	139

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Liganden und Chemikalien

5' dCMP	2'-Desoxycytidin-5'-Monophosphat
5' dGMP	2'-Desoxyguanosin-5'-Monophosphat
A (C, G, T)	allgemein für Adenin- (Cytosin-, Guanin-, Thymin-)Derivate
AspAlaHisLys	L-Asp-L-Ala-L-His-L-Lys
Cisplatin, <i>cis</i> -DDP	<i>cis</i> -Diammindichloroplatin(II)
dien	Diethylentriamin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
GlyLys	Glycyl-L-Lysin
GlyLysHis	Glycyl-L-Lysyl-L-Histidin
LysGly	L-Lysyl-Glycin
RNA	Ribonucleinsäure
TP3	ArgLysAsp; L-Arg-L-Lys-L-Asp; L-Arginyl-L-Lysyl-L-Asparaginsäure
TyrLys	L-Tyrosyl-L-Lysin

Spektroskopie

COSY	<u>c</u> orrelated <u>s</u> pectroscopy
DQF-COSY	<u>d</u> ouble <u>q</u> uantum <u>f</u> iltered <u>c</u> orrelated <u>s</u> pectroscopy
ESI-MS	<u>E</u> lectrospray- <u>I</u> onisations- <u>M</u> assenspektrometrie
³ J	vicinale Spin-Spin-Kopplungskonstant
NOE	<u>n</u> uclear <u>O</u> verhauser <u>e</u> nhancement
NOESY	<u>n</u> uclear <u>O</u> verhauser <u>e</u> nhancement <u>s</u> pectroscopy
P	Pseudorotationswinkel
pD	korrigierter pH-Wert in D ₂ O
pH*	unkorrigierter pH-Wert in D ₂ O
ppm	parts per <u>m</u> illion
ROESY	<u>r</u> otating frame <u>O</u> verhauser <u>e</u> nhancement <u>s</u> pectroscopy
t _m	Mischzeit

TOCSY	<u>t</u> o <u>t</u> a <u>l</u> <u>c</u> o <u>r</u> r <u>e</u> l <u>a</u> t <u>i</u> o <u>n</u> <u>s</u> p <u>e</u> c <u>t</u> r <u>o</u> s <u>c</u> o <u>p</u> y
δ	chemische Verschiebung
τ_c	Korrelationszeit
ω_0	Lamorfrequenz

Allgemeines

Abb.	Abbildung
Kap.	Kapitel
M	molekulare Masse
min.	Minute
mM	millimolar
msec	Millisekunde
N	north (Zuckerkonformation der Ribose)
RT	Raumtemperatur
S	south (Zuckerkonformation der Ribose)
T	Temperatur
Tab.	Tabelle

A. Einleitung und Zielsetzung

Bioanorganische Chemie ist die Disziplin an der Grenze zwischen den klassischen Gebieten Anorganische Chemie und Biologie. Ferner führt man in biologische Systeme künstlich anorganische Elemente als Sonden für deren Struktur und Funktion ein [1, 2]. Metallhaltige Verbindungen dienen nicht nur als biologische Sonden, sondern auch als diagnostische und therapeutische Pharmaka [3-4]. Die Bioanorganische Chemie hat also zwei Hauptaufgaben: die Untersuchung der in der Biologie natürlicherweise vorkommenden anorganischen Elemente [5-9] und die Einführung von Metallen als Sonden oder Arzneimittel in biologische Systeme [10-13]. Weitere wesentliche Aspekte dieses Gebiets beinhalten Untersuchungen des Transports und der Speicherung von Metall-Ionen in der Biologie [14-16].

In der Bioanorganischen Chemie sind die Liganden zumeist Seitenketten von Aminosäuren oder Bestandteile von Nucleinsäuren. Die thermodynamische Stabilität eines Metallzentrums in einer biologischen Umgebung wird durch die Fähigkeit des Biopolymers bestimmt, über seine dreidimensionale Struktur die Stereochemie und die Art der für die Koordination verfügbaren Liganden zu steuern. Auch nicht koordinierende Reste tragen Faktoren wie lokale Hydrophilie oder Hydrophobie, sterische Blockierung von Koordinationsstellen und wasserstoffbrückenbildende Gruppen bei; letztere können mit gebundenen und nichtgebundenen Atomen der Koordinationssphäre des Metalls wechselwirken und die Stabilität erhöhen oder verringern. Man muß diese Faktoren, die Nucleinsäure- oder Protein-gebundene Metalle beeinflussen, immer berücksichtigen, wenn man versucht, die Funktionsweise der Biologie zu verstehen [17,18].

Die Aminosäuresequenzen in den Proteinen werden durch die Nucleotidsequenz der Gene der DNA festgelegt. Die DNA-Sequenz wird zunächst durch das Enzym RNA-Polymerase in RNA transkribiert. Bei den Prokaryoten dient die erzeugte RNA direkt als Botschaft, die in ein Protein übersetzt wird. Diese sogenannte Translation findet an den Ribosomen statt, großen Verbänden spezifischer RNA- und Proteinmoleküle, die als Proteinsyntheseapparat fungieren [19]. In den letzten Jahren ist dabei deutlich geworden, daß Metallionen oft eine zentrale Rolle bei der Funktionsweise dieser biochemischen Prozesse spielen [20-21].

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Synthese von Modellen zur metallinduzierten Vernetzung von Nucleinsäuren und Proteinen. Ausgangspunkt für Modelle dieser Art ist die Tatsache, daß zelluläre DNA im Zellkern nicht isoliert vorliegt. Nucleinsäuren sind Polyanionen und als solche auf Gegen-Ionen angewiesen, um stabile, kompakte Strukturen annehmen zu können. Aus diesem Grunde liegt die DNA im Zellkern als Doppelhelix vor, die wiederum durch die basischen Histone stabilisiert wird [22-24]. Die positive Nettoladung der Histone resultiert aus dem hohen

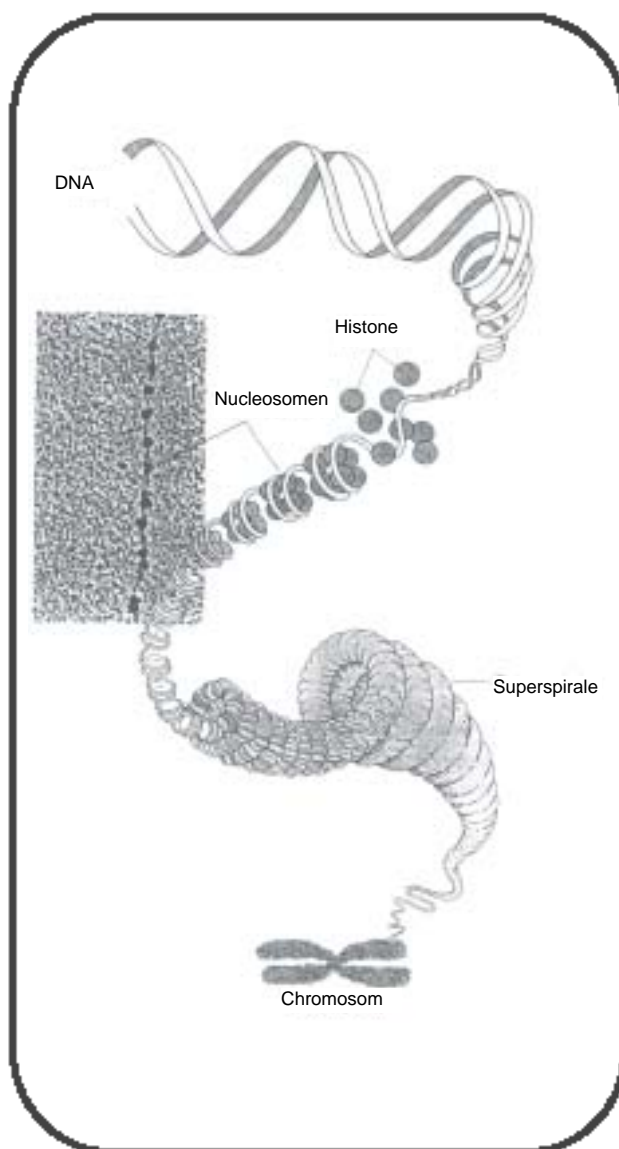


Abb. 1: Kompaktierung der DNA in Chromosomen[2].

Gehalt an basischen Aminosäuren. Jede 5. Aminosäure in einem Histonmolekül ist entweder Lysin oder Arginin. Die positiv geladenen Aminosäure-Seitenketten gehen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA ionische Wechselwirkungen ein. Sie beeinflussen damit die Aktivität von Genen.

Neben den Histonproteinen sind noch eine Vielzahl von regulativen Enzymen über Wasserstoffbrücken an die DNA gebunden und beeinflussen ebenfalls die Aktivität von Genen. Darüber hinaus sind bei der DNA-Replikation zahlreiche Enzyme involviert, die ebenfalls über Wasserstoffbrücken an bestimmte DNA-Sequenzen anbinden [25, 26]. Diese Proteine spielen eine entscheidende Rolle sowohl bei der Expression von Genen als

auch bei der Replikation der DNA selbst.

Neben ihrem Modellcharakter im Hinblick auf eine zusätzliche Vernetzung von bereits durch elektrostatische Wechselwirkung an die DNA gebundenen Proteinen kommt diesen Verbindungen noch eine weitere Bedeutung zu. Sie können auch als Modelle für ein neues Konzept von Therapeutika fungieren, das auf der Basis kurz-kettiger Peptide aufbaut [13]. Analog zu den Regulationsenzymen erkennen diese Peptide bestimmte Basensequenzen und dienen so als chemische Sonden.

Heute rücken diese ternären Metall-DNA-Protein-Komplexe stärker in den Mittelpunkt. Ternäre Wechselwirkungen von Metallionen mit Proteinen und Nucleinsäuren erweisen sich verstärkt als biologisch relevant [24, 28]. Das systematische Studium dieser Komplexe liefert einen wichtigen Beitrag zur Frage, welche Rolle Metallionen bei der DNA-Protein-Assoziation spielen. Je nach Koordinationsort des Metalls sind prinzipiell drei Szenarien denkbar, die in Abb.2 skizziert sind [29, 30].

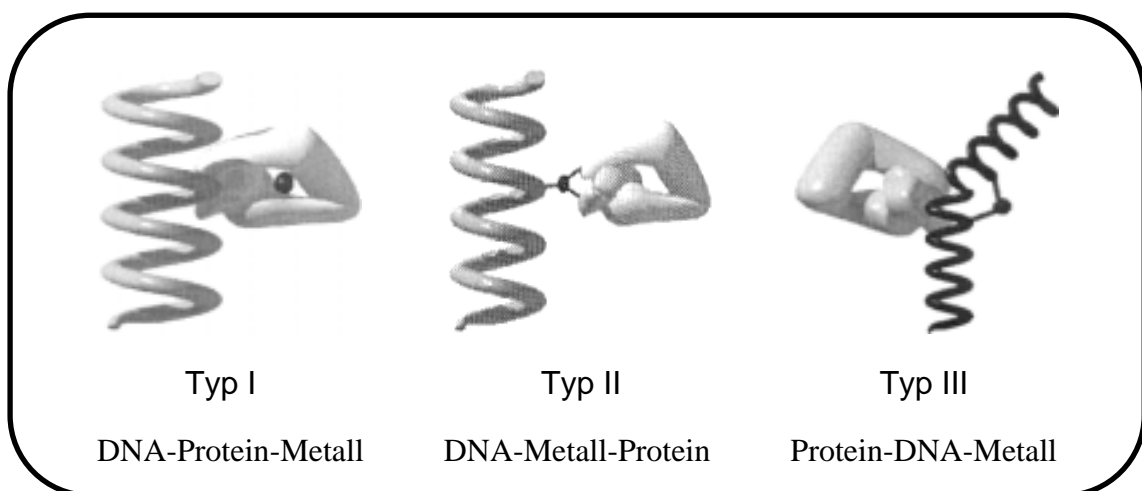


Abb. 2: Schematische Darstellung von Metall-DNA-Protein-Wechselwirkungen

Die Komplexierung eines Metallions an das Protein kann die spezifischen, nicht-kovalenten, DNA-bindenden Eigenschaften des Proteins beeinflussen (Typ I). Diese Art von Wechselwirkung tritt z. B. bei den Zink-Finger-Proteinen [31] und der Genregulation von Metalloproteinen auf [32, 33]. Für die ternären Metallkomplexe, in denen das Metallion kovalent die Nucleinsäure und das Protein verknüpft (Typ II), gibt es nur wenige gut untersuchte Beispiele. Gesichert ist jedoch die metallionen-abhängige Aktivität des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I [34, 35]. Allgemein scheint diese Wechselwirkung bei verschiedenen DNA- und RNA-Polymerasen von Bedeutung zu sein [36] und ist vermutlich für die hohe Toxizität des *trans*-Pt(NH₃)₂Cl₂ verantwortlich [37]. Die Bindung eines Proteins an die DNA kann aber auch durch die

Koordination eines Metallions an die DNA beeinflusst werden, wenn hierdurch die DNA-Konfiguration verändert wird (Typ III) [38-41]. Wie man kürzlich herausfand, bringt die Modifizierung der DNA durch *cis*-Platin eine Krümmung der DNA-Doppelhelix um 32 bzw. 34° an den Platinierungsstellen der d(GpG) bzw. d(ApG) -Querverknüpfungen innerhalb eines Stranges mit sich, und diese Krümmung aktiviert die Bindung strukturspezifischer Erkennungsproteine (SSRPs, *structure-specific recognition proteins*) an die plattinierte DNA [38]. Dieses DNA-bindende *motif* ist im allgemeinen positiv geladen. Es ist ein gut untersuchtes Beispiel für den Wechselwirkungstyp III.

Die durch die Bindung von Metallen induzierten Tertiärstrukturen in ternären Metall-DNA-Protein-Komplexen können Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen erleichtern. Diese intramolekularen Wechselwirkungen von Proteinen mit Nucleinsäuren lassen sich in vier Kategorien einteilen [42]. In ternären Komplexen kommen elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen der Nucleotide und den positiv geladenen Seitenketten von Lysin oder Arginin vor [23, 24, 43]. Verglichen mit den anderen Wechselwirkungen sind sie „weitreichend“, aber nicht strukturspezifisch. Bei Wasserstoffbrückenbindungen handelt es sich um dipolare Wechselwirkungen relativ geringer Reichweite. Die verschiedenen funktionellen Gruppen jeder Nucleobase können als Donor bzw. Akzeptor für eine Wasserstoffbrückenbindung dienen. Bei den Proteinen ist neben den unterschiedlichen Seitenketten auch die Peptidgruppe in der Lage, Wasserstoffbrücken auszubilden. Strukturerkennende Proteine gehen neben den elektrostatischen Wechselwirkungen vor allem Wasserstoffbrückenbindungen ein, wobei die Wasserstoffbrückenbindung insbesondere für die sequenzspezifische DNA-Erkennung verantwortlich ist [44, 45]. Die molekulare Erkennung zwischen der modifizierten Nucleobase und dem Protein über Wasserstoffbrücken ist daher ein wichtiger Bestandteil der Einleitung und der Regulation der Protein-Synthese. Hydrophobe Wechselwirkungen weisen eine kurze Reichweite auf und sind stark von der Struktur der DNA abhängig [46]. Stapelungseffekte besitzen ebenfalls eine kurze Reichweite. Sie sind wichtig sowohl für den Strukturertalt von doppelsträngiger DNA [47] als auch für Wechselwirkungen von Proteinen, die aromatische Seitenketten besitzen [48-50]. Diese sind insbesondere an die einsträngige DNA gebunden, wobei ihre Seitenketten in die Nucleobasen intercaliert werden können [48, 49].

Wegen der Größe und Komplexität von Biopolymeren ist es gewöhnlich schwierig, hochaufgelöste Strukturinformationen über die Koordinationssphäre eines Metall-Ions zu erhalten. Aus diesen Gründen synthetisiert und untersucht man häufig

Modellkomplexe, die die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Metallzentrums in einem Biopolymer möglichst genau wiedergeben. Die Aminosäuren in Peptiden besitzen dieselben Donorgruppen wie Proteine, und Oligopeptiden können somit als Modelle für Metall-Protein-Wechselwirkungen dienen. Besonders interessant sind auch Ternärkomplexe, die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und DNA modellieren können. Das Studium der Ternärwechselwirkungen wird von unterschiedlichen Blickwinkeln und Komplexitätsstufen der Modellsysteme betrieben, je nachdem, ob zur Untersuchung Aminosäuren, Peptide oder Proteine auf der einen und Nucleobasen, Nucleoside/-tide oder Oligonucleotide auf der anderen Seite verwendet werden [51-54]. Als Seitenketten der Peptide in Modellverbindungen erscheinen die Aminogruppe von Lysin, die Phenolatgruppe von Tyrosin, die Guanidinogruppe von Arginin, die Carboxylatgruppen von Asparaginsäure sowie der Imidazolrest von Histidin geeignet, da sie die unterschiedlichen Arten der oben beschriebenen Wechselwirkungen zwischen Seitenketten der Peptide und Nucleotide oder zwischen Seitenketten von Oligopeptiden eingehen können [53-54]. Besonders interessant ist die Aminosäure Lysin, da sie auf Grund ihrer positiv geladenen Seitenkette zusätzlich noch zum Ladungsausgleich des Polyanions DNA beitragen kann [23-24].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Synthese und spektroskopische Charakterisierung von Modellverbindungen für ternäre Metall-Nucleotid-Dipeptid-Komplexe und binäre Metall-Oligopeptid-Komplexe. Zur Untersuchung in Lösung eignet sich besonders die NMR-Spektroskopie, wobei es sich jedoch um diamagnetische, auf der NMR-Zeitskala inerte Komplexe handeln sollte, um Daten zu erhalten, die eine sichere Zuordnung gewährleisten. Hierzu bieten sich die schwereren Übergangselemente mit d^8 -Elektronenkonfiguration an, wie Pd(II) und Pt(II).

Im ersten Kapitel der vorliegenden Arbeit werden zunächst allgemeine Kriterien für Koordinationseigenschaften von Peptiden und Strukturaufklärung in Lösung durch ^1H -NMR-Experimente diskutiert. Im zweiten Teil stehen Dipeptid-Komplexe im Mittelpunkt der Untersuchungen. Zuerst werden die binären Palladiumkomplexe als Ausgangsverbindungen synthetisiert und charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Dipeptide Glycyl-L-Lysin, L-Lysyl-Glycin und L-Tyrosyl-L-Lysin verwendet. Durch Umsetzung der Desoxyribonucleotide mit diesen monofunktionellen Metallkomplexen sollen ternäre Metall-Nucleotid-Dipeptid-Komplexe synthetisiert werden. Mit Hilfe von eindimensionalen(1D)- und zweidimensionalen(2D)-NMR-Techniken sollen die Strukturen der Verbindungen und insbesondere deren Verhalten in Lösung untersucht werden. Daneben soll auch geklärt werden, inwiefern

intramolekulare Wechselwirkungen von Dipeptiden mit Nucleotiden auftreten und ob und wie diese möglicherweise zur Erkennung der DNA-Stränge bzw. zur Stabilisierung der resultierenden Strukturen beitragen können.

Im dritten Teil werden die Oligopeptide L-Arg-L-Lys-L-Asp, Gly-L-Lys-L-His und L-Asp-L-Ala-L-His-L-Lys in ihrem Koordinationsverhalten im biologisch relevanten Medium Wasser untersucht. Außerdem ist die Frage zu klären, ob auch in diesen binären Verbindungen intramolekulare Wechselwirkungen zwischen Seitenketten der Oligopeptide zu beobachten sind. Diese Untersuchung sollte Ausgangspunkt für ternäre Metall-DNA-Protein-Komplexe sein.

B. Hauptteil

Kapitel I Einführung und Grundlagen

1. Koordinationseigenschaften von Peptiden

Die monomeren Bausteine der Proteine sind die 20 natürlich vorkommenden α -Aminosäuren. In ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften wie Polarität, Basizität, Aromatizität, Größe, konformationelle Flexibilität, Fähigkeit zur Vernetzung bzw. Wasserstoffbrücken-Bildung und chemische Reaktivität unterscheiden sich die 20 Aminosäuren ganz erheblich. Viele davon stellen Donoratome bereit, die für die Koordination von Metall-Ionen geeignet sind (Tab.1) [55].

Tab. 1: pK_a -Werte von Aminosäuren [55]

Aminosäure	pK_a der Seitenkette
Arginin	12.48
Asparaginsäure	3.65
Cystein	8.35
Glutaminsäure	4.25
Histidin	6.00
Lysin	10.79
Tyrosin	10.13

α -COOH	~ 2.20
α -NH ₃ ⁺	~ 9.50

Die am weitesten verbreitete Klassifizierung der Aminosäuren erfolgt gemäß der Polaritäten ihrer Seitenketten. Unter dem koordinationschemischen Aspekt ist allerdings eine Unterteilung nach Art und Anzahl der funktionellen Gruppen, von Volshstein vorgeschlagen, zweckmäßiger [56].

Klasse I : Aminosäuren mit je einer Carboxylat- und Aminofunktion (z. B. Gly, Ala)

Klasse II : Aminosäuren mit zwei Carboxylat- und einer Aminofunktion (Asp, Glu)

Klasse III : Aminosäuren, die eine Schwefelgruppe besitzen (Cys, Met)

Klasse IV : Aminosäuren, die mehr als eine basische Funktion enthalten (His, Lys, Arg)

Welcher Komplex ausgebildet wird, hängt von dem Zentralatom und der Gruppenzugehörigkeit der koordinierten Aminosäure ab. Die Koordination ist nicht nur vom Zentralatom und der Aminosäure, sondern auch von den eingestellten Reaktionsbedingungen, insbesondere dem pH-Wert, abhängig [57]. Die Koordination von Aminosäuren und ihren Derivaten an Palladium(II)zentren ist in zahlreichen Veröffentlichungen dokumentiert [58-63].

Durch Kondensation der Amino- und Carboxylatgruppe zweier Aminosäuremoleküle erhält man eine Peptidbindung. Der pK_a -Wert der entstandenen Amid-Gruppe beträgt ca. 14 [64]. Die Koordinationseigenschaften von Peptiden hängen auch stark davon ab, ob zur Koordination befähigte Seitenketten vorhanden sind. Neben den von den Seitenketten bereitgestellten Donoratomen können sich Metall-Ionen auch an peptidische Carbonylgruppen, an deprotonierte Stickstoffatome der Peptidbindungen sowie an die N-terminale Amino- bzw. die C-terminale Carboxylatgruppe binden. Die vorherrschenden Seitenkettenliganden sind der Imidazolrest von Histidin, die Carboxylatgruppen von Asparaginsäure sowie die Phenolatgruppe von Tyrosin. Weniger häufig zu beobachtende Metallendonoren sind die Aminogruppe von Lysin und möglicherweise auch die Guanidinogruppe von Arginin.

Der resultierende Metall-Chelatkomplex ist ungewöhnlich stabil, was zum Teil auf den günstigen entropischen Faktor zurückzuführen ist, der mit der Freisetzung nichtchelatisierender Liganden aus der Koordinationssphäre verbunden ist. Die zur Ausbildung eines dreizähligen Chelates notwendige Amiddeprotonierung kann jedoch nicht von allen Metallen erreicht werden [64]; so wird z. B. für Zn(II) nur die zweizählige Koordination beobachtet [65]. Im allgemeinen werden stabile Metallkomplexe mit Oligopeptiden ausgebildet, wenn das Metallion in der Lage ist, das Amidproton unter Ausbildung eines fünfgliedrigen Rings zu substituieren [58-60]. Die C-terminale Carboxylatgruppe kann durch andere Donoratome der Seitenketten ersetzt werden [61-63]. Die Voraussetzung für eine Koordination von Seitenkettenliganden ist, daß sich neben dem Amino-Amid-Fünfring ein zweiter Fünf- oder Sechsring ausbilden kann. Falls diese Bedingungen nicht gegeben sind, werden die Donoratome der Seitenkette unter Umständen durch eine Dimerbildung in die Komplexbildung mit einbezogen [66,67].

1.1. Koordinationseigenschaften von Dipeptiden

Wenn die zur Koordination befähigten Seitenketten nicht vorhanden sind, sind neben der einzähligen Koordination zwei Chelatkomplexe möglich: Zweizählige über Amino- und Carbonylgruppe an das Metallzentrum bzw. dreizählige über Amino-, Amid- und Carboxylatgruppe [58,59,68]. Die Geometrie der Dipeptide erlaubt, daß ein dreizähliger Chelatkomplex mit Metallkoordination entstehen kann, wobei sich zwei 5-gliedrige Ringe ausbilden. Für einige labile und in der Bioanorganischen Chemie wichtige Übergangsmetalle, z. B. Cu(II), Ni(II), Pd(II), und Pt(II), konnte dieses Bindungsmuster nachgewiesen werden. Für Pd(II) erfolgt die hierfür notwendige Amiddeprotonierung schon bei $\text{pH} \approx 2$, für Cu(II) im schwach sauren pH-Bereich und für Co(II) bei $\text{pH} \approx 10$ [64,65].

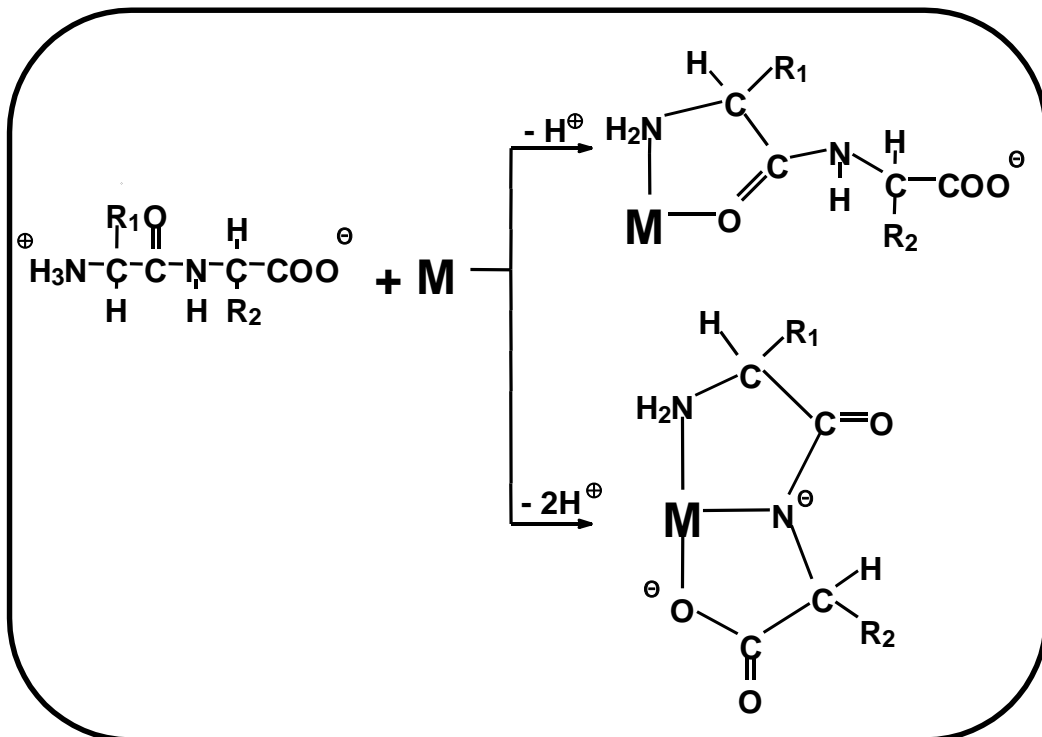


Abb. 3: Chelatkomplexe mit Dipeptiden, die nicht-koordinierende Seitenketten besitzen

1.2. Koordinationseigenschaften von kurzen Oligopeptiden

Umsetzungen von Metallionen mit kurzen Oligopeptiden sowie Strukturdaten über Metalloproteine sind veröffentlicht [69-71]. Auch die Reaktion von Palladium(II) mit kleineren Peptiden und Proteinen wird in der Literatur beschrieben [58-63].

Bei kurzen Oligopeptiden, z. B. Tri- oder Tetrapeptiden, bildet sich ein vierzähliger Chelatkomplex mit zwei deprotonierten Amidgruppen aus, wenn zur Koordination befähigte Seitenketten nicht vorhanden sind [60,72]. Besitzt eine Aminosäure in Oligopeptiden jedoch eine koordinierende Seitenkette, so erhöht sich die Zahl der möglichen Komplexe. In vielen Fällen wird der Carboxylatsauerstoff im Chelatkomplex durch bessere Donoratome ersetzt, falls diese sterisch verfügbar sind [61-63]; z.B. kann Histidin den Imidazolstickstoff anbieten. Für Histidin sind Beispiele bekannt, in denen ein vierzähliger Chelatkomplex ausgebildet wird, wobei die Koordination über den Amino-, zwei Amid- und den Imidazolstickstoff unter Ausbildung von zwei fünf- und einem sechsgliedrigen Ring erfolgt [63]. Wenn Histidin die erste, zweite sowie dritte Position des Aminoterminus ist, kann die nächste Amiddeprotonierung durch Koordination des Imidazolstickstoffs verhindert werden [73-75]. Dies gilt auch für Asparaginsäure, wenn Asparaginsäure die zweite oder dritte Position des Aminoterminus ist. Die nächste Amiddeprotonierung kann auch durch Koordination der β -Carboxylatgruppe verhindert werden [63, 76]. (Abb. 4)

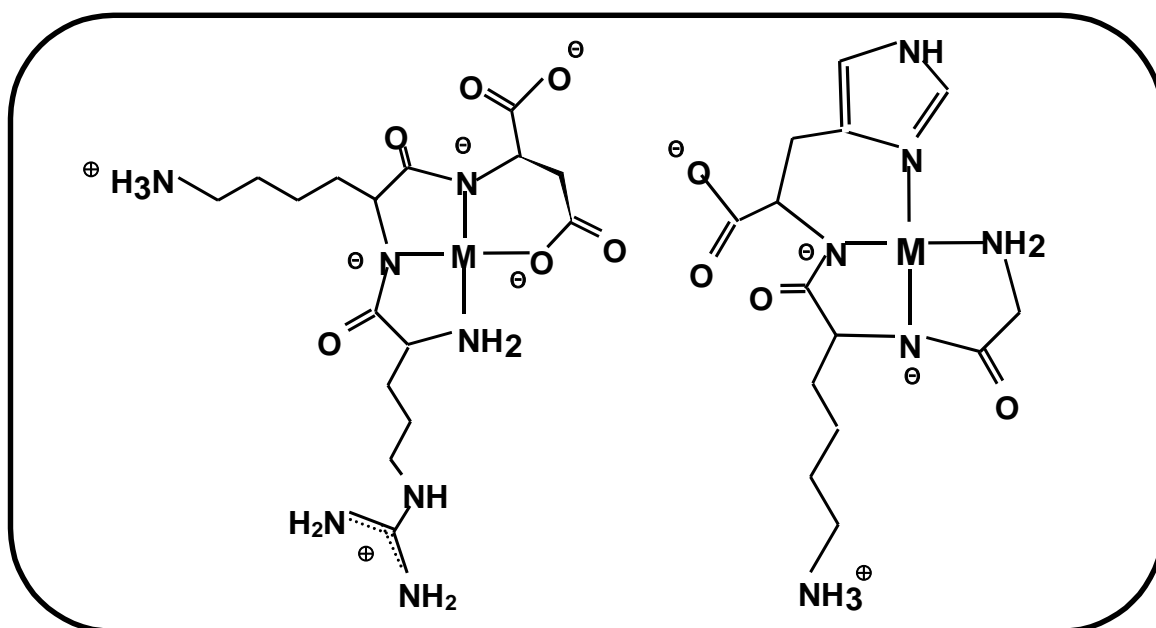


Abb. 4: Vierzählige Koordination durch ArgLysAsp und GlyLysHis

2. Erkennung von Teilstrukturen durch NMR : Einführung in die Methode der Strukturaufklärung mit ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie.

Unter den wichtigen spektroskopischen Hilfsmitteln, die dem Chemiker bei der dreidimensionalen Strukturaufklärung zur Verfügung stehen, nimmt die magnetische Kernresonanz-Spektroskopie zweifellos die führende Stellung ein. Aus ^1H - und in geringerem Maße auch aus ^{13}C -, ^{15}N - und ^{31}P -NMR-Spektren kann man Informationen über Abstände (aus Nuclear-Overhauser-Studien) und Torsionswinkel (aus den Kopplungskonstanten) der dreidimensionalen Struktur von Biopolymeren einschließlich der gebundenen Metall-Ionen erhalten [68,77,78]. Bei solchen Untersuchungen ist die Messung von Proton-Proton-Abständen und Torsionswinkeln sowie eine Zuordnung von verschiedenen Resonanzen eines NMR-Spektrums erforderlich. Anhand von NMR-Experimenten kann ein Molekül oder ein größerer Komplex in Lösung ohne störenden Einfluß durch Kristallpackungen studiert werden, und zugleich können auch dynamische Prozesse wie Assoziations-, Austausch- oder Konformationsgleichgewichte in Abhängigkeit vom pH-Wert oder der Temperatur untersucht werden [79-82].

Die Zuordnung der Protonensignale beruht zum einen auf zweidimensionalen(2D) Korrelations-Experimenten (COSY bzw. TOCSY), mit deren Hilfe man skalare Kopplungen über Bindungen sichtbar machen kann, und zum anderen auf 2D-NOE-Experimenten (NOESY), über die man die räumliche Nähe zweier Protonen nachweist [83,90]. Das TOCSY-Spektrum besitzt dabei gegenüber dem COSY-Experiment zwei Vorteile [83-85]. Der eine ist, daß auch weitreichende skalare Kopplungen ($^4J_{\text{HH}}$, $^5J_{\text{HH}}$) neben den Kopplungen direkt benachbarter Protonen im Spektrum beobachtet werden können. Kurze Zeiten (20-50 ms) liefern vorwiegend *cross-peaks* von stark gekoppelten Protonen, während längeres Mischen (100-300 ms) den Magnetisierungstransfer zwischen entfernteren Protonen des Spinsystems begünstigt. Auf diese Weise können die Peptidprotonen, die zu den gleichen Aminosäureresten gehören, und bei Nucleosiden bzw. Nucleotiden die Zuckerprotonen, die zu der Desoxyribose gehören, leicht identifiziert werden. Der andere Vorteil liegt darin, daß der Magnetisierungstransfer hier zu einem Nettoeffekt führt und alle Signale nahezu reinen Absorptionscharakter besitzen. Die Gefahr der Auslöschung von *cross-peaks* deshalb besteht nicht.

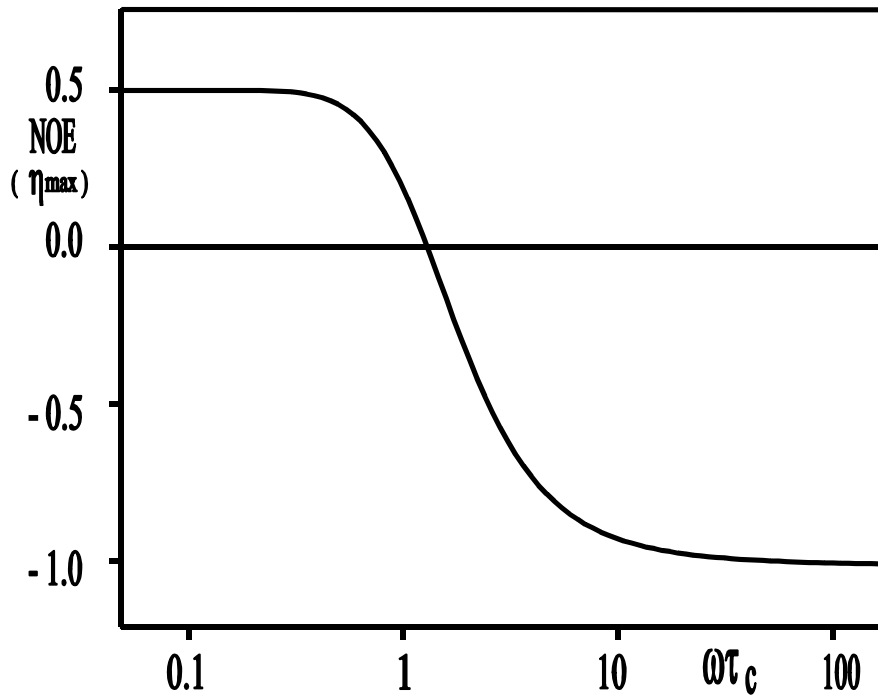


Abb.5: Abhängigkeit des homonuklearen Kern- Overhauser-Effekts zwischen Protonen vom Produkt aus Resonanzfrequenz ω und molekularer Korrelationszeit τ_c .

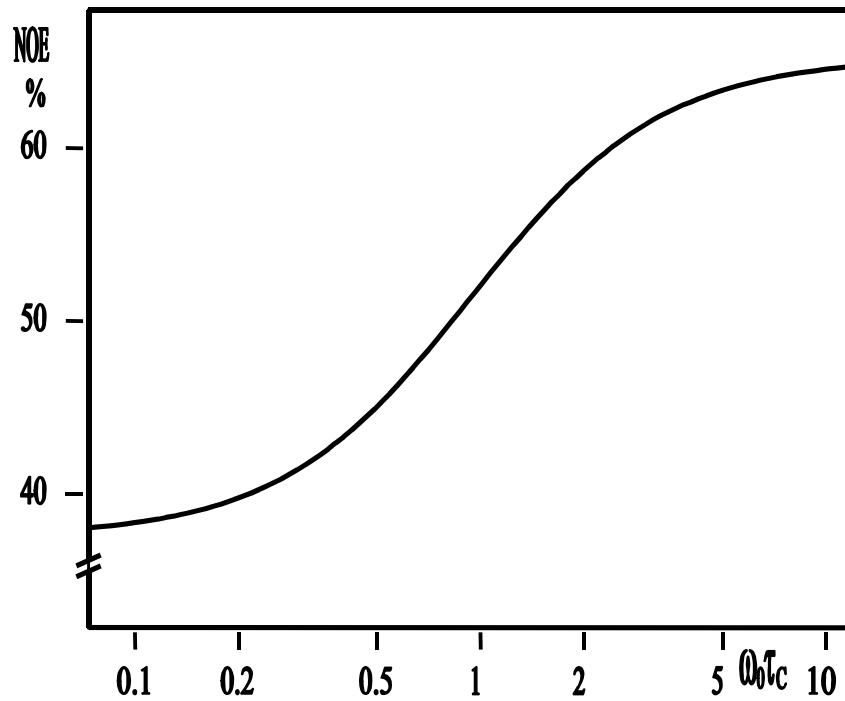


Abb. 6: Abhängigkeit des ROESY-Effekts für ein homonukleares Zweispinsystem vom Produkt aus Resonanzfrequenz ω_0 und molekularer Korrelationszeit τ_c .

Der Kern- Overhauser-Effekt (Nuclear Overhauser Effect, NOE) ist eine relative Intensitätsänderung des Kernresonanzsignals, nach Störung eines anderen Kernresonanzsignals durch Sättigung [83-86]. Kerne in räumlicher Nachbarschaft zueinander treten über dipolare Kopplungsmechanismen miteinander in Wechselwirkung und tauschen Magnetisierung aus. Strahlt man bei der Resonanzfrequenz eines der Kerne Energie ein, so kann diese Wechselwirkung durch eine Intensitätsveränderung der Resonanzlinie des gekoppelten Kernes sichtbar gemacht werden. Die Intensitätsveränderung ist umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstandes der Kerne, und die Kopplung erstreckt sich über eine Entfernung von bis zu 5.5 – 6.0 Å. In der Konformationsanalyse von Biomolekülen ist die NOESY-Spektroskopie heute unentbehrlich geworden. Sie hat den Weg zur dreidimensionalen Strukturanalyse in Lösung eröffnet, da nun neben den Korrelationen über das Netzwerk der chemischen Bindung direkte Informationen über räumliche Abstände gewonnen werden können.

Wie in Abb. 5 dargelegt, wirkt sich der beim Kern-Overhauser-Effekt in Abhängigkeit von der molekularen Korrelationszeit τ_c eintretende Vorzeichenwechsel in der Praxis nachteilig aus [83-86]. Beim Vorliegen ungünstiger Korrelationszeiten (in der Nähe des Werts $\tau_c\omega_0 \approx 1.1$) kann die Kreuzrelaxationsrate ($W_2 - W_0$) ≈ 0 werden, und man beobachtet nur einen daher kleinen oder gar keinen NOE mehr. Die Intensitäten von NOESY-Signalen werden dadurch nur ungenau bestimmbar. Zudem werden die Intensitäten durch unterschiedliche Korrelationszeiten innerhalb eines Moleküls sehr stark beeinflusst. Dies kann leicht zu Fehlinterpretationen bezüglich der Abstände führen. Diese Verhältnisse sind manchmal bei biologisch interessanten Molekülen, z. B. Proteinen und Nucleinsäuren, anzutreffen. Es ist deshalb von erheblichem Interesse, daß NOE-Messungen im rotierenden Rahmen von diesem Nachteil befreit sind, da die NOE-Faktoren hier stets positiv sind und mit $\omega\tau_c$ monoton gegen den Grenzwert von 67.5% ansteigen (Abb. 6). Für solche Experimente wird die Bezeichnung ROESY (rotating frame NOESY) verwendet. Sie haben für die Untersuchung insbesondere biologischer Makromoleküle beträchtliche Bedeutung erlangt.

Beim ROESY-Experiment handelt es sich um eine Kreuzrelaxation von transversaler Magnetisierung. Die Pulssequenz für das 2D-ROESY-Experiment ist identisch mit der TOCSY-Sequenz, mit dem Unterschied, daß in der Spinlockzeit jetzt Magnetisierungstransfer durch dipolare Kopplung stattfindet [83,84,91]. Von Vorteil beim ROESY-Experiment ist, daß die Spindiffusion weniger ausgeprägt ist. Beim "normalen" positiven NOE-Effekt besitzen Diagonal- und Crosspeaks entgegengesetzte Vorzeichen, während Austausch-Spektren gleiche Vorzeichen liefern. Allerdings ergibt

der negative NOE-Effekt bei Makromolekülen ebenfalls gleiche Vorzeichen für die Diagonal- und Kreuzsignale. In solchen Fällen kann das ROESY-Experiment zur Unterscheidung herangezogen werden, das immer entgegengesetzte Vorzeichen für beide Signaltypen liefert.

Bei der quantitativen Auswertung von ROESY-Spektren geht man genauso vor wie bei der von NOESY Spektren [91-93]. Zunächst integriert man die Signale der NOESY-Spektren nicht überlappender Resonanzen. Für die quantitative Auswertung muß aber die Abhängigkeit des ROE-Effekts vom Abstand zwischen Resonanz und Lock-Frequenz (Offset-Effekt) berücksichtigt werden [91,92]. Daran anschließend erfolgt die Umrechnung der korrigierten Peakvolumina mit einem bekannten Referenzabstand in Protonenabstände.

Die Resonanzlinie eines Kernes wird durch skalare Kopplung mit gleichen oder heteronuklearen Kernen aufgespalten. Die Größe einer Kopplungskonstante hängt dabei nicht nur von der Zahl der die koppelnden Kerne trennenden Bindungen ab, sondern auch von der Elektronenkonfiguration und räumlichen Anordnung der Kerne. Für viele Substanzklassen stehen heute parametrisierte Karplus-Gleichungen zur Verfügung, die die Abhängigkeit der vicinalen (d. h. Dreibindungs-) Kopplungskonstanten vom Diederwinkel bezüglich der zentralen Bindung charakterisieren [94-97]. Neben der Verwendung von Proton-Proton-Abständen aus NOE-Experimenten ist der Einsatz von Kopplungskonstanten aus der modernen Konformationsanalyse heute nicht mehr wegzudenken. Bei kleineren Molekülen hat man die Schwierigkeit, daß die Zahl der verfügbaren NOEs für eine zuverlässige Strukturbestimmung nicht ausreicht. Die geringe Datenmenge verlangt geradezu die Mitverwendung von Kopplungskonstanten in Strukturberechnungen. Das gilt auch für Proteinoberflächen oder für die aktiven Zentren vieler Proteine. Für die Analyse des Rückgrats von Nucleinsäuren, deren NOE-Werte schwierig zu interpretieren sind, kommen Kopplungskonstanten große Bedeutung zu.

Bei Spinsystemen erster Ordnung (d. h. mit schwacher Kopplung) kann der J-Wert direkt aus dem eindimensionalen(1D) Spektrum abgelesen werden. Bei Signalüberlagerung im 1D-Spektrum hilft oft die Aufnahme eines 2D-Spektrums, da die Kreuzsignale in ihrer Feinstruktur in der Regel die gleichen Multiplizitäten enthalten wie die entsprechenden 1D-Signale. Man kann also bei wohl separierten Multipletlinien Kopplungskonstanten einfach aus dem Querschnitt eines Crosspeaks ablesen [98-100].

Enthält ein Molekül ein asymmetrisches Kohlenstoff-Atom, so kann dadurch die magnetische Äquivalenz benachbarter Protonen oder Protonengruppen aufgehoben werden [88]. So findet man, um ein konkretes Beispiel zu nennen, in den L-Aminosäuren für die Methylenprotonen des β -Kohlenstoff-Atoms einen AB-Teil des ABX-Spinsystems. Zur Erklärung betrachten wir die miteinander im Gleichgewicht stehenden Konformationen I-III, die sich durch Newman-Projektionen darstellen lassen (Abb. 7). Die Kopplungskonstanten in diesen Molekülen werden durch Konformationsgleichgewichte beeinflusst. Die beobachteten Kopplungskonstanten sind dann Durchschnittswerte, die sich auf der Basis der Molenbrüche p_i aus den Kopplungskonstanten der individuellen Konformer zusammensetzen [84]. In diesem Fall gilt für ein Gleichgewicht zwischen drei Konformationen I, II und III der

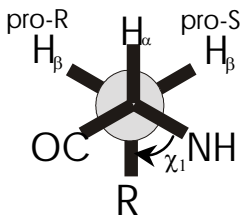
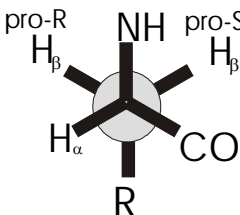
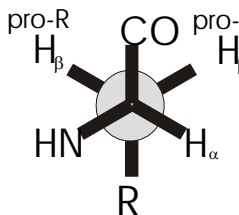
Rotamer	I	II	III
	$g_2g_3(h)$	$g_2t_3(g)$	$t_2g_3(t)$
χ_1	60°	180°	-60°
			
$^3J(H_\alpha H_\beta^{pro-R})$ (Hz)	klein(3.4)	klein(3.4)	groß(12.9)
$^3J(H_\alpha H_\beta^{pro-S})$ (Hz)	klein(3.4)	groß(12.9)	klein(3.4)
NOE(NH, H_β^{pro-R})	schwach	stark	stark
NOE(NH, H_β^{pro-S})	stark	stark	schwach
NOE($H_\alpha H_\beta$)	$H_\alpha H_\beta^{pro-R} \sim H_\alpha H_\beta^{pro-S}$	$H_\alpha H_\beta^{pro-R} > H_\alpha H_\beta^{pro-S}$	$H_\alpha H_\beta^{pro-R} < H_\alpha H_\beta^{pro-S}$

Abb. 7: Die drei gestaffelten Rotamere (um die C_α — C_β -Bindung des Aminosäurerestes) im Peptid, die sich durch Newman-Projektionen darstellen lassen. Die zu erwartenden Kopplungskonstanten und NOEs für jedes Rotamer sind angegeben.

Zusammenhang $J_{\text{beob}} = p_I J_I + p_{II} J_{II} + p_{III} J_{III}$ (mit p_i = Population der individuellen Konformeren). Eine analoge Beziehung existiert für die chemische Verschiebung. Wie man sieht, befinden sich $H_{\beta}^{\text{pro-R}}$ und $H_{\beta}^{\text{pro-S}}$ stets in verschiedener chemischer Umgebung, denn selbst wenn die Populationen der drei Rotameren I, II und III gleich sind, bleibt die Nichtäquivalenz zwischen $H_{\beta}^{\text{pro-R}}$ und $H_{\beta}^{\text{pro-S}}$ bestehen, da wegen der Anwesenheit des chiralen α -Kohlenstoffs für die Resonanzfrequenzen $\nu_1(\text{I}) \neq \nu_2(\text{III})$, $\nu_2(\text{I}) \neq \nu_1(\text{II})$ und $\nu_2(\text{II}) \neq \nu_1(\text{III})$ gilt. Neben den Kopplungskonstanten sind für eine stereospezifische Zuordnung der β -CH₂-Protonen und für eine sichere Unterscheidung der Rotameren die NOE-Intensitäten zu berücksichtigen (Abb. 7) [83].

Kapitel II Dipeptid-Komplexe

1. Verwendete Dipeptide

1.1. Glycyl-L-Lysin (GlyLys)

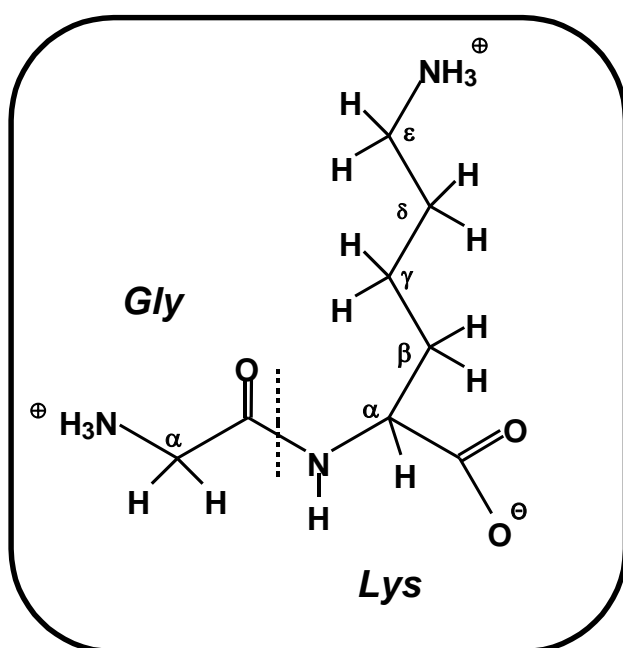


Abb. 8: Strukturformel von Glycyl-L-Lysin

Bei dem Dipeptid Glycyl-L-Lysin handelt es sich um das einfachste Modell für ein lysinhaltiges Peptid mit dem Aminosäurebaustein Glycin als N-Terminus. Die Seitenkette des Lysinrestes ist insofern interessant, als die positiv geladene Aminosäure-Seitenkette mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA ionische Wechselwirkungen eingehen kann [23, 24, 43]. Die pKa-Werte des Dipeptids liegen bei 3.00 für die Carboxylatgruppe, 8.13 für die α -Aminogruppe und 10.57 für

die ϵ -Aminogruppe des Lysinrestes [101, 102]. Der Amidstickstoff wird erst im stark basischen Milieu bei pH \sim 15.2 deprotoniert [64]. Vergleicht man Dipeptide mit den freien Aminosäuren, so zeigt sich, daß der pKa-Wert der Carboxylatgruppe um 0.8 Einheiten steigt, während er für die α -Aminogruppe um 1.1 Einheiten fällt.

Die Seitenkette des Glycinrestes besteht aus nur einem Proton. Da die beiden Protonen der α -CH₂-Gruppe des Gly chemisch nicht äquivalent, d. h. diastereotop sind, erscheint dieses Signal im ¹H-NMR-Spektrum je nach Aufnahmebedingungen und Verbindung nicht als Singulett [84,87]. Das ¹H-NMR-Spektrum des Dipeptids in D₂O zeigt in stark saurem Milieu (pD = 3.0), in dem das Dipeptid vollständig protoniert ist, für α -CH₂-Gly ein Singulett bei δ = 3.86 ppm. Im neutralen und alkalischen Milieu, in

dem das Dipeptid als Zwitterion vorliegt, spalten beide Protonen durch geminale Kopplung in ein Triplet auf. Das A₂-Spinsystem zeigt eine Kopplungskonstante von ${}^2J = -16.52$ Hz bei $\delta = 3.83$ ppm, pD = 7.5. Bei Erhöhung des pD-Wertes führt die Deprotonierung der α -Aminogruppe zu einem Hochfeldshift des Signals ($\Delta\delta = -0.37$ ppm bei pD 13).

Auf Grund ihrer Nachbarschaft zum chiralen α -Kohlenstoff sind die beiden Protonen der Methylengruppe des Lysinrestes nicht äquivalent; deshalb bildet das Methinproton den X-Teil eines ABX-Systems [87, 88]. Die 4 Linien des Methinprotons bei $\delta = 4.17$ ppm (pD = 7.5) stellen den X-Teil dar und entstehen durch Kopplung (${}^3J_{av} = |{}^3J_{AX} + {}^3J_{BX}|/2 = 13.39$ Hz) mit den beiden nicht-äquivalenten Methylenprotonen. Wenn die relativen chemischen Verschiebungen $\nu_0\delta$ (Hz) zwischen den β -Methylenprotonen klein sind, kann man nur die Summe der vicinalen Kopplungskonstanten $|{}^3J_{AX} + {}^3J_{BX}|$ aus dem Peak des Methin-Protons erhalten. Zur weiteren Strukturaufklärung wird die Konformation dieser Seitenkette analysiert, die durch den Diederwinkel um die C $_{\alpha}$ —C $_{\beta}$ -Bindung bestimmt ist. Wie in Kap. I dargelegt wurde, sind die beobachteten Kopplungskonstanten in diesen Molekülen Durchschnittswerte der drei gestaffelten Rotameren um die C $_{\alpha}$ —C $_{\beta}$ -Bindung des Aminosäurerestes. Bei der Berechnung der Rotamerenverteilung wird von dieser Annahme ausgegangen. Bei ABX-Spinsystemen können die 3J -Werte, ${}^3J_{AX}$ und ${}^3J_{BX}$, direkt aus dem 1D-Spektrum abgelesen werden. Die Populationen P_I, P_{II} und P_{III} der drei Rotameren I, II und III werden aus diesen vicinalen Kopplungskonstanten nach der Methode von Pachler berechnet [103, 104]. Im Falle von Aminosäureseitenketten kleiner Peptide stimmen experimentelle Befunde mit dem Ergebnis entsprechender Berechnungen gut überein [105, 109]. Die berechnete Konformation der Seitenkette des Lysinrestes bei pD 7.5 weist demnach einen h-Anteil von 19.8 % und einen (g + t)-Anteil von 81.2 % für die entsprechenden Rotamere auf. Bei Verminderung des pD-Wertes führt die Protonierung der Carboxylatgruppe und der dadurch verursachte Elektronenzug zu einer Tieffeldverschiebung der Resonanz ($\Delta\delta = 0.17$ ppm, ${}^3J_{av} = 13.55$ Hz bei pD 3). Bei diesem pD-Wert befindet sich die Seitenkette des Lysinrestes zu 21.2 % in der Rotamer h-Konformation, was bedeutet, daß der Einfluß der Protonierung/Deprotonierung der Carboxylatfunktion auf die Populationen der drei Rotameren gering ist.

Die Methylenprotonen der Lysinseitenketten, mit Ausnahme der ϵ -CH₂-Protonen, erzeugen durch die Kopplung mit den sie umgebenden Protonen drei Multipletts (δ (β -CH₂) = 1.84, δ (γ -CH₂) = 1.42 und δ (δ -CH₂) = 1.73). Die ϵ -CH₂-Protonen bilden ein

Triplett bei $\delta = 2.99$ ppm, welches durch die Spin-Spin-Wechselwirkung mit der δ -CH₂-Gruppe entsteht. Die Zuordnung dieser Methylensignale erfolgt mit einem 2D-DQF-COSY-Experiment.

1.2. L-Lysyl-Glycin (LysGly)

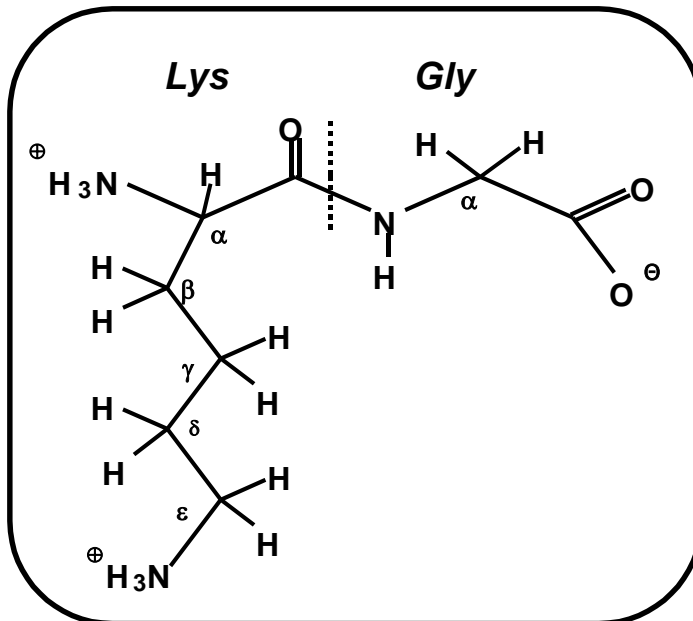


Abb. 9: Strukturformel von L-Lysyl-Glycin.

Beim Dipeptid L-Lysyl-Glycin handelt es sich um das einfachste Modell eines lysinhaltigen Dipeptids mit dem Aminosäurebaustein Glycin als C-Terminus. Die pK_a-Werte des Dipeptids liegen bei 3.10 für die Carboxylatgruppe, 7.75 für die α -Aminogruppe und 10.72 für die ϵ -Aminogruppe des Lysinrestes [101, 102].

Das ¹H-NMR-

Spektrum dieses Dipeptids, welches bei einem vergleichbaren pD 5.6 gemessen wurde, ähnelt weitgehend dem des Glycyl-L-Lysins. Der auffallendste Unterschied entsteht durch die Aufspaltung des α -CH₂-Gly-Signals im neutralen und alkalischen Milieu, in dem das Dipeptid als Zwitterion vorliegt [110-114]. Beide Protonen spalten durch geminale Kopplung in 4 Linien auf. Dieses AB-Spinsystem zeigt eine Kopplungskonstante von $2J_{AB} = -17.17$ Hz, und die chemisch nicht äquivalenten Protonen liegen bei $\delta = 3.77$ und 3.84 ppm. Die äußeren Linien sind geringerer Intensität als die zentralen Linien, ein Resultat des Dacheffekts [84]. In stark saurem Milieu (pD = 3.0), in dem das Dipeptid vollständig protoniert ist, wird ein Singulett bei $\delta = 3.93$ ppm in D₂O durch die α -CH₂-Gly-Protonen hervorgerufen. Bei dieser Verminderung des pD-Wertes führt die Protonierung der Carboxylatgruppe und der dadurch verursachte Elektronenzug zu einer Tieffeldverschiebung der Resonanz ($\Delta\delta = 0.13$ ppm). Dieses Phänomen wird im allgemeinen bei den glycinhaltigen Dipeptiden beobachtet [110-114]. Die α -CH₂-Gly-Resonanz der Gly-L-X Dipeptide in D₂O zeigt

ein A_2 -Spinsystem ($\Delta\delta = 0$), wohingegen die der L-X-Gly Dipeptide ein AB-Spinsystem ($\Delta\delta > 0$) zeigt. Eine Titration der Dipeptide in D_2O zeigt das größte $\Delta\delta$ auf, wenn das Dipeptid als Zwitterion vorliegt. Besonders deutlich werden diese Lösungsmittelleffekte dann, wenn zwischenmolekulare Wechselwirkungen in der Lösung dazu führen, daß Solvens und gelöstes Molekül einen schwachen Komplex bilden. Aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen werden bestimmte räumliche Orientierungen dann gegenüber anderen bevorzugt. Als Folge davon beobachtet man im gelösten Molekül spezifische Änderungen der Resonanzfrequenzen einzelner Protonen; dadurch wird $\Delta\delta$ größer. Diese interessante Tatsache läßt sich so erklären, daß die Solvensmoleküle eine starke Wechselwirkung mit bestimmten Rotameren des Dipeptids eingehen, so daß diese stabilisiert werden. Eine solche Wechselwirkung könnte etwa in der Ausbildung intramolekularer Ionenpaare zwischen Carboxylatgruppen und α -Aminogruppen der zwitterionischen Dipeptide durch Verbrückung über Solvensmoleküle liegen. In Wasser kann sich intramolekulare Ionenpaarbildung sowohl zu den L-X-Gly als auch zu dem Gly-L-X aufbauen. Intramolekulare Ionenpaarbildende Rotamere sollten für L-X-Gly im Vergleich zu Gly-L-X bevorzugt sein. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Zunahme der $\Delta\delta$ -Werte beim L-X-Gly-Dipeptid sein.

Das Methin-Proton des Lysinrestes bildet auch wie GlyLys den X-Teil eines ABX-Systems und ruft ein Triplett bei $\delta = 4.05$ ppm ($^3J_{av} = 13.27$ Hz bei pD 5.6) hervor. Die berechnete Konformation der Seitenkette weist demnach einen Rotamer h-Anteil von 22.29 % und einen (g + t)-Anteil von 77.71 % auf. Bei Erhöhung des pD-Wertes führt die Deprotonierung der α -Aminogruppe zu einem Hochfeldshift des Signals ($\Delta\delta = -0.47$ ppm, $^3J_{av} = 13.25$ Hz bei pD 8.5). Der Einfluß der Protonierung/Deprotonierung der Carboxylatfunktion auf die Populationen der drei Rotameren ist gering. Die Methylenprotonen der Lysinseitenkette bilden Multipletts und liegen für β -CH₂ bei 1.93 ppm, δ -CH₂ bei 1.71 ppm und für γ -CH₂ bei 1.48 ppm. Die Lage der ϵ -CH₂-Protonen ist im Vergleich zum Glycyl-L-Lysin identisch ($\delta = 3.00$ ppm).

1.3. L-Tyrosyl-L-Lysin (TyrLys)

Beim Dipeptid TyrLys handelt es sich um das Modell eines tyrosinhaltigen Dipeptids mit dem Aminosäurebaustein Lysin als C-Terminus. Der Tyrosinrest in dem Dipeptid TyrLys hat eine aromatische Seitenkette, welche unter physiologischen Bedingungen ungeladen ist. Diese besteht aus einem Phenolring, der über eine Methylengruppe mit dem chiralen α -Kohlenstoff verbunden ist. Die Seitenkette des Tyrosinrestes ist insofern interessant, als sie sowohl durch Stapelungseffekte wie auch

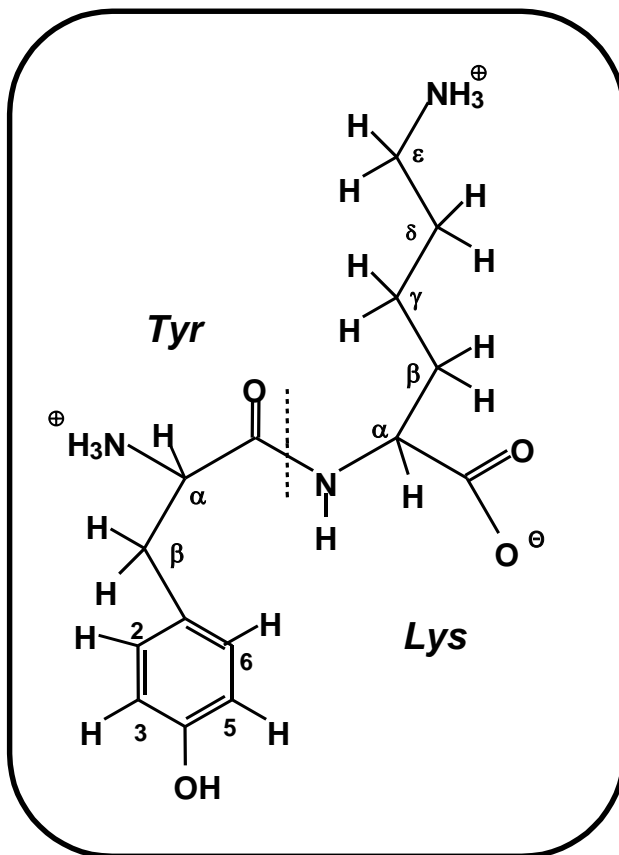


Abb. 10: Strukturformel von L-Tyrosyl-L-Lysin.

Dipeptid als ein AA'BB'-Spinsystem vor [84-85], bei dem jeweils die Protonen H2 und H6 bzw. H3 und H5 chemisch, nicht aber magnetisch äquivalent sind. Dies liegt daran, daß zwei Protonenpaare durch Drehung um eine Symmetrieachse oder Spiegelung an einer Symmetrieebene ineinander übergeführt werden.

Das Methin- und die Methylenprotonen des Tyrosinrestes im aliphatischen Bereich zeigen, bedingt durch das Chiralitätszentrum am α -Kohlenstoff, eine ABX-Aufspaltung [88]. Das Triplet des Methinprotons entsteht durch vicinale Kopplung mit den beiden nicht-äquivalenten Methylenprotonen. Neben der vicinalen Kopplung mit dem Methinproton koppeln die β -CH₂-Tyr-Protonen auch geminal miteinander; dadurch spalten die Signale der Methylenprotonen in acht Linien auf. Nur ν_X - und $^3J_{AB}$ -Werte, die durch drei Resonanzfrequenzen (ν_A , ν_B , ν_X) und drei Kopplungskonstanten ($^3J_{AB}$, $^3J_{AX}$, $^3J_{BX}$) charakterisiert sind, können aus dem Spektrum direkt abgelesen werden. Andere Werte müssen durch Spektrensimulation ermittelt werden. Für die Spektrensimulation wird das Programm Win-DAISY (Version 4.0) verwendet [89].

durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit der DNA wechselwirken kann [115, 116]. Die pK_a-Werte des Dipeptids liegen bei 3.34 für die Carboxylatgruppe, 7.33 für die α -Aminogruppe, 9.72 für die OH-Gruppe der phenolischen Seitenkette und 11.01 für die Aminogruppe des Lysinrestes [117].

Das $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ des Dipeptids zeigt bei pD = 5.7 im aromatischen Bereich die zwei Signale für die H_{2,6}- und H_{3,5}-Phenylprotonen des Tyrosinrestes, welche durch Kopplung miteinander (ca. 8.46 Hz) als Dublett erscheinen (δ = 6.88 und 7.18 ppm). Diese Protonen liegen im freien

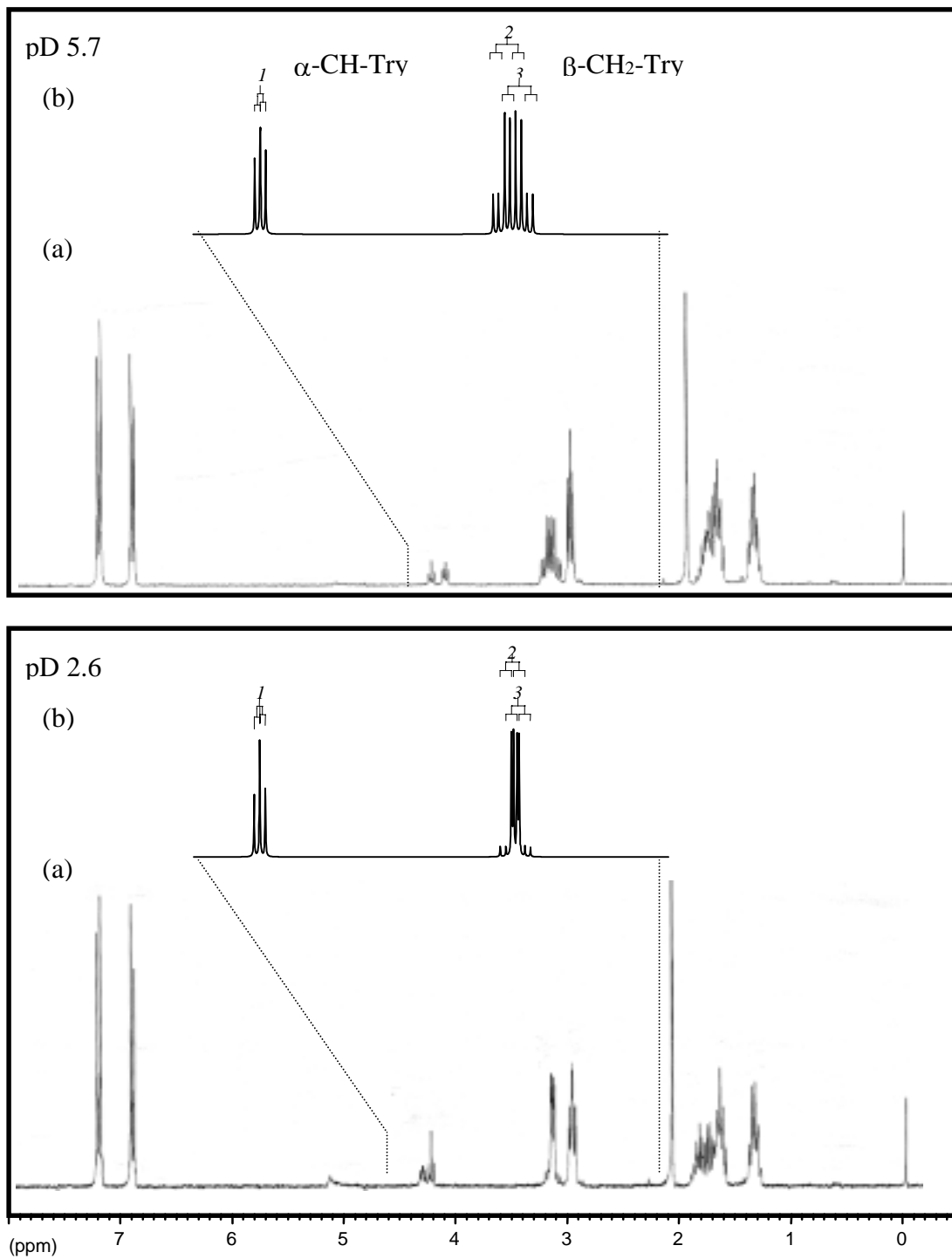


Abb. 11: Gegenüberstellung von Ausschnitten aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von L-Tyr-L-Lys bei pD 5.7 und pD 2.6 in D_2O .

(a) experimentell bestimmt (400 MHz)

(b) simuliert (nur ABX-Spinsystem von $-\text{C}_\alpha\text{H}-\text{C}_\beta\text{H}_2-$ des Tyrosinrestes)

In Abb. 11 sind experimentell ermittelte $^1\text{H-NMR}$ -Spektren den simulierten gegenübergestellt. Eine gute Übereinstimmung ist erkennbar. Tab. 2 gibt die durch Spektrensimulation erhaltenen Kopplungskonstanten und chemischen Verschiebungen von $\text{C}_\alpha\text{H-C}_\beta\text{H}_2$ des Tyrosinrestes an, mit denen die Populationen der drei Rotameren der Seitenkette des Tyrosinrestes bestimmt wurden. Die Population des Rotamers h nimmt in stark saurem Milieu ($\text{pD} = 2.6$) im Vergleich zum Lysinrest des LysGly (22.3 % Rotamer h-Anteil) ab. Bei Anwesenheit des Phenolring sind Rotamere g und t gegenüber dem Rotamer h auf Grund sterischer Hinderung bevorzugt. Bei Erhöhung des pD -Wertes führt die Deprotonierung der Carboxylatgruppe zu einer Zunahme des Rotamer h-Anteils und $\Delta\delta$ ($= \nu_B - \nu_A = 0.09$ ppm). Wie in Kap. II 1.2. dargelegt wurde, läßt sich diese Tatsache so erklären, daß das Lösungsmittelmolekül Wasser die intramolekulare Ionenpaarbildung der zwitterionischen Dipeptide begünstigt, so daß Rotamer h stabilisiert wird.

Tab. 2: Chemische Verschiebungen, Kopplungskonstanten (durch Spektrensimulation ermittelt), und Rotamerenverteilung um $\text{C}_\alpha\text{—C}_\beta$ -Bindung von $\text{C}_\alpha\text{H-C}_\beta\text{H}_2$ des Tyrosinrestes von TyrLys in D_2O .

pD	δ (ppm)			^3J (Hz)			Rotamerenverteilung(%)		
	ν_A	ν_B	ν_X	$^3\text{J}_{AB}$	$^3\text{J}_{AX}$	$^3\text{J}_{BX}$	h	G	T
2.6	3.13	3.16	4.22	14.3	6.92	7.32	13.4	41.5	45.1
5.7	3.11	3.20	4.22	14.3	7.40	6.45	17.1	45.8	37.1

Das Methinproton des Lysinrestes bildet den X-Teil eines ABX-Systems und ruft ein Triplett bei $\delta = 4.30$ ppm ($^3\text{J}_{av} = 13.37$ Hz bei $\text{pD} 2.6$) hervor. Die berechnete Konformation der Seitenkette weist demnach einen Rotamer h-Anteil von 21.34 % und einen (g + t)-Anteil von 78.66 % auf. Bei Erhöhung des pD -Wertes führt die Deprotonierung der α -Aminogruppe zu einem Hochfeldshift des Signals ($\Delta\delta = - 0.21$ ppm, $^3\text{J}_{av} = 12.97$ Hz bei $\text{pD} 5.7$). Die berechnete Konformation der Seitenkette weist demnach einen Rotamer h-Anteil von 12.97 % auf. Der Einfluß der Anwesenheit des benachbarten Phenolring auf die Rotamerenverteilung des Lysinrestes wird größer, wenn TyrLys Zwitterion vorliegt. Die Methylenprotonen der Lysinseitenkette bilden Multipletts und liegen bei $\text{pD} 5.7$ für $\beta\text{-CH}_2$ bei 1.74 ppm, $\delta\text{-CH}_2$ bei 1.66 ppm und für $\gamma\text{-CH}_2$ bei 1.33 ppm. Die Lage der $\epsilon\text{-CH}_2$ -Protonen ist im Vergleich zum Glycyl-L-Lysin identisch ($\delta = 2,98$ ppm).

2. Binäre Palladium(II)-Komplexe mit lysinhaltigen Dipeptiden

Bis heute sind zahlreiche binäre Metall-Dipeptid Komplexe synthetisiert worden [58-63, 68, 118]. Jedoch sind dabei kaum Untersuchungen mit der basischen Aminosäure Lysin durchgeführt worden [119]. Im Sauren bildet das Dipeptid mit dem Metall ein dreizähniges Chelat. Für Pd(II) erfolgt die hierfür notwendige Amiddeprotonierung schon bei $\text{pH} \approx 2$ [64]. Drei der vier äquatorialen Koordinationsstellen des Pd(II) werden von Donoratomen des Dipeptid-Moleküls besetzt, welches über α -Amino-, Amid- und Carboxylatgruppe dreizählig an das Metall koordiniert. Dieses Koordinationsmuster von Dipeptiden ist bereits bei anderen Übergangsmetallionen beobachtet worden [58, 59, 69].

Die Seitenkette des Lysinrestes im Dipeptid besitzt mit der ϵ -Aminogruppe zwar auch eine zur Koordination befähigte Gruppe, jedoch kann diese den Sauerstoff der Carboxylatgruppe im dreizähligen Chelatkomplex nicht ersetzen, da sich - anders als bei His und Met - kein alternativer Chelatingring ausbilden kann. Dasselbe gilt auch für das Dipeptid TyrLys. Das dreizählige Bindungsmuster der Dipeptide GlyLys, LysGly und TyrLys entspricht folglich also dem eines Dipeptids, das ausschließlich aus Aminosäuren mit nicht-koordinierenden Seitenketten aufgebaut ist. Das Donoratom der Seitenkette kann unter diesen Umständen nur dann in die Komplexbildung mit einbezogen werden, wenn eine Di- oder Oligomerisierung erfolgt [120-122]. So kann die vierte äquatoriale Koordinationsstelle am Metall etwa durch die ϵ -Aminogruppe des Lysinrestes oder den Phenolsauerstoff des Tyrosinrestes eines benachbarten Chelatkomplexes eingenommen werden.

Allgemein sind Rotationen um $\text{C}_\alpha\text{—C}_\beta$ -Bindung von großem Interesse (Kap. I Abb. 7). In zahlreichen Untersuchungen wurde die Fragestellung verfolgt, welche Rolle diese Rotation bei der Koordination der Peptide an das Metallion spielt [103-109]. Bei der Komplexierung von Peptiden an Metalle kommen Wechselwirkungen zwischen Seitenketten der Peptide oder zwischen Seitenketten der Peptide und dem Metall eine wichtige Bedeutung zu. Zu diesem Zweck wird, wie schon in Kap. I. 2. dargelegt, die Konformation der nicht-chelatisierten Seitenkette analysiert, die durch die vicinalen Kopplungskonstanten um die $\text{C}_\alpha\text{H—C}_\beta\text{H}_2$ -Bindung festgelegt ist. Nur in Rotamer h befindet sich die Seitenkette oberhalb der Koordinationsebene des Chelatkomplexes und damit können sich intramolekulare Wechselwirkung aufbauen. Unter diesem Gesichtspunkt ist Rotamer h daher der bemerkenswerte Rotamer (Abb. 12).

Die Darstellung des binären Komplexes erfolgt durch die äquimolare Umsetzung von K_2PdCl_4 und Dipeptid. Die Umsetzung wird bei einem pH von 4.0 und

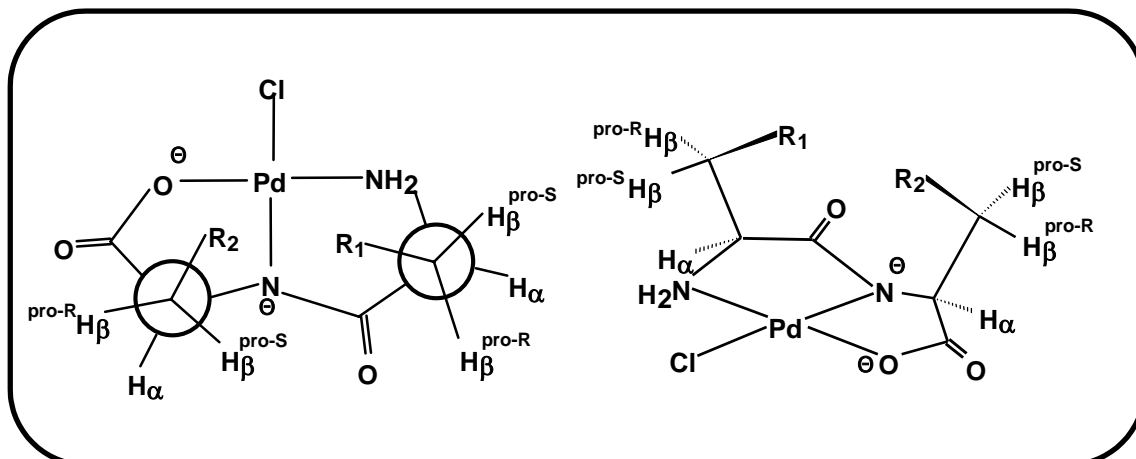


Abb. 12 : Konformation des gestaffelten Rotamer h um die C_{α} — C_{β} -Bindung des Aminosäurerestes im Pd(II)-Dipeptid Komplex.

Raumtemperatur in Wasser durchgeführt. Der pD-Wert fällt während der Reaktion, was auf eine Koordination des Dipeptids unter Deprotonierung hinweist. Der absinkende pH-Wert wird so lange mit KOH reguliert, bis die pH-Wert-Konstanz die Beendigung der Reaktion anzeigt.

2.1 Binärer Pd(II)-Komplex mit L-Tyr-L-Lys

2.1.1. Einleitung

Die Seitenkette des Tyrosinrestes ist bemerkenswert, weil sie nicht nur durch Stapelungseffekte sondern auch durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit der DNA wechselwirken kann [115, 116]. Die Phenolgruppe ist weiterhin in der Lage Wasserstoffbrückenbindungen mit polaren Aminosäureseitenketten in Proteinen auszubilden und fungiert als metallbindende Domäne in Transferrin [123] und Galactose-Oxidase [124]. Neuste Arbeiten zur Struktur des aktiven Zentrums von Galactose-Oxidase und Ribonucleotid-Reduktase zeigen, daß sich das Radikal des Tyrosinrestes in unmittelbarer Nachbarschaft zum Metallzentrum befindet. Tyrosinreste als Aminoterminus werden auch in schmerzlindernden Peptiden wie Enkephalin und Endorphin gefunden [125, 126]. Gairin et al. hat festgestellt, daß die Hydroxylgruppe des Phenolrings an der Metallkoordination im Cu(II)-Enkephalin-Komplex nicht beteiligt ist.

Reaktionen tyrosinhaltiger Dipeptide mit unterschiedlichen Übergangsmetallen zeigen, daß sich die Hydroxylgruppe der Seitenkette im allgemeinen nicht an der

dreizähligen Chelatbildung beteiligt und daß diese Dipeptide in ihrem Koordinationsverhalten mit dem Dipeptid GlyGly vergleichbar sind [127-129].

Die Reaktion von Cu(II) mit tyrosinhaltigen Dipeptiden wurde bisher nur durch potentiometrische Titrations im Hinblick auf Dimerbildung im alkalischen Milieu untersucht [117,120-122], und Röntgenstrukturdaten eines Cu(II)-Komplexes mit L-Lys-L-Tyr liegen vor [130].

Nachfolgend soll der Pd(II)-Komplex von TyrLys in Lösung näher untersucht werden, speziell unter dem Aspekt möglicher Wechselwirkungen der Peptid-Seitenketten.

2.1.2. Charakterisierung von Pd(TyrLys)Cl (1)

Bei pD 3.5 wird Ausbildung des dreizähligen Chelatkomplexes Pd(TyrLys)Cl (1) beobachtet. Sigel [64] zeigte schon anhand einiger Dipeptide, daß der pKa-Wert des Amidprotons so klein ist, daß die Deprotonierung und damit eine Bindung bereits im stark Sauren stattfindet.

Im schwach saurem pD-Bereich (ca. pD = 5) ist vermutlich bereits die ϵ -Aminogruppe des Lysinrestes an das Palladiumelektrophil koordiniert.

¹H-NMR-spektroskopische Charakterisierung

Das ¹H-NMR-Spektrum von Pd(TyrLys)Cl (1) (Abb. 13) zeigt bei pD = 3.9 im aromatischen Bereich die beiden Signal Gruppen für die H_{2,6}- und H_{3,5}-Phenylprotonen des Tyrosinrestes, welche durch Kopplung miteinander (ca. 8.52 Hz) als Triplet von Dubletts erscheinen (δ = 6.91 und 7.20 ppm). Dies ist eine charakteristische Aufspaltung eines AA'BB'-Spinsystems. Der phenolische Sauerstoff ist nicht an der Metallkoordination beteiligt, da eine hierfür charakteristische Hochfeldverschiebung des Signals für diese Phenylprotonen nicht beobachtet wird. Die Methylenprotonen des Tyrosinrestes befinden sich zufällig in gleicher chemischer Umgebung in diesem Komplex, so daß das Methinproton nur ein Triplet und die Methylenprotonen nur ein Dublett ($^3J_{av}$ = 11.23 Hz) erzeugen, entsprechend einem AB₂-Spinsystem [84, 88, 89]. Äußerst auffällig sind die Lage des Triplets für das α -CH-Tyr-Proton und des Dubletts für die β -CH₂-Tyr-Protonen, welches relativ zum freien Liganden um 0.45 ppm und 0.25 hochfeldverschoben erscheinen. Dies ist ein Indiz für eine Koordination der α -Aminogruppe des Tyrosinrestes, da sich das Methinproton des Tyrosinrestes in direkter Nachbarschaft zu dieser Aminofunktion befindet.

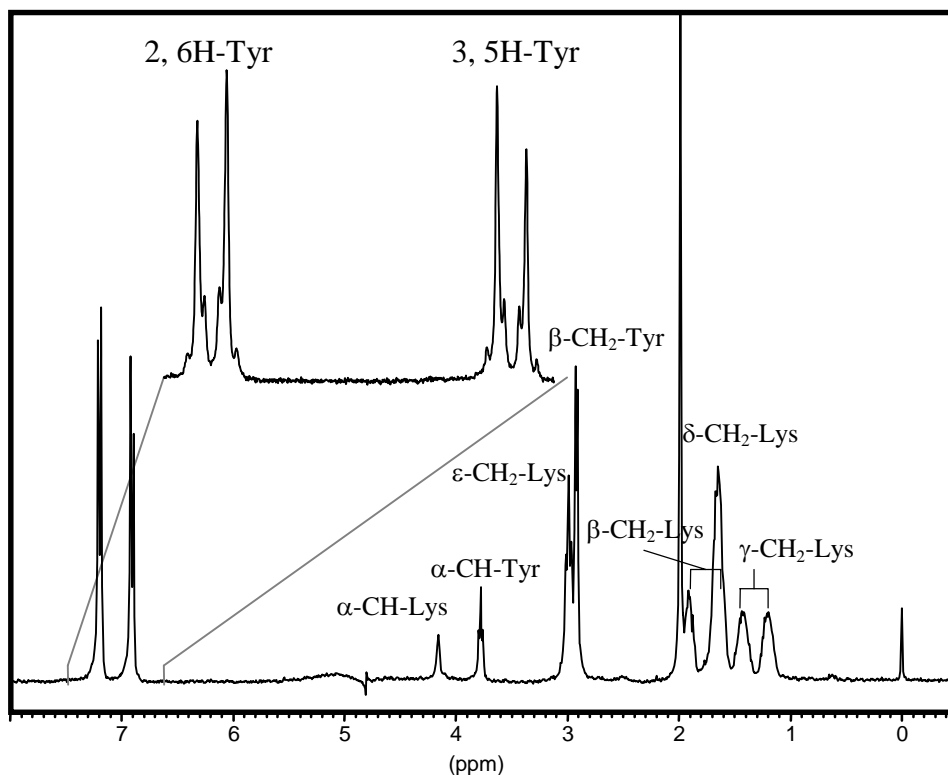


Abb. 13 : ^1H -NMR-Spektrum von $\text{Pd}(\text{TyrLys})\text{Cl}$ (**1**) in D_2O (400 MHz, pD = 5.2, RT)

Charakteristisch ist ferner die Tieffeldverschiebung des $\alpha\text{-CH-Lys}$ -Protons, was auf eine $\text{Pd}(\text{II})$ -Koordination an die deprotonierte Carboxylatgruppe schließen läßt, wobei die Elektronendichte am $\alpha\text{-CH-Lys}$ -Proton verringert wird. Im Gegensatz dazu bewirkt der Ringstromeffekt des Phenylrings des Tyrosinrests eine Hochfeldverschiebung des $\alpha\text{-CH-Lys}$ -Signals. Die gegenläufigen Shifts kompensieren sich weitgehend, so daß eine Tieffeldverschiebung von weniger als 0.04 ppm resultiert. Man erklärt diesen Ringstromeffekt mit einem induzierten Ringstrom, der angeregt wird, wenn das Molekül mit den delokalisierten π -Elektronen in ein Magnetfeld eingebracht wird [84, 88]. Der Ringstrom wiederum erzeugt ein zusätzliches Magnetfeld, dessen Kraftlinien im Zentrum des Aromaten dem äußeren Magnetfeld entgegengerichtet sind. Dies führt wieder zu Bereichen starker und schwacher Abschirmung in der Umgebung des Aromaten. Direkt an den Aromaten gebundene H-Atome befinden sich im Bereich niedrigerer Abschirmung; im ^1H -NMR-Spektrum sind deren Signale tieffeldverschoben. Der Ringstromeffekt ist am größten, wenn die Ebene des Benzolringes senkrecht zur Feldrichtung steht. Die verstärkte Abschirmung sorgt dann für eine

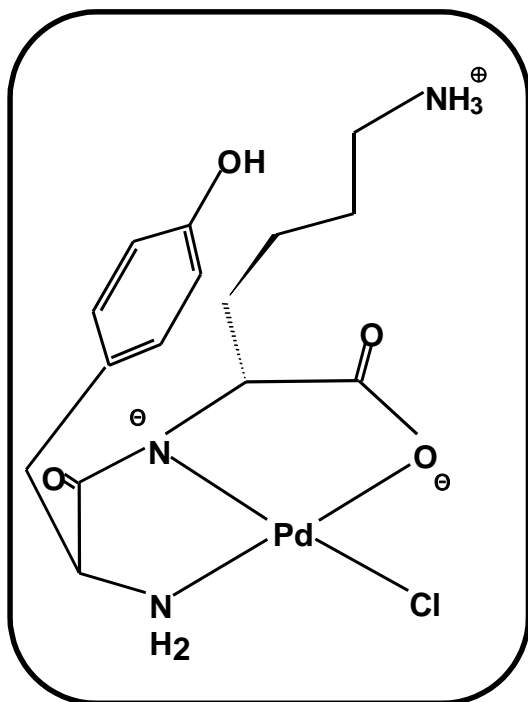


Abb. 14 : Strukturvorschlag für Pd(TyrLys)Cl (**1**)

Hochfeldverschiebung der Resonanzen der dort befindlichen Protonen. Weiterhin ist die Aufspaltung der β -CH₂- und γ -CH₂-Protonen des Lysinrestes im Vergleich zu freien Ligand um $\Delta\delta = 0.29$ und 0.22 ppm auffällig. Für den GlyLys-Komplex tritt nur eine Aufspaltung der β -CH₂-Protonen auf (Kap. II. 3.2). Wahrscheinlich ist die Rotation der Seitenkette des Lysinrestes auf Grund des vorliegenden Phenolrings eingeschränkt, da die beiden Methylenprotonen jeweils unterschiedlich durch den Ringstrom des Tyrosinrestes beeinflusst werden. Die Zuordnung dieser Methylen-signale erfolgt mit einem 2D-DQF-COSY-Experiment. Im sauren Milieu ist die ϵ -Aminogruppe des Lysinrestes nicht an

der Metallkoordination beteiligt, da eine dafür charakteristische Verschiebung des Signals für die C _{ϵ} H₂-Gruppe ($\delta = 2.53$ ppm) nicht eintritt.

Mit Hilfe einer pD-abhängigen NMR-Messung kann dieses Bindungsmuster der Dipeptid-Liganden auch nachgewiesen werden. Die chemischen Verschiebungen der Protonen dieses Komplexes bleiben bei saurem und neutralem pH-Bereich (unterhalb von pD 8) unverändert, d. h. sowohl die α -Amino- als auch die Carboxylatfunktion sind nicht de- bzw. protonierbar. Hieraus ist zu schließen, daß beide funktionellen Gruppen an das Metallzentrum koordiniert sind. Die chemischen Verschiebungen des aromatischen Signals erfahren im Alkalischen durch die Deprotonierung des Phenolrings und die des ϵ -CH₂-Lys-Protonensignals durch die Deprotonierung der ϵ -Aminogruppe einen Hochfeldshift.

Die Ergebnisse der Analyse der ¹H-NMR-Spektren sprechen dafür, daß das Dipeptid TyrLys im Sauren mit dem Palladiumion ein dreizähniges Chelat bildet. Drei der vier Koordinationsstellen werden von einem Dipeptid-Molekül besetzt, welches über α -Amino-, Amid- und Carboxylatgruppe dreizählig an das Metall koordiniert ist. Die vierte Koordinationsstelle wird von einem Chloroliganden besetzt. Dieser Dipeptid-

Komplex zeigt somit das typische Koordinationsmuster eines Dipeptides auf, das aus Aminosäuren mit nicht-koordinierenden Seitenketten aufgebaut ist [58, 59].

Verhalten bei höherem pD-Wert

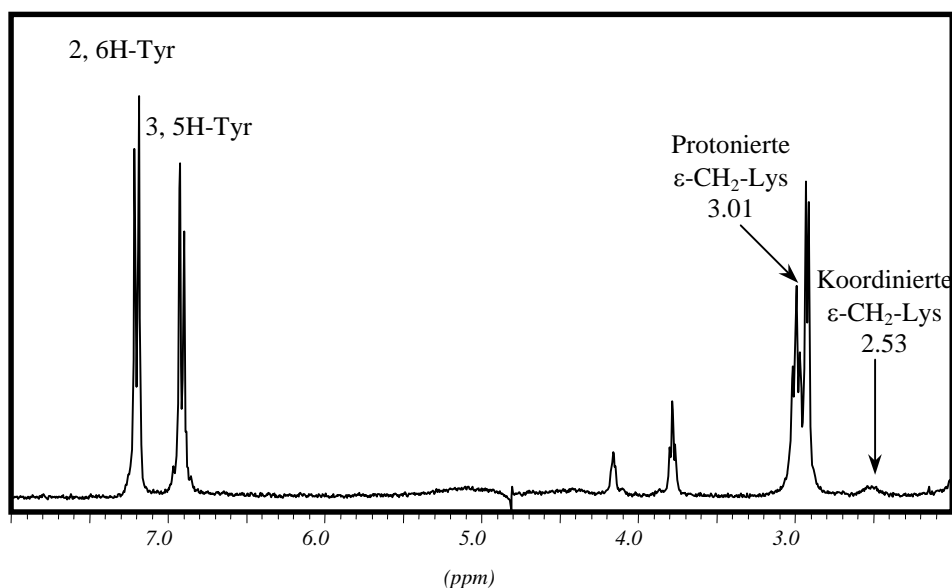


Abb. 15 : Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums von $\text{Pd}(\text{TyrLys})\text{Cl}$ (**1**) in D_2O bei pD 5.2

Bereits im schwach sauren pD-Bereich (ca. pD = 5.0) erscheint bei 2.53 ppm ein neues Signal, welches den $\epsilon\text{-CH}_2\text{-Lys}$ -Protonen zugeordnet wird (Abb. 15). Die Hochfeldverschiebung um 0.46 ppm deutet auf eine Metallkoordination der ϵ -Aminogruppe hin. Bei steigendem pD-Wert wird dieses Signal immer stärker, während das Signal bei 2.99 ppm abnimmt. Der phenolische Sauerstoff ist nicht an der Metallkoordination beteiligt, da eine dafür charakteristische Hochfeldverschiebung des Signals für diese Phenylprotonen bei steigendem pD-Wert nicht eintritt.

Als Beispiele für diesen Koordinationstyp (**2**) sei der $\text{Cu}(\text{II})$ -Komplex mit LysTyr erwähnt [130]. Radomska hat im Festkörper durch Röntgenstrukturanalyse festgestellt, daß die ϵ -Aminogruppe in diesem Komplex an das Metallzentrum koordiniert ist. Potentiometrische Untersuchungen zum Reaktionsverhalten von $\text{Cu}(\text{II})$ ion mit Dipeptiden, die Lysin und Tyrosin enthalten, haben interessante Ergebnisse erbracht [120 - 122]. Im pH-Bereich 8 - 10.5 wurden leicht Dimer-Spezies gebildet. Im Vergleich zum LysTyr-Komplex ist in der Dimer-Spezies des TyrLys-Komplexes der phenolische Sauerstoff an der Metallkoordination beteiligt. In der Dimer-Spezies des

LysTyr-Komplexes hingegen ist die ε -Aminogruppe des Lysinrestes an das Metall koordiniert. Im vorliegenden Fall des Pd(II)-Komplexes des TyrLys ist aber die ε -Aminogruppe des Lysinrestes an der Dimerbildung beteiligt. Diese Tatsache läßt sich damit erklären, daß Pd(II) eine größere Präferenz für N-Donatoren gegenüber O-Donatoren aufweist im Vergleich zu Cu(II) [131], so daß die ε -Aminogruppe des Lysinrestes an der Dimerbildung beteiligt ist.

Rotamere durch Drehung um die C_α — C_β -Bindung der Seitenketten

Röntgenstrukturanalysen von Metallkomplexen mit tyrosinhaltigen Aminosäuren und Dipeptiden, z. B. Cu(L-Lysin-L-Tyrosin) [130], Pd(L-Tyrosin)₂ [132], und Cu(L-Tyrosin)₂ [133] zeigen, daß sich die aromatische Seitenkette oberhalb der Koordinationsebene des Chelatkomplexes befindet, da die Seitenkette eine h-Konformation einnimmt. Die Röntgenstrukturanalyse von Cu(L-Lysin-L-Tyrosin) zeigt, daß sowohl die Seitenkette des Tyrosinrestes als auch die des Lysinrestes eine h-Konformation einnimmt. Diese Tendenz wird auch durch die Analyse der vicinalen Protonenkopplungskonstanten ($C_\alpha H$ - $C_\beta H_2$) dieser Seitenketten in Lösung unterstützt.

Wie im Fall anderer Metall-Peptid-Komplexe werden Änderungen der Seitenkettokonformationen zugunsten des h-Rotamers auch bei der Palladiumkoordination von TyrLys beobachtet, obwohl die Rotamere g und t bei Abwesenheit sterischer Hinderung in wäßriger Lösung bevorzugt sind. Dabei werden die vicinalen Kopplungskonstanten $^3J_{av}$ kleiner. Kopplungskonstanten $^3J_{av}$ betragen 11.23 Hz für die Seitenkette des Tyrosinrestes und 8.05 Hz für die Seitenkette des Lysinrestes bei pD = 3.9. Die berechnete Konformation der Seitenkette weist demnach einen Rotamer h-Anteil von 41.0 % für den Tyrosinrest und 70.2 % für den Lysinrest auf. Die beiden Seitenketten des TyrLys liegen überwiegend oberhalb der Koordinationsebene des Chelatkomplexes. Im Vergleich zum freien Liganden steigt damit der h-Anteil für den Tyrosinrest um 23.9 % (17.1 % Rotamer h-Anteil für freien Liganden) und für den Lysinrest um 57.2 % (13.0 % Rotamer h-Anteil für freien Liganden). Dies ist vermutlich auf die nachgewiesenen schwachen Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten des koordinierten Dipeptides und dem Metallion zurückzuführen. Die Seitenkette in Nachbarschaft zu tetraedrischem Aminostickstoff ist flexibler als die in Nachbarschaft zu trigonalem Amidstickstoff [106]. Aus diesem Grund nimmt generell die Seitenkette des C-Terminus bevorzugter die h-Konformation ein als die des N-Terminus. Das ist die Erklärung für den großen Unterschied des h-

Anteils des Tyrosinrests und des Lysinrests. Ein ähnlicher Unterschied wurde auch zwischen Pd(Gly-L-Phe) und Pd(L-Phe-Gly) nachgewiesen.

Ein 2D-¹H-NOESY-Spektrum kann weitere Informationen über die Anordnung der Liganden im Komplex (**1**) liefern. Befinden sich Protonen des Dipeptids, insbesondere die der beiden Seitenketten, in diesem Komplex in räumlicher Nähe, sollten Crosspeaks im Spektrum erscheinen. Im NOESY-Spektrum von (**1**) sind in einer Pufferlösung bestehend aus 100mM NaClO₄, 10 mM Mg(ClO₄)₂ und 50 mM NaH₂PO₄ bei 268 K keine Crosspeaks zwischen den Seitenketten des Dipeptids zu sehen. Molekülmodelle bestätigen, daß die Struktur der Seitenketten auch dann sehr flexibel ist, wenn man eine Wechselwirkung zwischen koordiniertem Dipeptid und Metallion voraussetzt. Der Abstand der Protonen ist zu groß, als daß Kopplungen zwischen ihnen aufgebaut werden können. Molekülmodelle zeigen auch, daß eine intramolekulare Wechselwirkung in diesem binären Komplex nur dann spannungsfrei möglich ist, wenn die beiden Seitenketten des Dipeptides in einer *h*-Konformation fixiert sind.

2.2 Darstellung und Charakterisierung von Pd(GlyLys)Cl (**3**)

Um eine möglichst selektive Koordination des GlyLys zu erreichen, d. h. um eine Dimer-Bildung zu verhindern, muß der pH-Wert der Lösung während der Reaktion möglichst niedrig gehalten werden. Dies gelingt durch schrittweise Zugabe von 0.1 KOH in kleinen Mengen. Bei pD 4.2 wird die Ausbildung des dreizähligen Chelatkomplexes Pd(GlyLys)Cl (**3**) beobachtet. Im Gegensatz zu TyrLys wird die ε-Aminogruppe des Lysinrestes dann an das Palladiumelektrophil koordiniert, wenn temporär eine inhomogene pH-Erhöhung der Reaktionslösung in saurem Milieu eintritt, dann kann Dimerisierung (**4**) erfolgen.

Die Reaktion ist durch ein neues Signal der α-CH₂-Gly-Protonen im ¹H-NMR-Spektrum gekennzeichnet, welches gegenüber dem Signal des Edukts bei pD = 4.9 um 0.42 ppm zu höherem Feld verschoben liegt. Beide Protonen spalten durch geminale Kopplung in Dublett von Dubletts auf. Dieses AB-Spinsystem zeigt eine Kopplungskonstante von ²J_{AB} = - 17.04 Hz, und die chemisch nicht äquivalenten Protonen liegen bei δ = 3.38 und 3.41 ppm. Ebenso entsteht für das α-CH-Lys ein neues Triplet bei 4.03 ppm (³J_{av} = 8.40 Hz bei pD 4.9). Das Produktsignal liegt im Vergleich zum freien Liganden um 0.14 ppm zu höherem Feld verschoben. Wie aus der Verschiebung der Signale erkennbar ist, sind sowohl das α-Amino- als auch die Carboxylatgruppe an das Palladiumzentrum koordiniert. Weiterhin ist das Vorliegen der Aufspaltung des β-CH₂-Lys-Protonen-Signals bemerkenswert, welche im Vergleich

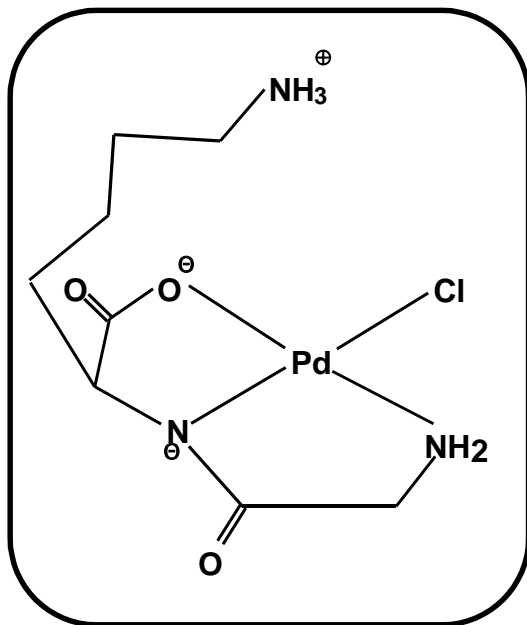


Abb. 16 : Strukturvorschlag für Pd(GlyLys)Cl (**3**)

zum freien Liganden um 0.29 ppm gegeneinander verschoben sind. Dies liegt daran, daß durch die Koordination des Dipeptids an das Metallion die $C_{\alpha}-C_{\beta}$ -Bindung der Seitenkette zur Koordinationsebene eine fixierte Position einnimmt und die Beweglichkeit der Seitenketten des Dipeptids um die $C_{\alpha}-C_{\beta}$ Bindung abnimmt. Im sauren Milieu ist eine Beteiligung der ϵ -Aminogruppe an der Pd(II)-Koordination nicht zu beobachten.

Eine **pD-abhängige NMR-Messung** belegt auch dieses Bindungsmuster des Dipeptid-Liganden. Im Unterschied zur pD-Abhängigkeit des freien Liganden sind die α -CH₂-Gly- und α -CH-Lys

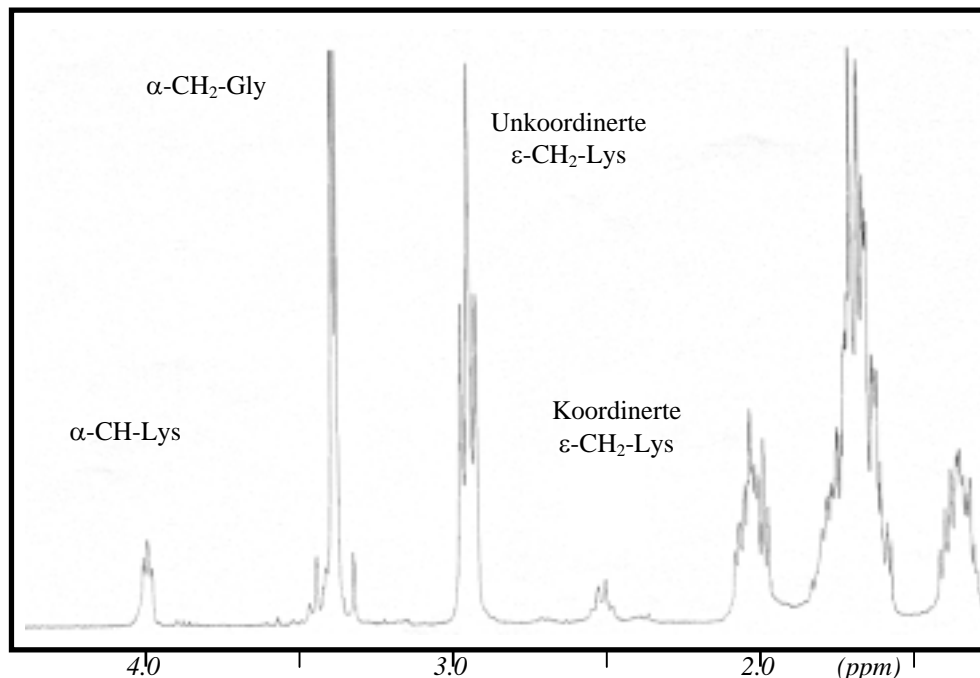


Abb. 17 : ¹H-NMR-Spektrum von Pd(GlyLys)Cl (**3**) in D₂O im Bereich 1.3 – 4.5 ppm bei pD 3.7, nach temporär inhomogener pH-Erhöhung der Reaktionslösung.

Signale des binären Komplexes weitgehend pD-unabhängig. Dies ist eine Konsequenz der Tatsache, daß die beiden funktionellen Gruppen durch die erfolgte Pd-Koordination nicht mehr protoniert werden können. Die chemischen Verschiebungen der ϵ -CH₂-Lys-Protonensignale erfahren im alkalischen Milieu durch die Deprotonierung der ϵ -Aminogruppe einen Hochfeldshift. So kann mittels ¹H-NMR-Spektroskopie auf die Entstehung des dreizähligen Chelatkomplexes im Sauren geschlossen werden, in welchem die Koordination über α -Amino-, Amid- und Carboxylatgruppe des Dipeptids erfolgt (Abb. 16) [58, 59, 127-129].

Im Gegensatz zu TyrLys wird im saurem Milieu die ϵ -Aminogruppe des Lysinrestes an das Palladiumelektrophil koordiniert : Durch eine temporär inhomogene pH-Erhöhung der Reaktionslösung entsteht eine **dimere Spezies (4)**. Bereits bei ca. pD = 3.7 erscheint bei 2.50 ppm ein neues Signal, welches durch die koordinierte ϵ -CH₂-Lys-Protonen hervorgerufen wird (Abb. 17, Abb. 18). Dieser Unterschied kann auf Abwesenheit des Phenolrings zurückgeführt werden, so daß die sterische Hinderung zur Koordination an das Palladiumzentrum abnimmt. Wenn der pH der Lösung während der Reaktion möglichst homogen gehalten wird, wird die dimere Spezies erst bei pD = 6.0 gebildet. Bei steigendem pD-Wert wird dieses Signal immer intensiver, während

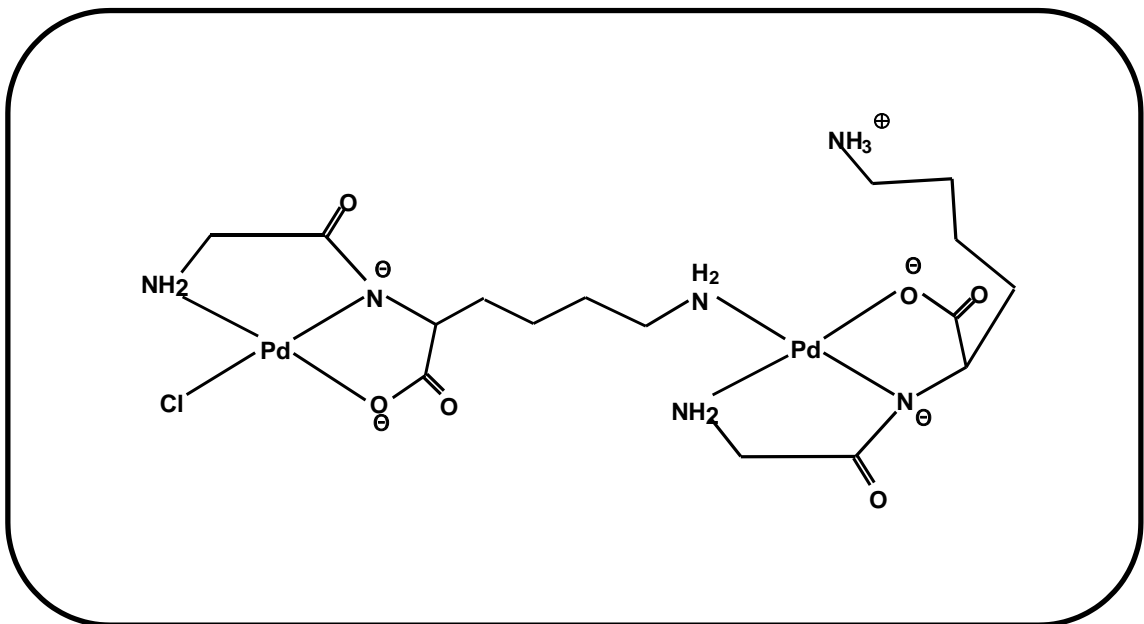


Abb. 18 : Strukturvorschlag für den Dimer des Pd(GlyLys)Cl (4)

das Signal bei 2.96 ppm abnimmt. Die Bildung einer solchen dimeren Spezies konnte am Beispiel von Cu(Gly-L-Lysin) durch Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen werden [122].

Die Kopplungskonstanten ${}^3J_{av}$ betragen 8.40 Hz für die Seitenkette des Lysinrestes bei pD = 4.9. **Die berechnete Konformation der Seitenkette** weist demnach einen Rotamer h-Anteil von 67.2 % auf. Die Seitenkette des Lysinrestes liegt überwiegend oberhalb der Metall-Koordinationsebene. Im Vergleich zum freien Liganden steigt damit der h-Anteil für den Lysinrest um 46.0 % (21.2 % Rotamer h-Anteil für freien Liganden), was auf die nachgewiesenen schwachen Wechselwirkungen zwischen der aliphatischen Seitenkette des koordinierten Dipeptids und dem Metallion zurückzuführen ist.

2.3 Darstellung und Charakterisierung von Pd(LysGly)Cl (5)

Das Dipeptid LysGly zeigt ein dem Dipeptid GlyLys vergleichbares Reaktionsverhalten. Das Reaktionsprodukt mit Pd(II) ist durch ein neues Triplet der α -CH₂-Lys-Protonen im **${}^1\text{H-NMR-Spektrum}$** (Abb. 19) gekennzeichnet, welches gegenüber dem Signal des Eduktes bei pD = 5.9 um 0.46 ppm zu tieferem Feld verschoben ist. Dieser X-Teil des ABX-Spinsystems zeigt eine Kopplungskonstante von ${}^3J_{av} = 11.02$ Hz, und die chemische Verschiebung des Proton liegt bei $\delta = 3.56$ ppm. Ebenso entsteht für das α -CH₂-Gly ein neues Signal bei 3.91 ppm, welches relativ zu freien Liganden um 0.11 ppm tieffeldverschoben erscheint. Die Tieffeldverschiebung des α -CH₂-Gly-Proton läßt auf eine Pd(II)-Koordination an die deprotonierte Carboxylatgruppe schließen, da die Elektronendichte am α -CH₂-Gly-Proton verringert wird. Beide Protonen spalten durch geminale Kopplung in Dublett von Dubletts auf. Dieses AB-Spinsystem zeigt eine Kopplungskonstante von ${}^2J_{AB} = -19.10$ Hz, und die chemisch nicht äquivalenten Protonen liegen bei $\delta = 3.88$ und 3.95 ppm. Wie aus der Verschiebung der Signale erkennbar ist, sind sowohl das α -Amino- als auch die Carboxylatgruppe an das Palladiumzentrum koordiniert. Die Seitenkette des N-Terminus ist beweglicher als die des C-Terminus [134], so daß sich im Gegensatz zu GlyLys keine Aufspaltung des β -CH₂-Lys-Protonensignals ergibt. Diese Beobachtung steht mit dem unten berechneten Rotamerenverhältnis in Einklang. Im sauren Milieu ist eine Beteiligung der ϵ -Aminogruppe an der Pd(II)-Koordination nicht zu beobachten.

Um dieses Bindungsmuster zu untermauern, werden **pD-abhängige ${}^1\text{H-Untersuchungen}$** durchgeführt. Im Gegensatz zu freien Liganden ist für den über die α -Amino- und die Carboxylatgruppe koordinierten Komplex kein Sprungbereich zu detektieren. Die chemischen Verschiebungen der Protonen von α -CH₂-Gly- und α -CH-

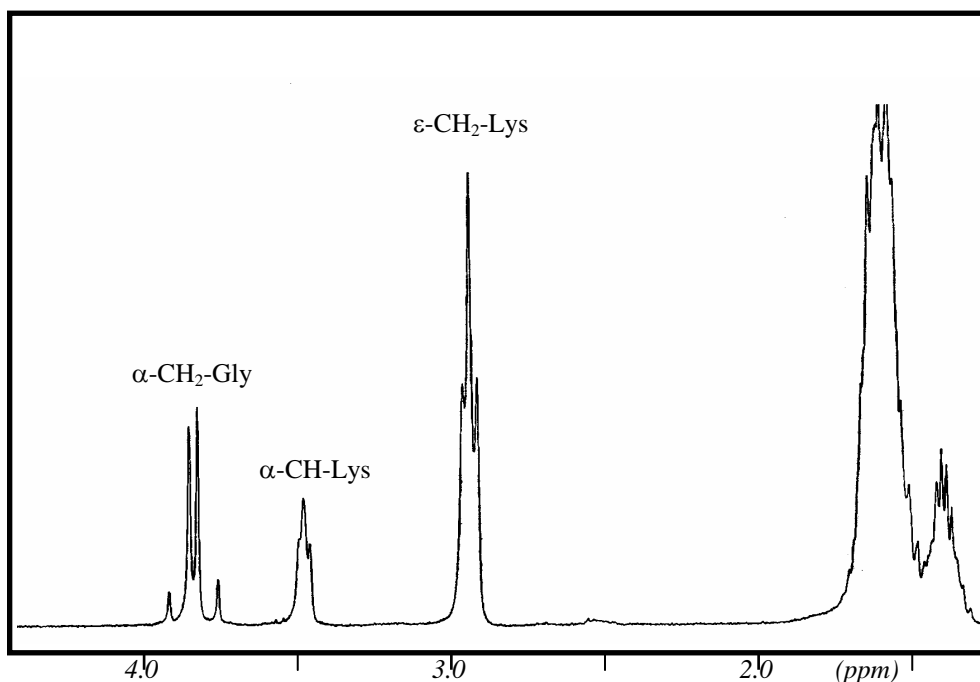


Abb. 19 : Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums von $\text{Pd}(\text{LysGly})\text{Cl}$ (**5**) in D_2O bei pD 5.0

tiefem Feld verschoben, was auf eine Protonierung der ϵ -Aminogruppe zurückgeführt werden kann. In dieser Weise kann mittels ^1H -NMR-Spektroskopie auf die Entstehung des dreizähligen Chelatkomplexes im Sauren geschlossen werden, in welchem die Koordination über α -Amino-, Amid- und Carboxylatgruppe des Dipeptid erfolgt (Abb. 20) [58, 59, 127-129].

Wie bei GlyLys wird bereits im saurem Milieu die ϵ -Aminogruppe des Lysinrestes an das Palladiumelektrophil koordiniert, vermutlich infolge einer temporär inhomogenen pH-Erhöhung der Reaktionslösung. Dabei wird die **Dimer-Spezies (6)** gebildet. Wenn der pH der Lösung während der Reaktion möglichst homogen gehalten wird, bildet sich die Dimer-Spezies erst bei pD = 6.0.

Die Kopplungskonstanten $^3J_{\text{av}}$ betragen bei pD = 5.9 11.02 Hz für die Seitenkette des Lysinrestes. **Die berechnete Konformation der Seitenkette** weist demnach einen Rotamer h-Anteil von 42.3 % auf. Die Seitenkette des Lysinrestes liegt überwiegend oberhalb der Koordinationsebene des Chelatkomplexes. Im Vergleich zum freien Liganden steigt damit der h-Anteil für den Lysinrest um 20.0 % (22.3 % Rotamer h-Anteil beim freien Liganden), was wiederum auf die nachgewiesenen schwachen Wechselwirkungen zwischen aliphatischer Seitenkette des koordinierten Dipeptids und

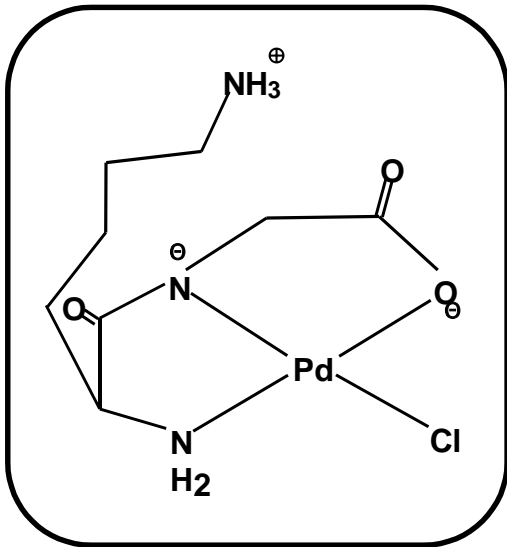


Abb. 20 : Strukturvorschlag für Pd(LysGly)Cl (5)

Metallion zurückzuführen sein dürfte. Wie bereits erwähnt ist die Seitenkette am tetraedrigen Aminostickstoff flexibler als die am trigonalen Amidstickstoff [106]. Aus diesem Grund nimmt generell die Seitenkette des C-Terminus mehr h-Konformation als die des N-Terminus ein. Das ist die Erklärung für den großen Unterschied (19.9 %) von h-Anteil zwischen LysGly und GlyLys. Ein ähnlicher Unterschied wurde auch zwischen Pd(Gly-L-Phe) und Pd(L-Phe-Gly) nachgewiesen.

3. Ternäre Komplexe : Umsetzungen von Desoxyribonucleotiden mit monofunktionellen Palladium(II)-Dipeptid-Komplexen

Nucleinsäuren und ihre Reaktivität gegenüber Metallen

Nicht nur Proteine als biochemische Funktionsträger, sondern auch Oligo- und Polynucleotide eignen sich als Liganden für Metallionen. Nucleinsäuren, besonders die Desoxyribonucleinsäure (DNA), sind als Träger der genetischen Information und Schlüsselsubstanz der Proteinbiosynthese von grundsätzlicher Bedeutung [19-21, 135-

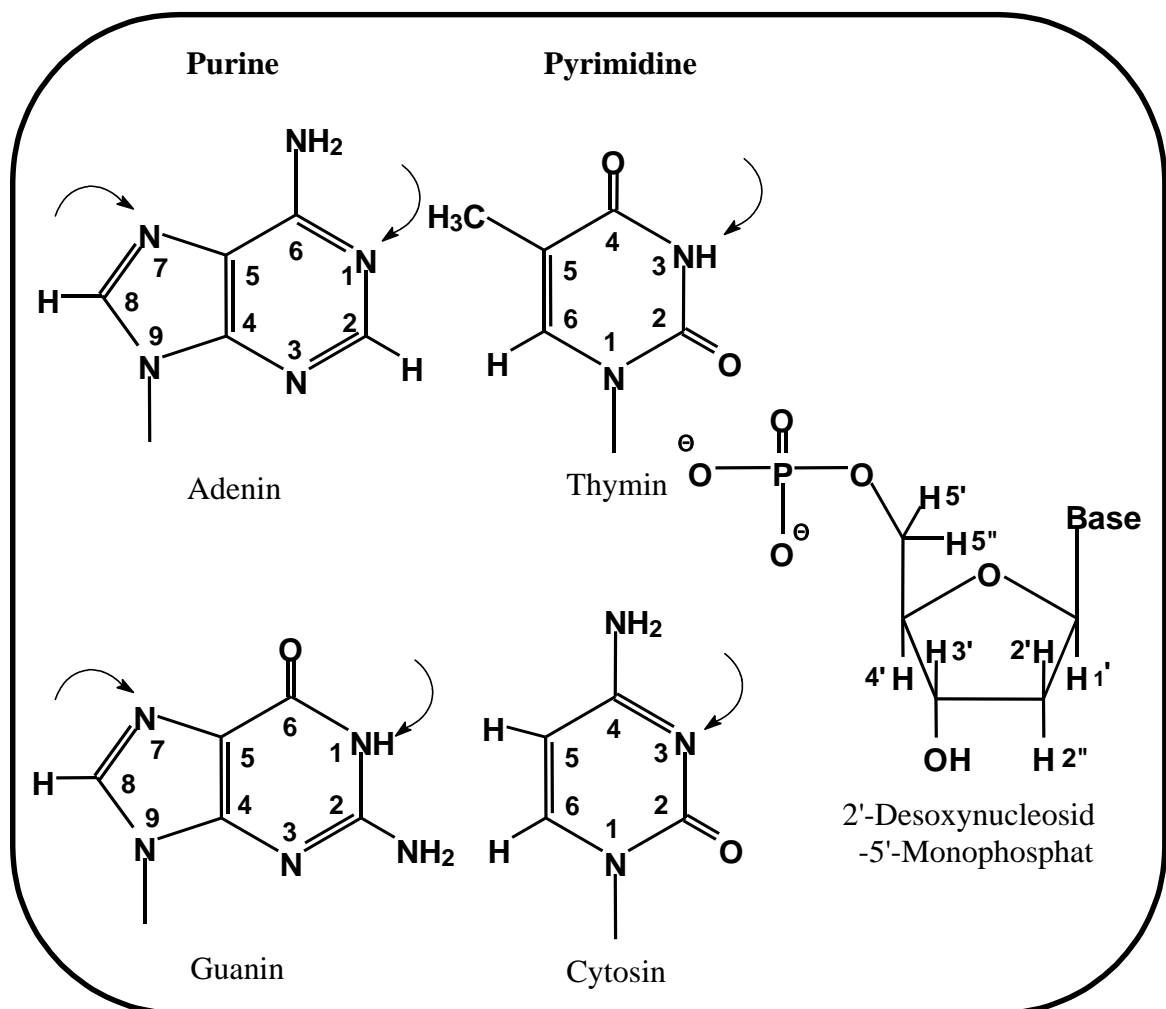


Abb. 21 : Purin- und Pyrimidin-Nucleobasen der DNA sowie 2'-Desoxynucleosid-5'-Monophosphat. Bevorzugte Koordinationsstellen für Pd(II) sind durch Pfeile markiert.

137]. Dieses Makromolekül ist ein Polymer aus Nucleotiden. Jedes Nucleotid enthält wiederum einen Zucker, die Deoxyribose, eine Phosphatgruppe und je eine der vier Base: Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) oder Cytosin (C). Der Phosphatrest der Desoxynucleotide verknüpft als Phosphodiester jeweils die 5'-Hydroxylgruppe eines Zuckers mit der 3' Hydroxylgruppe des benachbarten Nucleotids. Die Verknüpfung der Basen mit dem Zuckerphosphatrückgrat erfolgt jeweils über die N9-(Purine) bzw. die N1-Position (Pyrimidine) [2,137].

Nucleobasen verfügen als ambidente Liganden über mehrere Stellen für eine Metallkoordination [1, 2]. Die Metallbindungsstellen der Nucleobasen sind in erster Linie die endocyclischen Stickstoffatome. Wegen der weitgehenden Delokalisierung ihrer einsamen Elektronenpaare über den Ring sind die exocyclischen Aminogruppen des Guanins, Adenins und Cytosins nicht zur Koordination von Metallen geeignet. Erst nach Deprotonierung dieser Aminogruppe ist eine Reaktion mit Metallen möglich. Wie experimentelle und theoretische Studien zeigten [138-141], weisen die N7-Atome der Purine, besonders Guanin, unter den Heteroatomen der Nucleobasen die höchste Nucleophilie auf und sind daher auch die bevorzugten Stellen für die Bindung von Übergangsmetallionen. Daneben beobachtet man Konkurrenzreaktionen mit der N3-Position des Cytosins und den N7/N1-Positionen von Adenin.

Metallbindung an eine Nucleobase beeinflusst in der Regel die Elektronendichte des Ringsystems und damit auch weitere reaktive Zentren. Bei Metallkationen mit Induktiv-Effekt kann die Basizität oder Nucleophilie von Ringatomen X erniedrigt, bzw. die Acidität von XH-Gruppen erhöht werden (X= N bzw. O) [142]. Ein entscheidendes Kriterium für Ausbildung von Wasserstoffbrücken bei Basenpaarungen ist ihr Säure-Base-Verhalten. Sowohl diese induktiven Effekte als auch sterische Effekte von Metallionen führen zu einer Beeinträchtigung der Wasserstoffbrückenbindungen der

Tab. 3 : Wichtige pK_a -Werte der Desoxyribonucleotide.

Nucleotid	pK_a			Phosphat pK_1	Phosphat pK_2
	N7	N1	N3		
5'dGMP	2.90	9.60	-	0.70	6.30
5'dAMP	< 0	3.74	-	0.90	6.50
5'dCMP	-	-	4.50	0.80	6.30
5'dTMP	-	-	10.00	1.60	6.50

Basen, die letztlich eine Stabilisierung oder Destabilisierung der Duplex und eine erhöhte Mutationshäufigkeit nach sich ziehen kann [143]. Die Kenntnis der Protonierungsgleichgewichte ist deshalb von großer Wichtigkeit, und typische pK_a -Werte der Nucleobasen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt [142].

Neben den Stickstoffatomen stellen die negativ geladenen Sauerstoffatome der Phosphatgruppen sowie exocyclische Carbonylfunktionen der Basen Metallbindungszentren dar, insbesondere für harte Metalle wie Alkali- und Erdalkalimetalle (Na^+ , K^+ , Mg^{2+}). Na^+ und Mg^{2+} stabilisieren DNA vielfach unspezifisch über elektrostatische Wechselwirkungen, indem sie die negativ geladenen Phosphatgruppen gegeneinander abschirmen [135-137]. Kürzlich hat man spezifischere Kontakte zwischen Metallionen und Nucleinsäuren entdeckt. So dient Mg^{2+} als Cofaktor zur Aktivierung katalytisch wirksamer RNA-Moleküle, und K^+ -Ionen stabilisieren die Struktur der Telomeren, welche die DNA-Doppelhelix an den Enden der Chromosomen abschließen [144, 145].

Umsetzungen mit monofunktionellen Palladium(II)-Dipeptid-Komplexen

Seit der Entdeckung der Antitumoraktivität von Cisplatin [3], $cis-(NH_3)PtCl_2$, versuchen zahlreiche Studien, die Wirkungsweise dieser Verbindung auf zellulärer Ebene aufzuklären [37, 41, 146]. Nucleinsäuren sind die biologischen Zielmoleküle für Cisplatin. Kationische Formen des Cisplatins wechselwirken mit der DNA unter Bildung von $d(GpG)$ - und $d(ApG)$ -Querverknüpfungen innerhalb eines Stranges und machen zusammen 90 % aller Addukte aus [147]. Weiterhin können DNA-Pt-Protein-cross-links beobachtet werden [37, 148]. Allgemein scheinen letztere Wechselwirkungen sowohl für die Toxizität des Cisplatins als auch des $trans-Pt(NH_3)_2Cl_2$ verantwortlich zu sein.

Bei der Untersuchung des Wirkungsmechanismus von Cisplatin [3] wird Pd(II) aufgrund der höheren Reaktionsgeschwindigkeit [149] anstelle der analogen Pt-Verbindung eingesetzt. Pd(II)-Komplexe können zum Verständnis für chemische Gleichgewichte von Pt(II)-Reaktionen beitragen. Pd(II)-Komplexe reagieren $10^4 - 10^5$ -mal schneller als Pt(II)-Analoge, während die Gleichgewichtskonstanten nur ca. 10-mal größer als die des Pt(II) sind. Beide Metallionen bevorzugen quadratisch-planare Geometrien und haben ähnliche Ionenradien. Dipeptide bilden stabile Komplexe mit Palladium(II) schon im stark Sauren. Palladium-Dipeptid-Komplexe eignen sich prinzipiell als Modelle für die monofunktionelle Bindung von Pt an eine Nucleobase.

Die Verwendung von Nucleinsäuremodellen vereinfacht Untersuchungen zum bevorzugten Angriff von Metallen auf Nucleobasen. Als Modellverbindungen werden

Nucleinsäurefragmente eingesetzt, d.h. Nucleobasen, Nucleoside, Nucleotide und Oligonucleotide [51-54, 138-140, 150-159]. Um den Einfluß der Phosphatgruppen auf die Metallkoordination an Nucleobasen zu analysieren, werden Nucleotide und Oligonucleotide eingesetzt [152-154]. Die Reaktionen von mit Ribonucleotiden Übergangsmetallen sind in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben: über die Umsetzungen mit Desoxyribonucleotiden liegen hingegen nur wenige Untersuchungen vor. In den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen werden Desoxyribonucleotide mit monofunktionellen Palladium(II)-Dipeptid-Komplexen umgesetzt, wobei man formal ein Modell für ternären DNA-Metall-Protein-Komplexe, sogenannte „DNA-Metall-Protein *cross-links*“ erhält. Das systematische Studium dieser Komplexe liefert einen wichtigen Beitrag zur Frage, welche Rolle Metallionen bei der DNA-Protein-Assoziation spielen [25-50]. Bei der Umsetzung mit diesen binären Komplexen wird zudem gewährleistet, daß der Ausgangskomplex nur noch einen ersetzbaren Liganden aufweist. Der Chloroligand in diesem Komplex kann leicht durch andere Donoratome, insbesondere Stickstoffatome von Nucleobasen, ersetzt werden. Die durch die Bindung von Metallen induzierten Änderungen der Tertiärstrukturen in ternären DNA-Metall-Protein-Komplexen können Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Makromolekülen erleichtern. Daher sind solche Modellkomplexe in Hinblick auf die zu erwartenden hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der Dipeptide und der Nucleotide von Interesse.

Alle Reaktionen von Palladium(II)-Dipeptid-Komplexen mit äquimolaren Desoxyribonucleotiden werden im NMR-Maßstab durchgeführt. Unter stark sauren Bedingungen sind die binären Komplex instabil, während im Neutralen und Alkalischen die dimere Spezies infolge der Koordination der ϵ -Aminogruppe des Lysinrests gebildet wird. Aus diesen Gründen hat es sich bewährt, die Reaktion bei schwach saurem pD-Wert (ca. pD 5.5) durchzuführen. Mit Hilfe von NMR-Techniken sollen die Strukturen der Verbindungen und insbesondere ihr Verhalten in Lösung untersucht werden. Die Zuordnung und Aufklärung der Spinsysteme sowie Aussagen über die Konformation des Moleküls können nur über 2D-NMR-Spektren erfolgen. Daneben soll auch geklärt werden, inwiefern intramolekulare Wechselwirkungen von Dipeptiden mit Nucleotiden aufgewiesen werden und ob und wie diese möglicherweise zur Erkennung der DNA-Stränge und zur Stabilisierung der resultierenden Strukturen beitragen können.

3.1. Umsetzungen mit 5'dGMP

3.1.1. Charakterisierung von Pd(L-Tyr-L-Lys)(5'dGMP) (7)

3.1.1.1. ¹H-NMR-Untersuchungen

Untersuchungen mit 9-Ethylguanin (9-EtG) und 9-Methylguanin (9-MeG) zeigen, daß Koordination sowohl über N7 oder N1 als auch über N1/N7 oder N1/N3/N7 stattfinden kann [138-140, 150]. Von Interesse ist nun, ob diese Koordinationsmuster auch auf Umsetzungen mit dem Mononucleotid 5'dGMP übertragbar sind. Im Gegensatz zu den Modellnucleobasen weisen Nucleotide neben den N1-, N3- und N7-Positionen noch eine weitere mögliche Koordinationsstelle, die Phosphatgruppe, auf.

Erwartungsgemäß ist das Nucleotid im schwach sauren pH-Bereich und bei einer 1:1-Stöchiometrie N7-koordiniert [156]; so kann mittels ¹H-NMR-Spektroskopie auf die Entstehung von Pd(TyrLys)(5'dGMP-N7) (7) geschlossen werden. Bei einer N7-Koordination wird im allgemeinen ein Tieffeldshift des H8-Signals aufgrund der elektronenziehenden Wirkung des Metalls auf das aromatische System beobachtet. Im ¹H-NMR-Spektrum des ternären Komplexes spiegelt sich die Palladiumkoordination über N7 des 5'dGMP in einem Tieffeldshift von 0.07 ppm wider ($\delta = 8.20$ bei pD 5.1) [138-140, 150]. Für Palladiumverbindungen ist die N7-Position der bevorzugte Koordinationsort [138(c)]. Sie besitzt einen pK_a von 2.9 und liegt im schwach Sauren deprotoniert vor. In 5'-Nucleotiden wird eine N7-Koordination weiterhin durch die Möglichkeit einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen anderen Liganden des Metalls und nicht-koordinierten 5'Phosphat-Gruppe begünstigt, wie sie z.B. in Kristallen von enPd(5'GMPH)₂ [156(a)] und von cis-(NH₃)₂Pt (d(pGpG)) [159(a)] und auch in wäßrigen Lösungen analoger Komplexe [159(b)-(d)] gefunden wurden. Eine N1-Koordination findet erst im Basischen statt, da sie zuvor deprotoniert werden muß. Die N3-Position ist sowohl aufgrund geringer Basizität als auch sterisch benachteiligt.

Wie schon bei anderen ternären Pd(GlyTyr)-Guanin-Komplexen ist auffällig [160], daß das H8-Signal des 5'dGMP von Pd(TyrLys)(5'dGMP-N7) im Vergleich zu anderen Pd-Komplexen z. B. Pd(GlyLys)(5'dGMP-N7) und Pd(LysGly)(5'dGMP-N7) ungewöhnlich stark hochfeldverschoben ist. Aus den in Kap. III 3.1.2 und III 3.1.3 beschriebenen ternären Komplexen ergibt sich im Vergleich zu freiem 5'dGMP eine Tieffeldverschiebung der H8-Resonanz von 0.26 ppm für Pd(GlyLys)(5'dGMP-N7) und

0.28 ppm für Pd(LysGly)(5'dGMP-N7). Die elektronenziehende Wirkung des Metalls bei der N7-Koordination in Pd(TyrLys)(5'dGMP) wird hier vermutlich durch den Ringstromeffekt der aromatischen Seitenkette des Tyrosinrestes kompensiert. Von Martin et. al. konnte bereits gezeigt werden, daß in ternären Komplexen mit Guaninderivaten [160] der Tyrosylring über der Koordinationsebene angeordnet ist (vgl. Kap II 3.1.1.4). Hierdurch wirkt der Ringstromeffekt des Aromaten auf das H8-Proton, so daß das H8-Signal im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum im Vergleich zu anderen Pd-Komplexen hochfeldverschoben wird.

Die Verschiebung der H8-Resonanz des koordinierten Liganden läßt weiterhin eine pD-Abhängigkeit erkennen [150, 153, 156]. Die Phosphatdeprotonierung des 5'dGMP-Liganden führt zu einer Tieffeldverschiebung des entsprechenden H8-Signals bei pD 6. Ein Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des Ternärkomplexes bei pD 3.5 und pD 7.8 läßt eine Tieffeldverschiebung um $\Delta\delta = 0.17$ ppm der H8-Resonanz erkennen. Um pD 8.9 erfolgt die N1-Deprotonierung des N7-Komplexes, die einen Tieffeldshift des zugehörigen H8-Signals induziert.

Mit steigendem pD-Wert können auch verbrückte Produkte als Folgeprodukte gebildet werden [138-140, 150, 153, 156]. Um pD 5.9 erscheinen im H8-Bereich des 5'dGMP zwei neue Resonanzen bei $\delta = 8.08$ und 8.05 ppm (Abb. 22). Eine Bestätigung der Signalzuordnung liefert eine pH-Titration. Beide Signale erfahren parallel zueinander einen geringen Tieffeldshift um pD 6 im Zuge der Deprotonierung der Phosphatgruppe. Nur eines der beiden H8-Signale verändert seine Lage im basischen pD-Bereich erwartungsgemäß nicht. Da im Bereich des pK_a -Wertes der N1-Position kein Tieffeldshift und somit keine Protonierung an dieser Position zu beobachten ist, ist dieses Signal dem N7/N1-koordinierten Komplex (**8**) zuzuordnen. Nur der Guaninrest

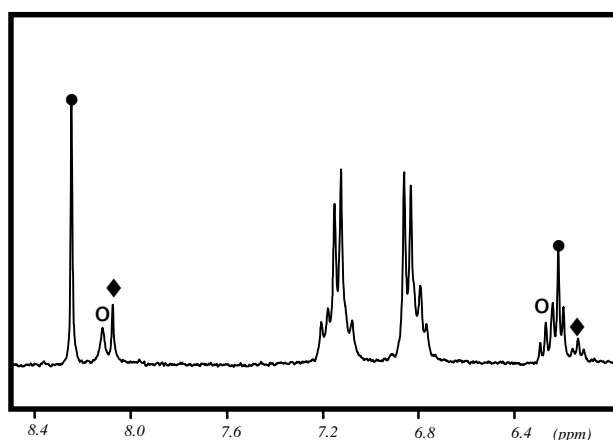


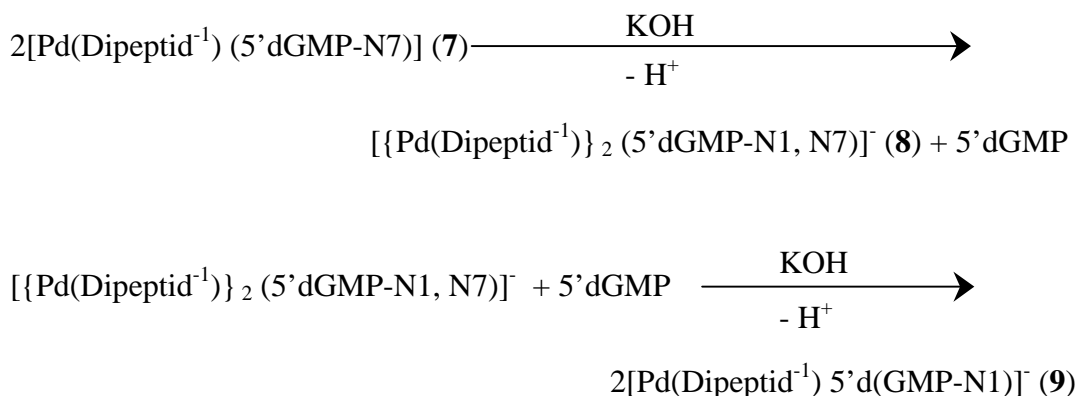
Abb. 22 : $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Pd(TyrLys)(5'dGMP-N7) in D_2O bei einem pD-Wert von 6.8 und einer Pufferlösung aus 100mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 [● Pd(TyrLys)(5'dGMP-N7) **7**, ○ {Pd(TyrLys)}₂(5'dGMP-N1/N7) **8**, ◆ 5'dGMP]

mit gleichzeitig koordinierter N7/N1-Position kann nicht mehr deprotoniert werden. In der N1-Region des 5'dGMP sind im Gegensatz zur N7-Umgebung räumlich anspruchsvollere Gruppen vorhanden (exozyklische Amino- und Carbonylgruppe), so daß bei N1-Koordination eine gehinderte Rotation zu erwarten ist. Das Signal des N1,N7-verbrückten Komplexes ist in der Tat aufgrund gehinderter Rotation sowohl um die Pd-N1-als auch um die Pd-N7-Bindung stark verbreitert. Das zweite Signal (8.05 ppm) ist dem H8-Proton des freien Liganden zuzuordnen, der bei der Verbrückung zwangsläufig entstehen muß, wenn man von dem ternären Komplex ausgeht. Diese Zuordnung wird auch durch deren vergleichbare Signalflächen gestützt. Der Anteil an einzähnigen bzw. verbrückten Komplexen ist abhängig von pH-Wert und Stöchiometrie [150]. Mit steigenden pD-Werten wächst in einer Lösung von Pd(TyrLys)(5'dGMP-N7) der Anteil an {Pd(TyrLys)}₄(5'dGMP-N7/N1). Bei einem Ansatz mit dem stöchiometrischen Verhältnis Pd : 5'dGMP = 1:1 werden die Verbindungen N7, N1/N7, 5'dGMP im Verhältnis 1 : 0.15 : 0.15 bei pD 6.8 und 1 : 0.3 : 0.3 bei pD 7.3 erhalten.

Aus dem verbrückten Komplex bildet sich auf Grund der thermodynamischen Stabilität um pD 6 langsam der N1-koordinierte Komplex (9), dessen H8-Signale im Vergleich zum Signal des N1/N7-Komplexes hochfeldverschoben auftreten (7.94 ppm bei pD 6.4). Im Gegensatz zu anderen ternären Dipeptid-Komplexen ist die Reaktionsgeschwindigkeit und Gleichgewichtskonstante der Isomerisierung zum N1-koordiniertem Komplex herabgesetzt. Als Grund dafür kommen sterische Hinderungen der Reaktion durch exozyklische Amino- und Carbonylgruppe am Guaninring und der Seitenkette des Dipeptids in Frage.

Diese Ergebnisse der Reaktionen von Pd(TyrLys)Cl mit dem Mononucleotid 5'dGMP stehen im Einklang mit den Studien über das Koordinationsverhalten von Pd(dien)Cl mit 5'GMP, und Pd(GlyMet)Cl und Pd(GlyHis)Cl mit 9-Ethylguanin [156(b), 150(a)-(b)]. Es wird vorgeschlagen, daß die Isomerisierung nach einem ähnlichem Schema erfolgt, wie sie nachfolgend beschrieben ist. Die Überführung einer N7-koordinierten Verbindung in ein N1-Isomer verläuft offensichtlich über eine N1, N7-verbrückte Spezies des 5'dGMP. Dabei wird zunächst der N7-Stickstoff des 5'dGMP an das Palladiumzentrum koordiniert. Infolge dieser Pd-Koordination wird der pK_a-Wert der N1-Position auf ≈ 8 gesenkt [141]. Da also eine Deprotonierung des N1-Protons erleichtert ist, liegt der N7-koordinierte Guaninrest bei physiologischem pH zu ca. 10 bis 15 % deprotoniert vor, was die N1-Position für eine Metallkoordination zugänglich macht. Der N1,N7-verbrückte Komplex bildet sich demnach bei physiologischen pH-Bedingungen. Die N7-Bindung wird aufgrund der stärkeren Pd-

Koordination an die N1-Position geschwächt. Zuletzt bildet sich unter Abspaltung einer Pd-Einheit von der N7-Position die N1-koordinierte Spezies [138(a)].



Schema 1

3.1.1.2. Zuordnung der Protonenresonanzen anhand zweidimensionaler NMR-Spektroskopie

Nachdem die Resonanzen der aromatischen- und H1'-Protonen identifiziert sind, erfolgt die Zuordnung der übrigen Protonresonanzen mit Hilfe von DQF-COSY- und TOCSY-Spektren (Abb. 23).

Die aliphatischen Protonenresonanzen des Dipeptids verschieben sich nach der Koordinierung von 5'dGMP im Vergleich zur Ausgangsverbindung nur wenig zum Tieffeld. Hingegen wird für die aliphatischen Zuckerresonanzen eine leichte Hochfeldverschiebung beobachtet, die möglicherweise auf den Einfluß des abschirmenden Ringstromeffekts des Phenylrings des Tyrosinrestes zurückzuführen ist [84, 88, 160]. Im 1D-¹H-NMR-Spektrum ist die H3'-Resonanz mit dem HDO-Signal überlagert, kann aber mit Hilfe eines 2D-Spektrums leicht zugeordnet werden. Die H5'- und H5''-Resonanzen sind degeneriert. Dies kann durch die freie Rotation der C4-C5-Bindung erklärt werden. Die auffälligste Kopplung im TOCSY-Spektrum ist die Kopplung des α-CH-Tyr zum Lysinrest des Dipeptidliganden.

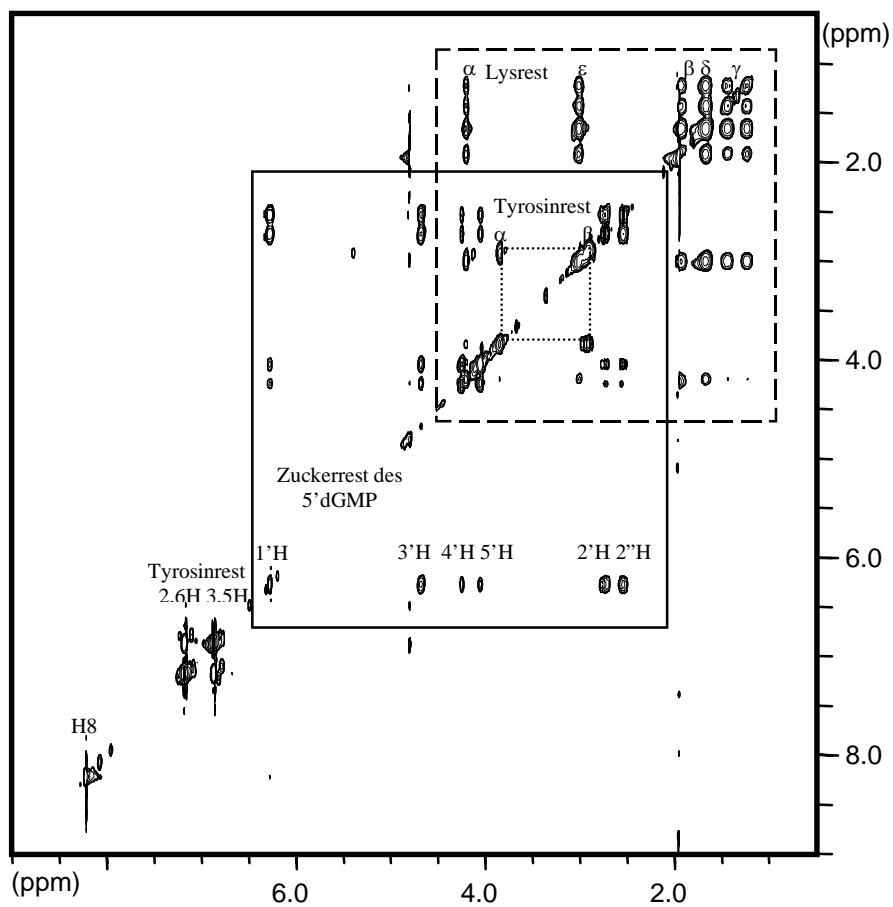


Abb. 23 : 2D- ^1H -TOCSY-Spektrum von $\text{Pd}(\text{TyrLys})(5'\text{dGMP-N7})$ (**7**) in D_2O bei pD 5.1 und einer Pufferlösung aus 100mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 . (Mischzeit ist 100 msec)

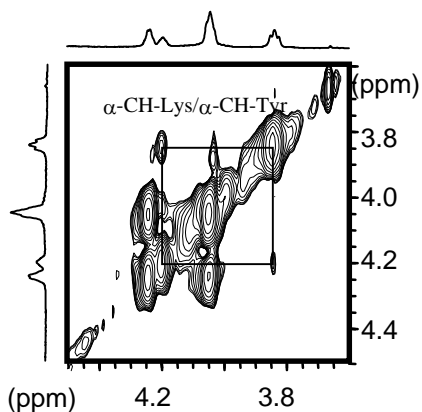


Abb. 24 : Ausschnitt des TOCSY-Spektrum von $\text{Pd}(\text{TyrLys})(5'\text{dGMP-N7})$ (**7**) in D_2O bei pD 5.1 und einer Pufferlösung aus 100mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 . Die Kopplungen zwischen den Protonen des $\alpha\text{-CH-Lys}$ und $\alpha\text{-CH-Tyr}$ sind mit durchgezogenen Linien gekennzeichnet.

Diese Kopplung ist ein entscheidender Hinweis dafür, daß der Dipeptidligand bei Reaktion des binären Komplexes mit 5'dGMP zumindest am Palladiumzentrum koordiniert ist. Abb. 24 zeigt einen Ausschnitt des TOCSY-Spektrums, worin die Kopplung zwischen den Protonen des α -CH-Tyr und α -CH-Lys mit durchgezogenen Linien gekennzeichnet ist.

Zwischen benachbarten Protonen kann durch den Raum ein Magnetisierungstransfer

erfolgen. Die Stärke dieser dipolaren Kopplung (NOE) ist abhängig vom Abstand zwischen den Protonen, von der Beweglichkeit des Makromoleküls in der Lösung und von der Mischzeit, innerhalb derer die Kerne miteinander wechselwirken können (Kap. I 1) [83-87]. In einem NOESY-Spektrum von (7) werden keine Crosspeaks zwischen den geminalen Protonen, etwa zwischen H2' und H2''-Protonen des Zuckerrestes, beobachtet (Die Ursache hierfür ist in Kap. I 1 beschrieben). Für alle Verbindungen, die in dieser Arbeit dargestellt werden, wird aus diesem Grunde ein ROESY-Experiment durchgeführt, bei dem die Gefahr der Auslöschung von Crosspeaks nicht besteht. Bei der Zuordnung der Protonenresonanzen unterscheidet sich das H2'- vom H2''-Proton in den Intensitäten des ROE-Crosspeaks zu H1' und H3'. In allen Zuckerkonformationen ist aufgrund ihrer räumlichen Nähe der Crosspeak des H1' zu H2'' deutlich stärker als der zu H2'. Da sich H1'- und H2''-Proton auf der gleichen Seite der Zuckerebene befinden, sind diese Protonenabstände kürzer als die zwischen H1'- und H2'-Proton. Das Gegenteil gilt für H3'. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien werden die chemische Verschiebungen des H2'- und H2''-Protons eindeutig

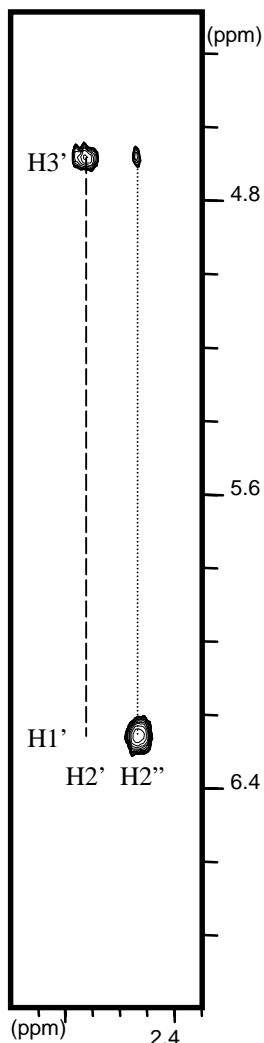


Abb. 25 : Ausschnitt des ^1H -ROESY-Spektrums von $\text{Pd}(\text{TyrLys})(5'\text{dGMP-N7})$ (7) in D_2O bei pD 5.4, 268 K und einer Pufferlösung aus 100mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 im Bereich der H2'/H2'' und H1'/H3'-Protonen.

Tab. 4 : Chemische Verschiebungen (ppm) der Produkt Pd(TyrLys)(5'dGMP-N7) (**7**) bei pD 5.1 in D₂O. In Klammern sind die Multiplizität der Protonenresonanzen und die Wechselwirkungsshifts infolge der Koordination von Palladium an N7 bei gleichbleibendem pH-Wert angegeben.

Zuordnung	δ	Zuordnung	δ
H8	8.20(s; 0.07)	β -CH ₂ -Tyr	2.87(qd; 0.05)
H1'	6.27(t; -0.05)	2, 6H-Tyr	7.18(d; -0.02)
H2'	2.70(dd; -0.08)	3, 5H-Tyr	6.87(d; -0.04)
H2''	2.53(dd; -0.01)	α -CH-Lys	4.20(t; 0.07)
H3'	4.68(t; -)	β -CH ₂ -Lys	1.77(md; 0.00)
H4'	4.23(t; -0.02)	γ -CH ₂ -Lys	1.33(md; 0.02)
H5'/H5''	4.05(m; 0.00)	δ -CH ₂ -Lys	1.66(m; 0.01)
α -CH-Tyr	3.85(t; 0.08)	ϵ -CH ₂ -Lys	3.00(t; 0.01)

zugeordnet, selbst wenn beide Resonanzfrequenzen im Gegensatz zu üblichen Literaturangaben von der Lage her vertauscht sind. Im Allgemeinen erscheinen die H2'-Protonen hochfeldverschoben zu H2'' [138-140, 159]. Bei pD 5.4 erkennt man aber im ROESY-Spektrum von (**7**) die intensiven Crosspeaks von H3' zu H2' und von H1' zu H2'', die deutlich intensiver sind als die zu anderen geminalen Protonen (Abb. 25). Beide Beobachtungen beweisen, daß das H2''-Proton des 5'dGMP hochfeldverschoben zu H2' auftritt. Diese Umkehrung der Resonanzfrequenzen kann oft für einzel- oder endständige Purinbasen beobachtet werden [161].

Mit Hilfe unterschiedlicher 2D-¹H-NMR-Techniken und unter Berücksichtigung dieser Spektren ist es jedoch möglich, alle Protonen in (**7**) zu identifizieren. In Tab. 4 sind die ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen von (**7**) sowie die Multiplizitäten der Protonenresonanzen und die Wechselwirkungsshifts infolge der Koordination von Palladium an N7 bei konstantem pD-Wert angegeben. Mit zunehmenden pD-Werten können auch der N1/N7-verbrückte Komplex (**8**) sowie freies 5'dGMP als Folgeprodukte gebildet werden [138, 156]. Im nicht-aromatischen Teil des ¹H-NMR-Spektrums zeigen sich aber gegenüber dem Aromatischen keine Aufspaltungen der Protonensignale (Abb. 26).

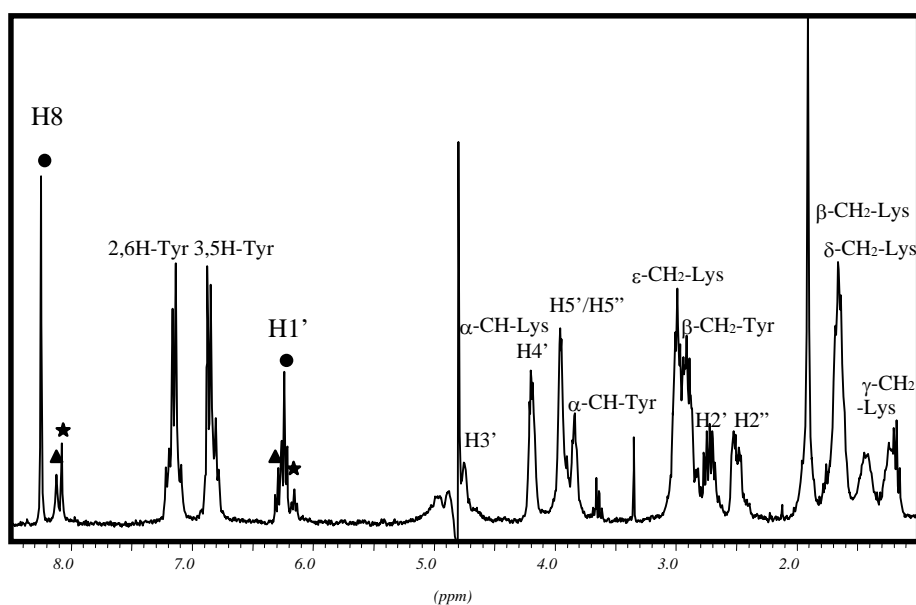


Abb. 26 : ^1H -NMR-Spektrum von $\text{Pd}(\text{TyrLys})(5'\text{dGMP-N7})$ in D_2O bei einem pD-Wert von 6.8 und einer Pufferlösung aus 100mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 [● $\text{Pd}(\text{TyrLys})(5'\text{dGMP-N7})$ **7**, ▲ $\text{Pd}(\text{TyrLys})(5'\text{dGMP-N1/N7})$ **8**, ★ $5'\text{dGMP}$]

3.1.1.3. Konformationsanalyse des koordinierten $5'\text{dGMP}$ -Liganden.

Im Gegensatz zu den planaren Peptidbindungen der Proteine können die Phosphodiesterbindungen der Nucleinsäuren eine Vielzahl von Konformationen annehmen, die durch den im Abb. 27 dargestellten Satz von Torsionswinkeln definiert sind [2, 137]. Wegen des variablen Torsionswinkels innerhalb der Zuckerringe erhöht sich die Komplexität der Konformationen weiter. Es gibt zwei vorherrschende Grundstrukturen. Die eine tritt in der A-DNA oder der RNA auf; das $\text{C3}'$ -Kohlenstoffatom befindet sich hier auf derselben Seite der durch $\text{C4}'\text{—O—C1}'$ definierten Ebene wie der $\text{C5}'$ -Kohlenstoff, d. h. in *endo*-Stellung zu $\text{C5}'$ (N-Typ-Konformer). Bei der anderen Struktur, die in der B-DNA häufig vorkommt, befindet sich $\text{C2}'$ in *endo*-Stellung zu $\text{C5}'$ (S-Typ Konformer). Darüber hinaus können die Basen in Bezug auf die glycosidische Bindung *syn*- oder *anti*-Konformationen annehmen (Abb. 28). Diese scheinbar geringfügigen Änderungen in der Konformation des Zuckers können dramatische Auswirkungen auf die Tertiärstruktur und damit auf die metallbindenden Eigenschaften der Biopolymere haben [38-41, 147, 159].

Durch Metallkoordination kommt es zu deutlichen Konformationsänderungen, die mittels Röntgenstrukturanalyse und molekular-mechanistischer Untersuchungen sowie durch NMR-spektroskopischen Methoden ermittelt werden können. Aufgrund der

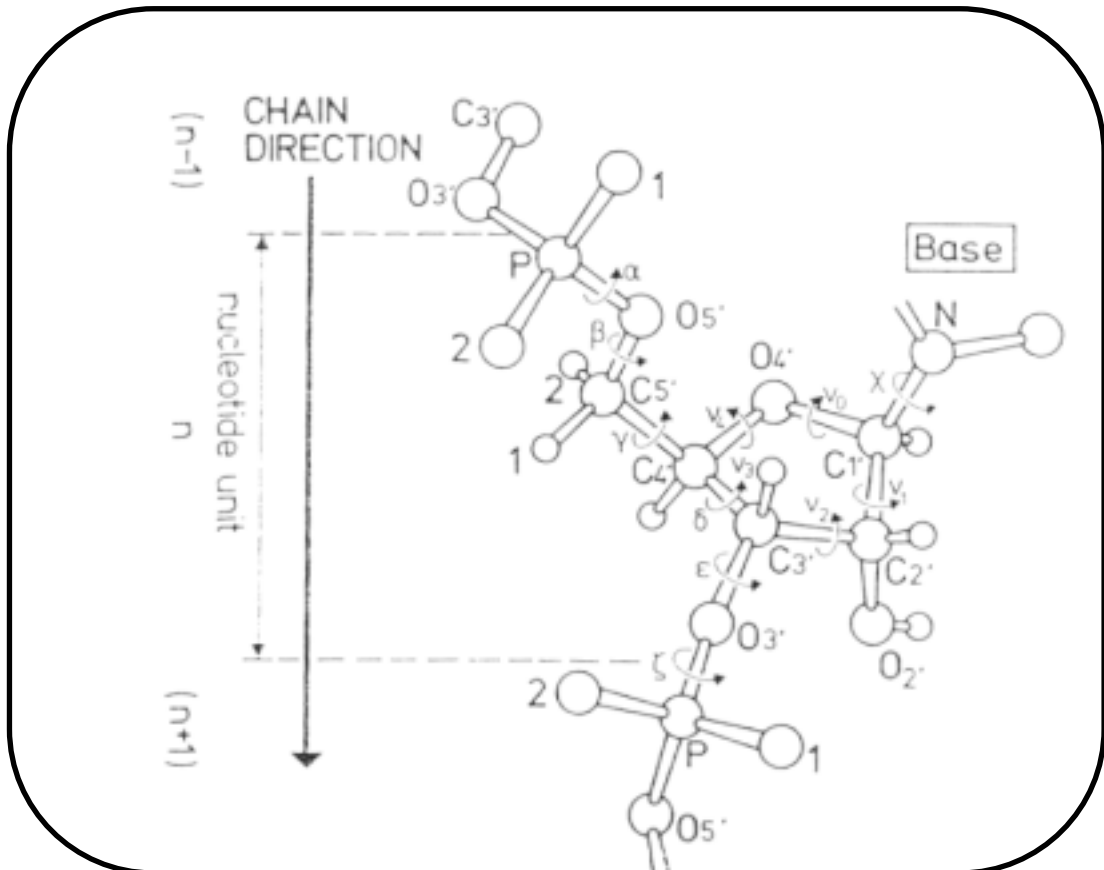


Abb. 27 : Strukturen der Phosphodiesterückgrate von DNA, die Nomenklatur der Torsionswinkel ist gezeigt [137].

Antitumoraktivität von Cisplatin ist der Einfluß der Pt(II)-Koordination auf die Struktur von DNA am besten untersucht [38-41, 159]. Bei Metallkoordination an Nucleobase wird im allgemeinen eine Bevorzugung der N-Konformation beobachtet. Diese Veränderung der Zuckerkonformation bewirkt eine leichte Verzerrung des DNA-Rückgrates. Daneben wird bei kurzen DNA-Fragmenten eine Zunahme der *syn*-Konformation für modifizierte Nucleobase beschrieben, die jedoch bei längeren Oligonukleotiden nicht beobachtet wird [159].

Die Konformation des Zuckerphosphatrückgrats können durch die sieben Torsionswinkel α bis ζ und die fünf endocyclischen Torsionswinkel ν_0 bis ν_4 charakterisiert werden (Abb. 27). Die Kopplungskonstanten vicinaler Zuckerprotonen sind von den endocyclischen Torsionswinkeln abhängig und geben daher Hinweise auf die Wellung des Zuckerrings durch Anwendung der Karplus-Gleichung [83, 85, 137, 162]. Da der Zuckerring nicht geöffnet werden sollte, sind die fünf endocyclischen Torsionswinkel eingeschränkt. Daraus kann das Konzept der "Pseudorotation" abgeleitet werden, wonach die Konformation des Zuckerrings mit nur zwei Parametern,

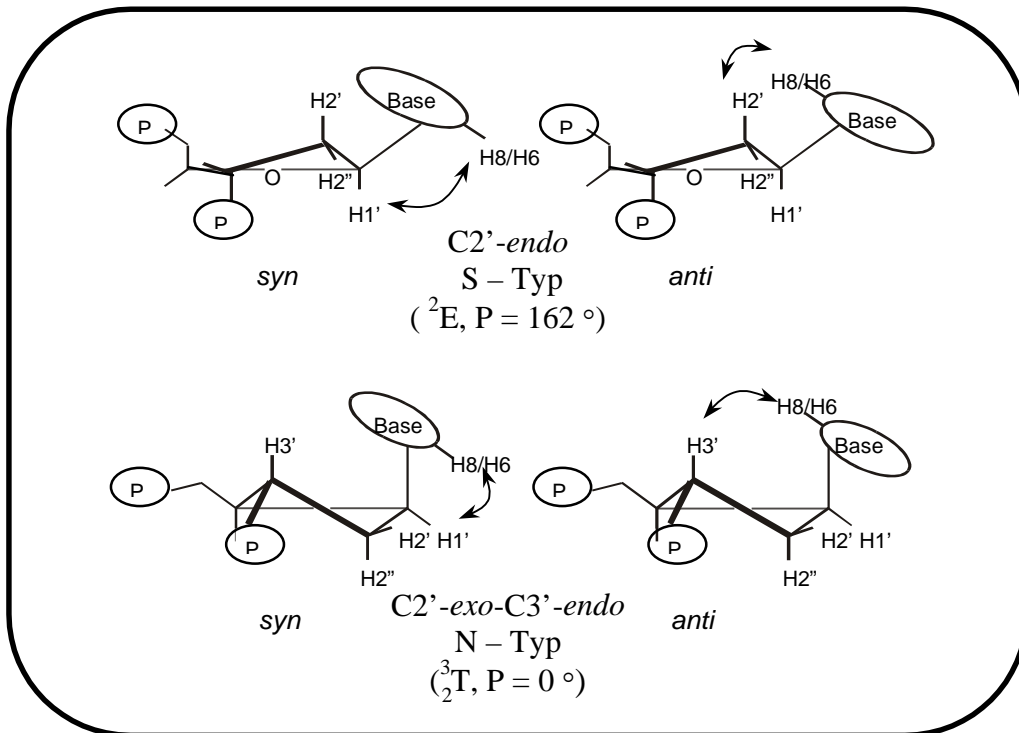


Abb. 28 : Zwei bevorzugte Zuckerkonformationen des 2'-Desoxyriboseringes zur Veranschaulichung von *syn*- und *anti*-Konformation in bezug auf die glycosidische Bindung. Zwischen den mit dem Pfeil markierten Protonen sind jeweils intensive crosspeaks zu erwarten.

dem Pseudorotationswinkel P und der Wellungsamplitude Φ_m (maximale Auslenkung von v_i aus der xy -Ebene), beschrieben werden können [83, 137, 162]. Die endocyclischen Torsionswinkel v_i können dann nach folgender Gleichung aus diesen beiden Parametern berechnet werden :

$$v_i = \Phi_m \cos [P + 0.8\pi (i-2)] \text{ für } i = 0 \text{ bis } 4$$

Der bevorzugte Pseudorotationswinkel P des Nucleotids sind $0^\circ \leq P \leq 36^\circ$ für N-Typ und $144^\circ \leq P \leq 190^\circ$ für S-Typ. Während in einer B-DNA eine *C2'-endo*-Zuckerkonformation (S-Typ) vorliegt, wird in einer A-DNA eine *C3'-endo*-Konformation (N-Typ) gebildet. Bei einer konstanten Wellungsamplitude von 35° beschreibt ein Pseudorotationswinkel von $P = 18^\circ$ eine *C3'-endo* (3E) bzw. $P = 162^\circ$ eine *C2'-endo* Konformation (2E).

Die Konformation koordinierter 5'dGMP-Liganden, die durch vicinale Kopplungskonstanten und umgerechnete interatomare Abstände anhand von ROE-Intensitäten bestimmt sind, wurden nach der Methode von Kim analysiert [163]. Mit

Hilfe eines DQF-COSY-Spektrums können zunächst die homonuklearen Kopplungskonstanten und somit die endocyclischen Torsionswinkel ν_i bestimmt werden. Eine Kopplung direkt benachbarter Protonen ruft im Spektrum einen Crosspeak in Anti-Phasen hervor, während passive Kopplungen zu weiter entfernt liegenden Kernen In-Phase auftreten. Man kann also wohl separierte Multiplietlinien-Kopplungskonstanten, z. B. ${}^3J_{1'2'}$ und ${}^3J_{1'2''}$, einfach aus der Feinstruktur der Crosspeaks ablesen. Bei geringer digitaler Auflösung können sich Crosspeaks teilweise auslöschen. Eine vollständig quantitative Auswertung der Kopplungskonstanten und der Torsionswinkel ist deshalb nicht möglich. Mit qualitativen Überlegungen zur Größe von ${}^3J_{2'3'}$, ${}^3J_{2''3'}$, und ${}^3J_{3'4'}$ können die DQF-COSY-Spektren jedoch ausgewertet werden, und damit wird die Anzahl möglicher endocyclischer Torsionswinkel für die Konformation des Zuckerrings eingeschränkt (Abb. 29 (b)) [162, 164]. Weitere Begrenzungen des Pseudorotationswinkels des Zuckerrings werden aus den umgerechneten Protonenabständen des Zuckerrings anhand von ROE-Intensitäten sichtbar, da besonders der Abstand zwischen H1' und H4' und zwischen H2'' und H4' von der Zuckerwellung abhängt (Abb. 29 (a)) [85, 162]. Während einzelne vicinale Kopplungskonstanten und Protonenabstände nicht exakt sind, wird mit diesen Werten der Pseudorotationswinkel auf einen ausreichend kleinen Bereich eingeschränkt.

Abb. 30 (A) zeigt einen Ausschnitt aus dem DQF-COSY Spektrum von Pd(TyrLys)(5'dGMP-N7) (**7**) im Bereich der Zuckerprotonen von 5'dGMP. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Kopplung des H1'- zum H2''-Proton stärker ausgeprägt ist als die zu H2', und die Kopplung des H3'- zum H2'-Proton tritt schwach hervor, während sie zum H2''-Proton fast gar nicht zu beobachten ist. Für die nicht überlagerten Crosspeaks zwischen H1' und H2'/H2'' können im einzelnen Kopplungskonstanten von 4.8 Hz für ${}^3J_{1'2'}$ und 8.7 Hz für ${}^3J_{1'2''}$ bestimmt werden.

Wenn ${}^3J_{1'2''}$ größer als ${}^3J_{1'2'}$ ist, werden bei einer Wellungsamplitude von 36° bis 44° Pseudorotationswinkel auf den Bereich von $0^\circ < P < 90^\circ$ und $198^\circ < P < 360^\circ$ eingeschränkt. (Abb. 29 (b)). Außerdem werden Werte für ${}^3J_{2'3'}$, ${}^3J_{2''3'}$, und ${}^3J_{3'4'}$ aus der Summe der Kopplungskonstanten wie $\Sigma 2'$, $\Sigma 2''$, bzw. $\Sigma 3'$ (z. B. $\Sigma 2' = {}^3J_{1'2'} + {}^3J_{2'3'} + {}^3J_{2''2'}$) gewonnen, die man aus der Differenz zwischen den äußeren Linien jeder Resonanz erhalten kann. Die erhaltenen Kopplungskonstanten ${}^3J_{2'3'}$, ${}^3J_{2''3'}$, und ${}^3J_{3'4'}$ betragen 7.2, 0.3 und 4.3 Hz. Die Kopplungskonstante zwischen H3' und H4' ist größer als die zwischen H2'' und H3', was auf Pseudorotationswinkel des Zuckerrings zwischen 36° und 170° hindeutet. Damit wird ein möglicher endocyclischer Torsionswinkel für die Konformation des Zuckerrings auf den Bereich von $36^\circ < P <$

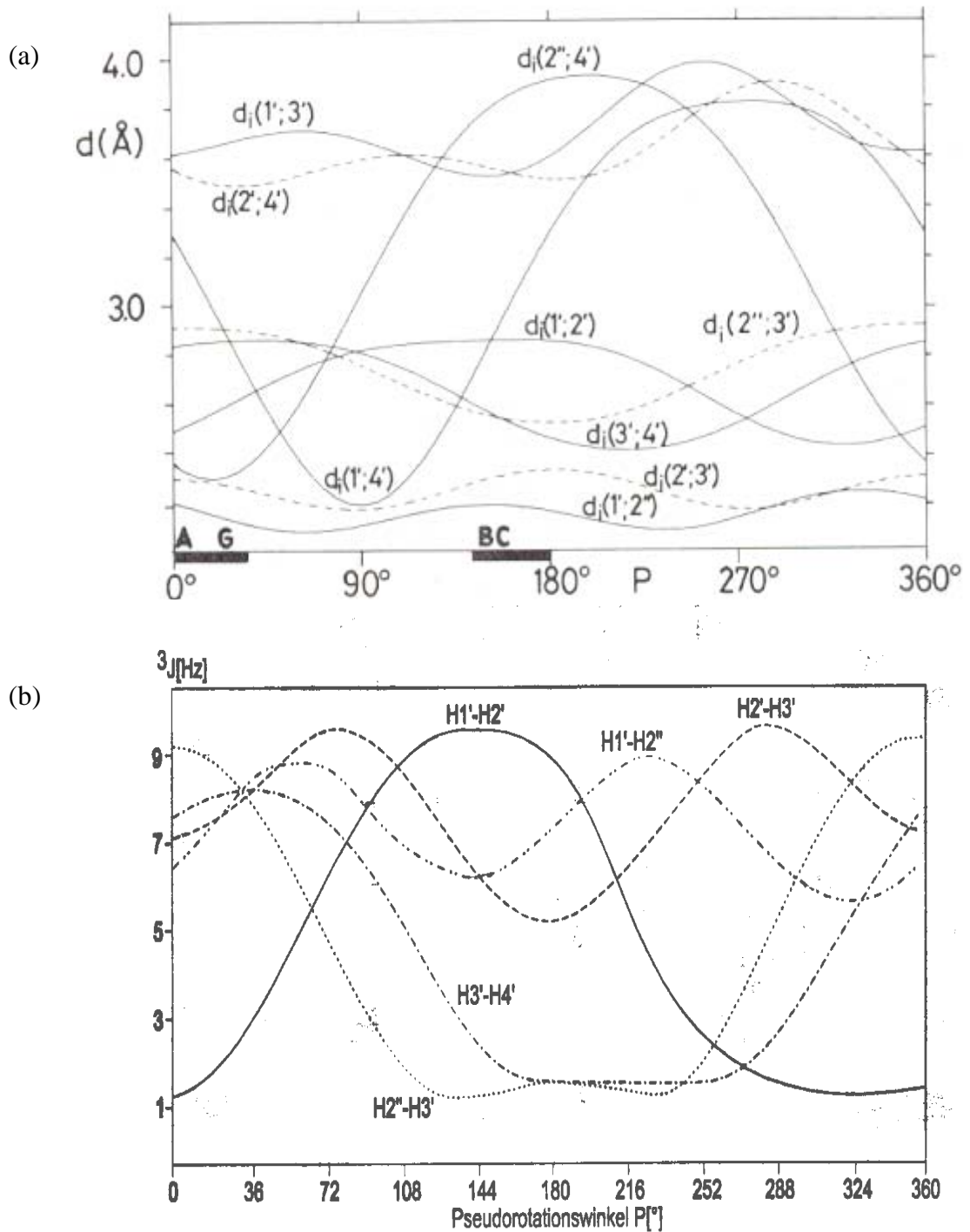


Abb. 29 : Auftragung der (a) Protonenabstände der Zuckerprotonen gegen den Pseudorotationswinkel P [85, 162] und (b) vicinalen Kopplungskonstanten der Zuckerprotonen gegen den Pseudorotationswinkel P unter Verwendung der Karplusgleichung [162, 164].

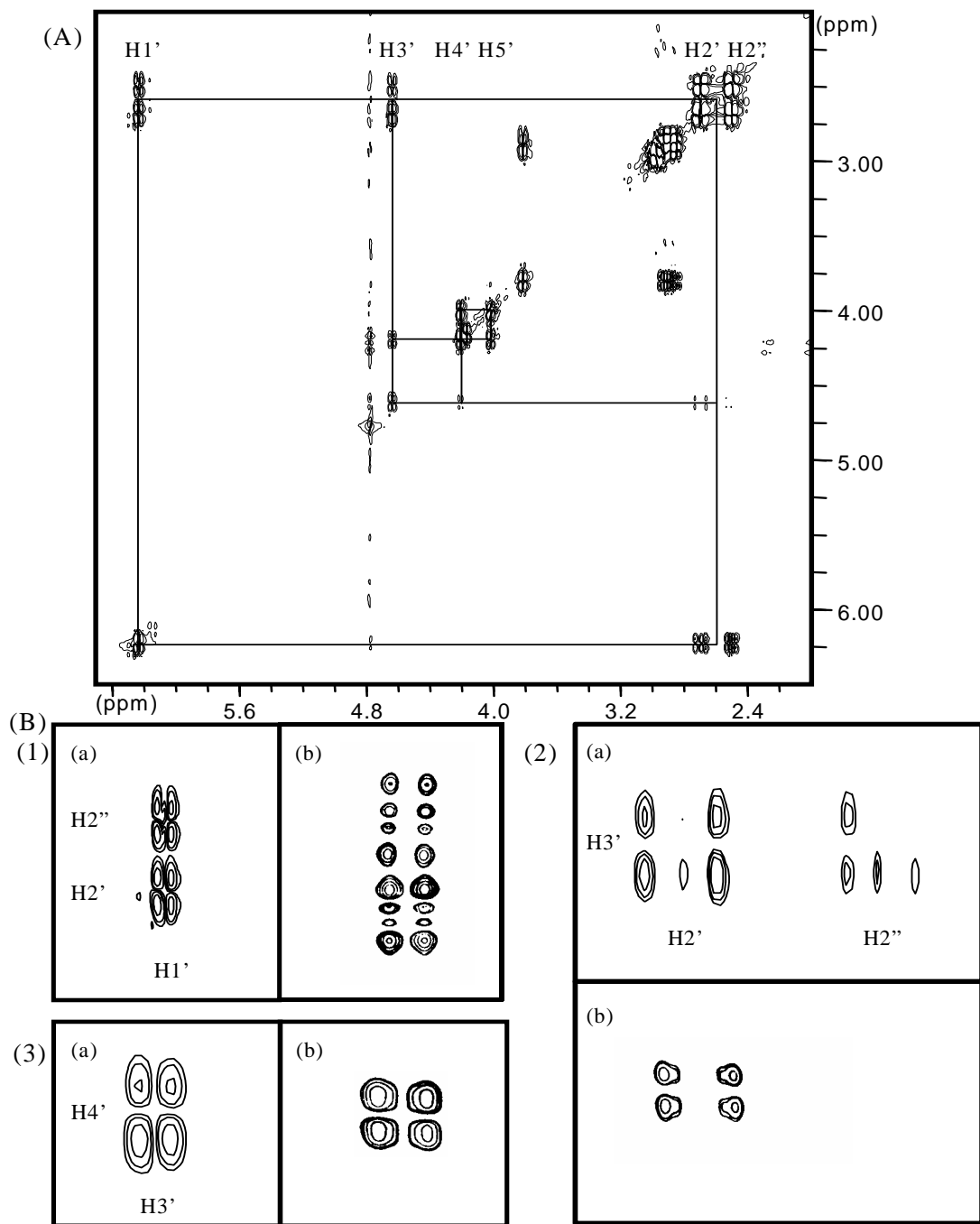


Abb. 30 : Ausschnitt eines DQF-COSY-Spektrum von Pd(TyrLys)(5'dGMP-N7) (7) in D₂O bei pD 5.1 in einer Pufferlösung aus 100mM NaClO₄, 10 mM Mg(ClO₄)₂ und 50 mM NaH₂PO₄.
 (A) Bereich der Zuckerprotonen. Cross-peaks zwischen Zuckerprotonen der 5'dGMP sind durchgenogene Linie gekennzeichnet.
 (B) Cross-peaks zwischen (1) H1' und H2'/H2'', (2) H2'/H2'' und H3', und (3) H3' und H4'. (a) experimentelle (b) simulierte (P = 90°) [165].

90° eingeschränkt. Ein Vergleich der Kopplungskonstanten ${}^3J_{1'2'}$ mit ${}^3J_{3'4'}$ führt zu weiteren Begrenzungen des Pseudorotationswinkels ($80^\circ < P < 270^\circ$), so daß hier die Zuckerkonformation auf den Bereich von $80^\circ < P < 90^\circ$ eingeschränkt wird. Hieraus ist zu schließen, daß der Pseudorotationswinkel für das Zuckerring des 5'dGMP im Bereich von $80^\circ < P < 90^\circ$ liegt. In Abb. 30 (B) sind die experimentell ermittelten Crosspeaks im DQF-COSY-Spektrum dem von Majumdar simulierten ($P = 90^\circ$) gegenübergestellt [165]. Eine gute Übereinstimmung ist erkennbar. Freies 5'dGMP nimmt demgegenüber in Lösung S-Konformation ($144^\circ < P < 190^\circ$; $J_{1'2'} = 7.5$, $J_{1'2''} = 6.5$, $J_{2'3'} = 6.0$, $J_{2''3''} = 3.4$, $J_{3'4'} = 3.2$) ein. Änderungen der Zuckerwellung in Richtung N-Konformation werden auch bei der Platinkoordination an G-N7 von Oligonucleotiden beobachtet [38-41, 159]

Diese Interpretation wird durch die Analyse des 2D- ${}^1\text{H}$ -ROESY-Spektrums von Komplex (7) unterstützt. Aus Betrachtungen der 3-dimensionalen Struktur geht hervor, daß skalar-gekoppelte Protonen wie etwa H3'/H4' oder H4'/H5' aufgrund ihrer räumlichen Nähe auch im ROESY-Spektrum Crosspeaks zeigen müssen [83, 86]. Der ROE des H3'- zum H2'-Proton ist dabei intensiver als der zu dem H2''; das Gegenteil gilt für H4' bzw. H1'. Die geminalen Protonen H2' und H2'' bilden aufgrund ihres fixierten Abstands von nur $\approx 1.8 \text{ \AA}$ besonders starke Kopplungen aus. Für die quantitative Auswertung wurde ein ${}^1\text{H}$ -ROESY-Spektrum von Komplex (7) mit einer Mischzeit von 150 ms in D₂O bei pD 5.4, 268 K und einer Pufferlösung aus 100mM NaClO₄, 10 mM Mg(ClO₄)₂ und 50 mM NaH₂PO₄ aufgenommen. Die Protonen-Abstände werden anhand von ROE-Intensitäten wie bei der von NOESY-Spektren aus diesem ${}^1\text{H}$ -ROESY-Spektrum umgerechnet [91-93], wobei integrierte Peakvolumina mit „Offset-Effekt“ korrigiert werden müssen (Tab. 5). Bei der Umrechnung der Peakvolumina in Abstände wurde der Abstand zwischen dem H2'- und H2''-Proton des 5'dGMP als Referenzabstand gewählt ($r = 1.80 \text{ \AA}$) (wie bereits in Kap I 2 beschrieben). Aus den verschiedenen Zuckerwellungen ergeben sich charakteristische Crosspeak-Muster im ROESY-Spektrum, die auf der Kenntnis charakteristischer Protonenabstände des jeweiligen Typs basieren [85, 162]. Abstände zwischen H1' und H4' sowie zwischen H2'' und H4' hängen besonders stark von der Zuckerwellung ab (Abb. 29 (a)). In einer S-Zuckerkonformation sind die Crosspeaks des H4'-Protons zum H2'' und H1' intensitätsschwach oder fast gar nicht zu beobachten, während in einer N-Zuckerkonformation beide deutlich hervortreten. Im ${}^1\text{H}$ -ROESY-Spektrum von (7) sind für die Crosspeaks des H4'-Proton mit H2'' und H1' mittelstarke ROEs ausgebildet und die aus diesen Crosspeaks umgerechneten Protonenabstände betragen 2.90 und 2.66 Å

Tab. 5 : Aus dem ROESY-Spektrum ermittelte Abstände der Zuckerprotonen von 5'dGMP in Pd(TyrLys)(5'dGMP-N7) (7)

Proton1 ↔ Proton2	Abstände (Å)	Proton1 ↔ Proton2	Abstände (Å)
H8 ↔ H1'	2.44	H3' ↔ H2'	2.55
H8 ↔ H2'	2.31	H3' ↔ H2''	2.72
H8 ↔ H3'	3.31	H3' ↔ H4'	2.61
H1' ↔ H2''	2.08	H4' ↔ H2''	2.90
H1' ↔ H4'	2.66	H2' ↔ H2''	1.80

(Tab. 5). Das bedeutet, daß der Zuckerring des 5'dGMP in einer N-Konformation vorliegt. Dieses Ergebnis und dazu die oben erhaltenen Pseudorotationswinkel aus dem DQF-COSY-Spektrum lassen auf eine O4'-endo (N-Typ) ähnliche Zuckerwellung für das N7-kordinierte 5'dGMP in (7) schließen.

Daneben sind die Intensitäten der Crosspeaks der aromatischen Protonen zu den Zuckerprotonen an C1' und C2' im ¹H-ROESY-Spektrum ein Indiz für die Anordnung der Base relativ zum Zuckerring [85, 162, 165]. Das Crosspeak-Muster einer *anti*-Konformation mit S-Typ wie in B-DNA beruht zum Beispiel darauf, daß das aromatische H8-Proton der Purin-Nucleobase bzw. das H6-Proton der Pyrimidin-Base in räumlicher Nähe zum H2'-Proton steht. In einer *anti*-Konformation mit N-Typ wie in A-DNA hingegen verändern sich die interatomaren Abstände zwischen den Zuckerprotonen. Zum Beispiel ist der Abstand der Basen-Protonen zu dem H2'-Proton wesentlich größer (und wird vergleichbar mit dem Abstand zum H1'); dafür aber wird der Abstand zum H3' kleiner (kleinster Abstand in dieser Anordnung) als im S-Typ. In einer *syn*-Konformation mit N-Typ, wie im Guaninrest von Z-DNA, ist das H8- bzw. H6-Proton von Nucleobasen genau auf das H1'-Proton gerichtet. Bei der N-Konformation ist eine *syn-anti*-Rotation um die glycosidische Bindung mit einer Verkürzung des Abstands zwischen H8 und H3' sowie einer Verlängerung des Abstands zwischen H8 und H1' verbunden (In Abb. 28 verdeutlicht). Die Existenz eines mittelstarken Crosspeak zwischen H8- und H3'-Proton ist auch der häufigst zitierte Beweis für eine N-Zuckerwellung. Bei pD 5.4 weisen die Crosspeaks von H8 zu H1' und H2' im ROESY-Spektrum von (7) vergleichbare Stärke auf. Sie sind deutlich intensiver als die zum H3', während kein Crosspeak von H8 zu H2'' sichtbar ist (Tab. 5). Diese Beobachtungen beweisen, daß die N7-kordinierte Guaninbase des 5'dGMP in (7) eine *anti*-Konformation relativ zum Zuckerring mit N-Typ einnimmt.

Zusammen mit anderen Hinweisen wie den quantitativen und qualitativen Überlegungen zu vicinalen Kopplungskonstanten aus DQF-COSY-Spektren sowie den umgerechneten Protonenabständen des Zuckerrings anhand von ROE-Intensitäten lassen sich für das koordinierte 5'dGMP in (7) eine *anti*-Konformation mit O4'-*endo* (N-Typ) ähnlicher Zuckerwellung ableiten. Eine Zuckerkonformation mit höherem N-Anteil wurde bei der Röntgenstrukturanalyse des freien 5'dGMP gefunden ($P = 83.3^\circ$, $\tau_m = 40.8^\circ$) und wird auch in anderen Lösungsstudien von Nucleinsäuren beobachtet [166]. Beispielsweise wird bei der monofunktionellen Koordination von Pt(dien) über die N7-Guaninbase eine Konformationsänderung Richtung N-Typ und eine Zunahme der *syn*-Konformation beobachtet [166(b)]. Im Gegensatz dazu wird eine *anti*-Konformation mit O4'-*endo*-Anordnung beim ternären Komplex (7) favorisiert nicht zuletzt deshalb, weil in dieser Konformation elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Phosphatgruppen des 5'dGMP und den Seitenketten des Lysinrestes sowie Wasserstoffbrückenbindung zwischen Seitenketten des Tyrosinrestes und der Guaninbase möglich sind (vgl hierzu auch den nächsten Abschnitt.)

Die Diskussion in diesem Abschnitt ist von der Annahme ausgegangen, daß der Zuckerring des Nucleotides in einer bevorzugten Konformation vorliegt [162, 164]. Diese Annahme ist etwas vereinfacht, da eine konformationelle Flexibilität der Moleküle in Lösung vorauszusetzen. In der Realität beinhaltet die Konformation des Zuckerrings ein Gleichgewicht zwischen der N-Konformation ($\Phi_m \approx 37^\circ$, $P \approx 8^\circ$) und der S-Konformation ($\Phi_m \approx 37^\circ$, $P \approx 160^\circ$), wobei die S/N-Inversionsbarriere mit ca. 12 kJ/mol relativ niedrig ist. Wie in Kap. I 2 dargelegt wurde, sind die gemessenen Kopplungskonstanten dann Durchschnittswerte, die sich auf der Basis der Molenbrüche aus den Kopplungskonstanten der individuellen Konformer zusammensetzen. Dieses Gleichgewicht muß beachtet werden. Daraus ergibt sich, daß für Beschreibung der Zuckerkonformation die Analyse der vicinalen Kopplungskonstanten geeigneter ist als die der Abstände zwischen Zuckerprotonen .

3.1.1.4. Untersuchungen der räumlichen Anordnung der koordinierten Liganden im ternären Komplex

Zur weiteren Strukturaufklärung sollte die räumliche Anordnung der koordinierten Liganden im ternären Komplex (7) analysiert werden, die ihrerseits durch den Diederwinkel um die C_α — C_β -Bindung im Dipeptid und durch die Anordnung des koordinierten 5'dGMP zu der Koordinationsebene des Chelatkomplexes bestimmt ist.

Um die Konformation von Seitenketten koordinierter Dipeptide zu analysieren, sollte man zuerst die Kopplungskonstanten um die C_α — C_β -Bindungen der Seitenketten von Dipeptiden bestimmen [103-109]. Im 1D- ^1H -NMR-Spektrum sind die Protonresonanzen des β - CH_2 -Tyr mit ε - CH_2 -Lys-Signal überlagert. Bei der Signalüberlagerung im 1D-Spektrum hilft oft die Aufnahme eines 2D-Spektrums, da die Crosspeaks in ihrer Feinstruktur in der Regel die gleichen Multiplizitäten enthalten wie die entsprechenden 1D-Signale. Erst durch ein DQF-COSY-Spektrum wird eine sichere Zuordnung des β - CH_2 -Tyr-Signals möglich, und somit kann man Kopplungskonstanten durch Spektrensimulation ermitteln. Für die Spektrensimulation wird das Programm Win-DAISY (Version 4.0) bzw. gNMR (Version 3.6) verwendet [89]. Das Methin- und die Methylenprotonen des Tyrosinrestes erzeugen wieder eine ABX-Aufspaltung. Das scheinbare Triplett des Methinprotons entsteht durch vicinale Kopplung mit den beiden nicht-äquivalenten Methylenprotonen. Neben der vicinalen Kopplung mit dem Methinproton koppeln die β - CH_2 -Tyr-Protonen auch geminal miteinander, dadurch spalten sich die Signale der Methylenprotonen in acht Linien auf. Abb. 31 zeigt den Ausschnitt des DQF-COSY-Spektrums von (7) im Bereich der β - CH_2 - und α -CH-Protonen des Tyrosinrestes, und die experimentell ermittelten 1D- ^1H -NMR-Spektren werden dem simulierten im selben Bereich gegenübergestellt. Eine gute

Tab. 6 : Kopplungskonstanten (durch Spektrensimulation ermittelt), und Rotamerenverteilung um C_α — C_β -Bindungen der Seitenketten des Dipeptids in Pd(TyrLys)(5'dGMP-N7) (7) in D_2O bei pD 5.1 in einer Pufferlösung aus 100mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 .

Seitenkette von	^3J (Hz)		Rotamerenverteilung(%)		
	$^3\text{J}_{\text{AX}}$	$^3\text{J}_{\text{BX}}$	h	g	t
Tyrosinrest	6.57	4.68	40.8	38.3	20.9
Lysinrest	7.92 ($^3\text{J}_{\text{av}}$)		71.4	28.6 (g + t)	

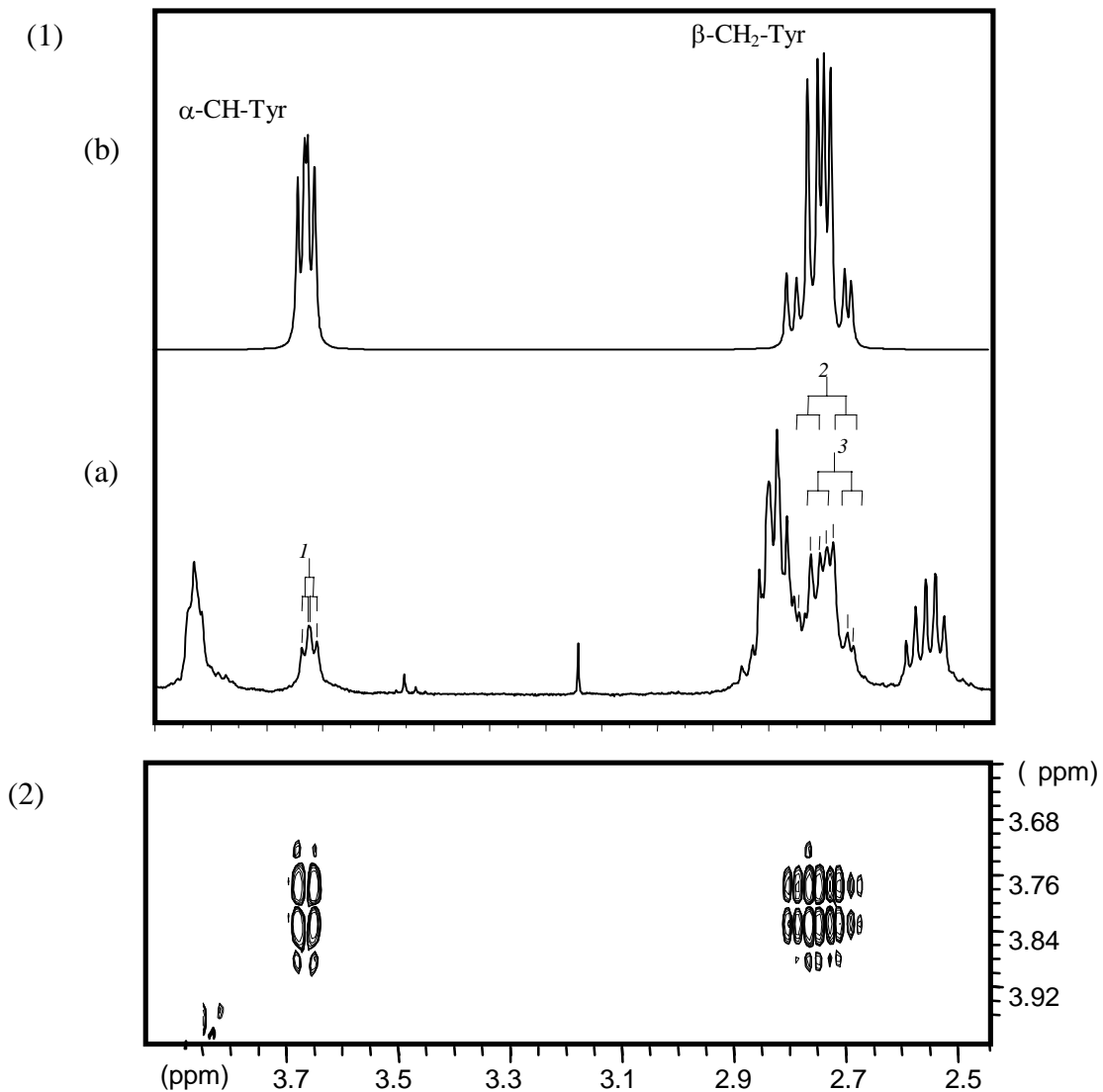


Abb. 31 : (1) Gegenüberstellung von Ausschnitten aus den ^1H -NMR-Spektren von $\text{Pd}(\text{TyrLys})(5'\text{dGMP-N7})$ (**7**) bei pD 5.7 in D_2O und einer Pufferlösung aus 100mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 .
 (a) experimentell bestimmt (400 MHz)
 (b) simuliert (nur ABX-Spinsystem von $\text{C}_\alpha\text{H-C}_\beta\text{H}_2$ des Tyrosinrestes)
 (2) Ausschnitt des DQF-COSY-Spektrums von (**7**) im Bereich der $\beta\text{-CH}_2$ und $\alpha\text{-CH}$ -Protonen des Tyrosinrestes.

Übereinstimmung ist erkennbar.

Die durch die Spektrensimulation erhaltenen Kopplungskonstanten $^3J_{\text{AX}}$ und $^3J_{\text{BX}}$ betragen 6.57 und 4.68 Hz für die Seitenkette des Tyrosinrestes bei pD = 5.1. Die berechnete Konformation der Seitenkette weist demnach einen Rotamer h-Anteil von

40.8 % für den Tyrosinrest auf. Das Methinproton des Lysinrestes bildet den X-Teil eines ABX-Systems und ruft ein Triplett bei $\delta = 4.20$ ppm (${}^3J_{av} = 7.92$ Hz bei pD 5.1) hervor. Die berechnete Konformation dieser Seitenkette weist demnach einen Rotamer h-Anteil von 71.4 % und einen (g + t)-Anteil von 28.6 % auf. Die beiden Seitenketten des TyrLys liegen überwiegend oberhalb der Koordinationsebene des Chelatkomplexes (7). Tab. 6 gibt die durch Spektrensimulation erhaltenen Kopplungskonstanten von $C_\alpha H-C_\beta H_2$ des Tyrosinrestes und die Kopplungskonstanten von $C_\alpha H-C_\beta H_2$ des Lysinrestes an, mit denen die Populationen der Rotameren für Seitenketten bestimmt werden. Der Chloroligand in Komplex (1) wird gegen ein N7-Stickstoffatom des 5'dGMP ersetzt und dabei kann der Rotamer g und t gegenüber dem Rotamer h auf Grund sterischer Hinderung mehr bevorzugt werden. Im Vergleich zum binären Komplex (1) bleibt aber der h-Anteil der beiden Seitenketten durch Koordination des 5'dGMP nahezu unverändert [134]. Diese Tatsache läßt sich so erklären, daß die koordinierten Liganden elektrostatische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen eingehen, so daß Rotamer h stabilisiert wird.

Diese Interpretation wird durch die Analyse des 2D- 1H -ROESY-Spektrums von Komplex (7) gestützt. Befinden sich Protonen des Dipeptids, insbesondere die der beiden Seitenketten, in diesem Komplex in räumlicher Nähe, sollten Crosspeaks im Spektrum erscheinen. Abb. 32 (a) zeigt einen Ausschnitt des 1H -ROESY-Spektrums von (7) in D_2O bei pD 5.1, 268 K in einer Pufferlösung aus 100 mM $NaClO_4$, 10 mM $Mg(ClO_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 im Bereich der 3,5H-Protonen des Tyr/Lysinrestes. Im Gegensatz zum binären Komplex (1) sind die Crosspeaks zwischen 3,5H-Tyr und δ - CH_2 -Lys bzw. ϵ - CH_2 -Lys Protonen deutlich zu erkennen. Diese Tatsache ist ein entscheidender Hinweis dafür, daß die beiden Seitenketten des TyrLys weitgehend in einer h Rotamer-Form vorliegen und sich die 3,5H-Tyr und δ - CH_2 -Lys- bzw. ϵ - CH_2 -Lys-Protonen oberhalb der Koordinationsebene des Chelatkomplexes besonders nahe kommen. Da in der resultierenden Struktur elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Phosphatgruppe des 5'dGMP und der positiv geladenen Seitenkette des Lysinrestes sowie eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Seitenkette des Tyrosinrestes und der Guaninbase auftreten können, werden die Protonenabstände zwischen den Seitenketten kürzer als im binären Komplex. Damit ergeben sich Crosspeaks im ROESY-Spektrum. Bereits konnte von Martin et. al. gezeigt werden [160], daß sowohl in ternären Komplexen von $Pd(GlyTyr)$ mit Guaninderivaten als auch mit Adenosinmonophosphat der Tyrosinring über der Koordinationsebene von Pd angeordnet ist. Diese Interpretation wird durch die Analyse

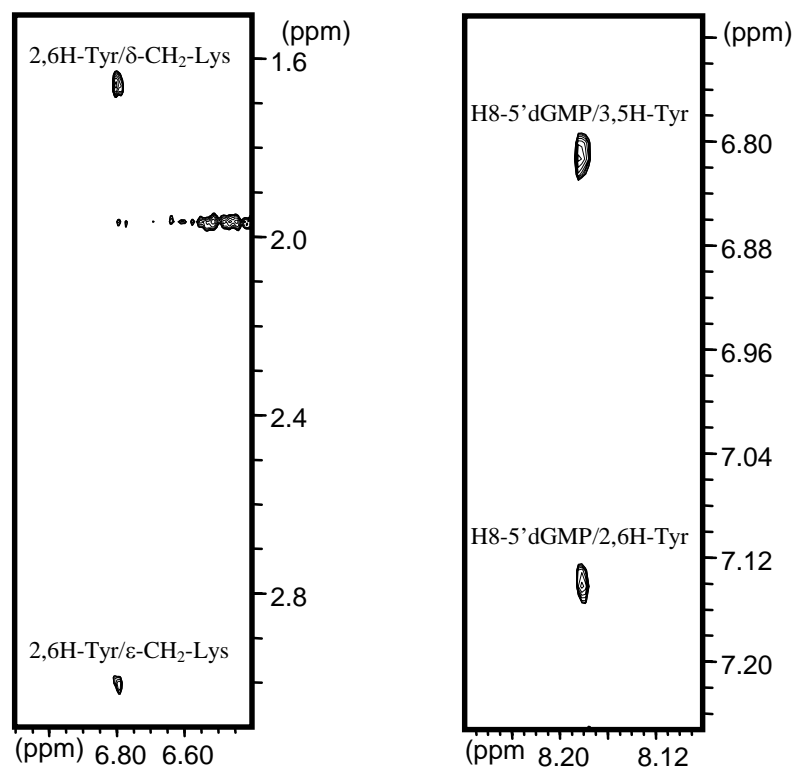


Abb. 32 : Ausschnitt des ^1H -ROESY-Spektrums von $\text{Pd}(\text{TyrLys})(5'\text{dGMP-N7})$ (**7**) in D_2O bei pD 5.1, 268 K in einer Pufferlösung aus 100mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 .
 (a) Bereich der 2,6H-Tyr/Lysinrest und
 (b) Bereich der H8-5'dGMP/aromatische Protonen des Tyrosinrest

der vicinalen Protonenkopplungskonstanten ($C_\alpha\text{H}-C_\beta\text{H}_2$) in der nicht-chelatisierten Seitenkette bestätigt [105]. Auch in anderen Komplexen mit aromatischen Peptiden [106, 107] und Peptiden mit hydrophoben Seitenketten [108, 109] ist die Seitenkette zum Metall hin orientiert.

Das 2D- ^1H -ROESY-Spektrum kann weitere Informationen über die Anordnung der Liganden im Komplex (**7**) liefern. Es gibt zwei bevorzugte Anordnungen des 5'dGMP in Komplex (**7**). Bei der *syn*-Konformation befindet sich der O6-Sauerstoff des Guanins auf derselben Seite der Koordinationsebene des Chelatkomplexes wie die Seitenketten des koordinierten TyrLys-Liganden. Bei der anderen Struktur mit einer *anti*-Anordnung befindet sich der O6-Sauerstoff unterhalb der Koordinationsebene (Abb. 33). Für eine *anti*-Konformation des 5'dGMP sprechen die deutlich intensiveren Crosspeaks

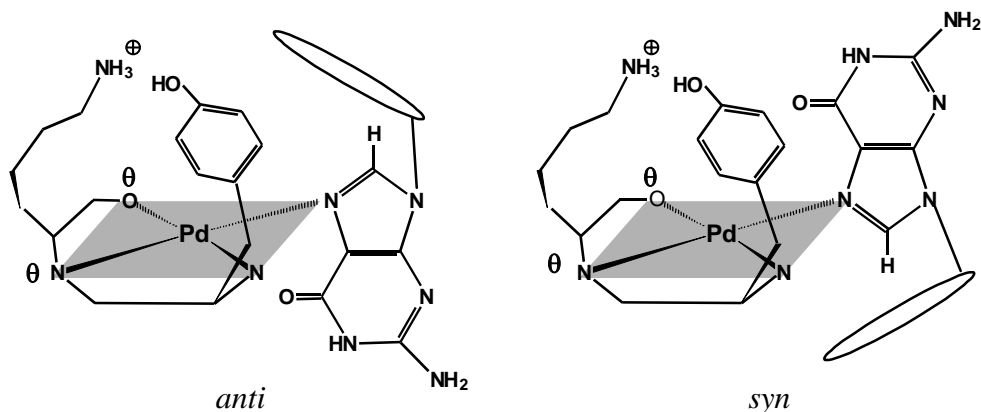


Abb. 33 : Zwei bevorzugte Anordnungen des 5'dGMP in Pd(TyrLys)(5'dGMP-N7) (**7**). (anti und syn beziehen sich hierbei auf die Position von O6 relativ zu den Dipeptid-Seitenketten, nicht auf die Orientierung des Zuckers zur Nucleobase, vgl. Text.)

zwischen H8-5'dGMP und den aromatischen Protonen des Tyrosinrestes, d. h. 3, 5H-Tyr bzw. 2, 6H-Tyr-Proton im ROESY-Spektrum (Abb. 32 (b)). Dies läßt erkennen, daß 5'dGMP bevorzugt eine *anti*-Konformation einnimmt. Es ist zu erwähnen, daß intermolekulare ROEs bei hohen Konzentrationen häufig durch statistisch verteilte, zufällige Kontakte der Moleküle untereinander entstehen können [85-87]. Im untersuchten Spektrum sind jedoch neben den hier aufgeführten keine weiteren intermolekularen Crosspeaks aufzufinden. Diese ROEs sind daher ein eindeutiger Beweis für eine Fixierung der Liganden durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Phosphatgruppe des 5'dGMP und der positiv geladenen Seitenketten des Lysinrestes und die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Seitenkette des Tyrosinrestes und der Guaninbase in der in Abb. 33 dargestellten *anti*-Anordnung des 5'dGMP. Jedoch wäre auch eine schnelle Rotation um die Pd-N7-Bindung denkbar [84, 156]. Zur Überprüfung der aufgestellten These werden temperaturabhängige ¹H-NMR-Spektren in einem Temperaturbereich von 268 K bis 353 K aufgenommen. Diese Untersuchung soll Information über die eingeschränkte Rotation um die Pd-N7-Achse geben. Mit sinkender Temperatur verliert die Resonanz für H8-5'dGMP sehr wenig an Intensität und ein scharfes Signal wird noch bei 268 K beobachtet. Dieser Befund zeigt, daß eine Rotation um die Pd-N7-Bindung nicht stattfindet, vermutlich aufgrund der sterisch anspruchsvollen Seitenketten des Dipeptides und des Zucker-Phosphatrestes von 5'dGMP. Nur das *anti*-Konformer wird durch die intramolekularen Wechselwirkungen stabilisiert. Molekulardynamische Berechnungen haben gezeigt [156(c)], daß 5'dGMP in ternären Komplexen mit

histidinartigen Peptiden eine *anti*-Konformation bevorzugt und die sterische Hinderung der Rotation um die Pd-N7-Achse sowohl durch den sterisch anspruchsvollen Zucker-Phosphatrest von 5'dGMP als durch die Seitenkette des Peptids bedingt wird.

Zusammenfassend, und unter Einbeziehung der anderer Hinweise wie der Konformationsanalyse des koordinierten 5'dGMP-Liganden sowie der qualitativen Auswertung des ROESY-Spektrums, lässt sich für 5'dGMP eine *anti*-Rotamerform zur Metallkoordinationsebene und *anti*-Konformation in Bezug auf die glycosidische Bindung mit O4'-*endo*-ähnlicher Zuckerwellung ableiten. Der Zuckerrest des 5'dGMP ist dabei auf derselben Seite der Koordinationsebene des Chelatkomplexes wie die Seitenkette des koordinierten TyrLys. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit von Wechselwirkungen, wie sie in Abb. 34 schematisch gezeigt sind.

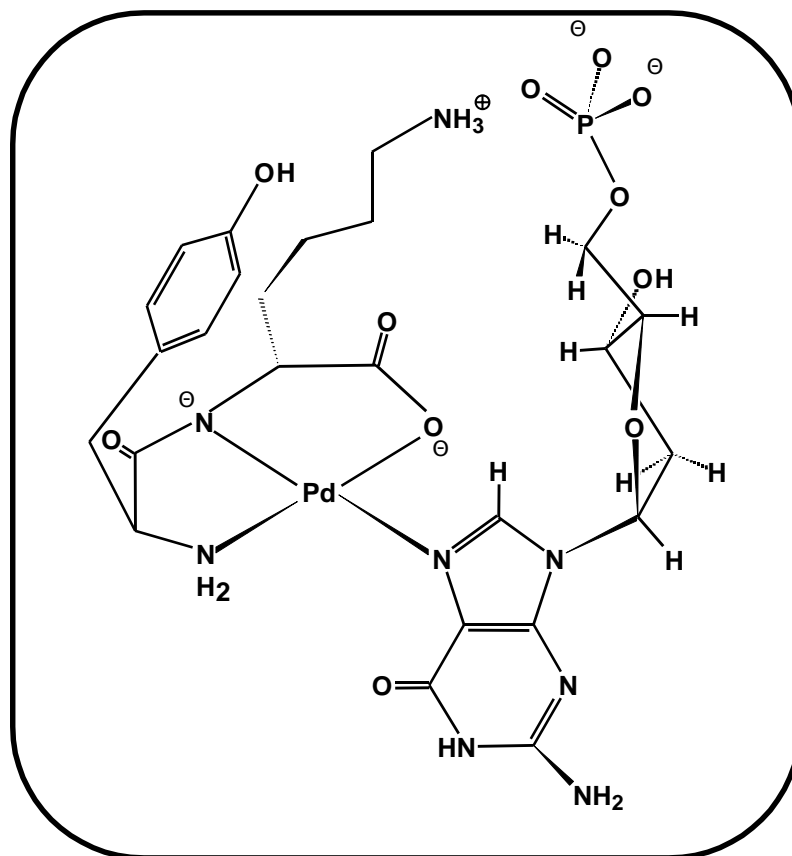
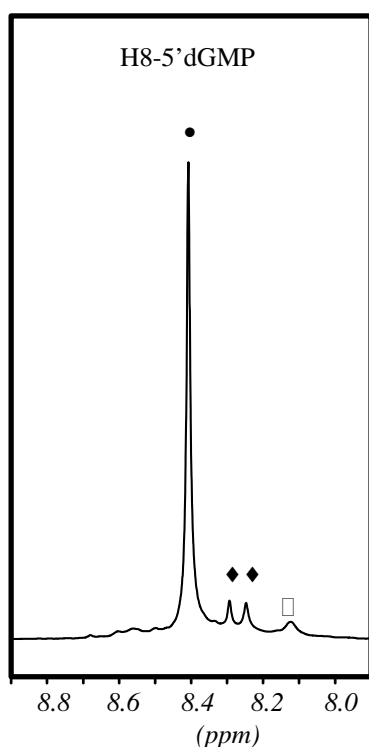


Abb. 34 : Strukturvorschlag für Pd(TyrLys)(5'dGMP-N7) (7)

3.1.2. Charakterisierung von Pd(Gly-L-Lys)(5' dGMP)

3.1.2.1. ^1H -NMR-Untersuchungen

Der binäre Komplex Pd(GlyLys)Cl (**3**) zeigt in schwach saurem Milieu ein Pd(TyrLys)Cl vergleichbares Reaktionsverhalten. Wie erwartet, erscheinen im ^1H -NMR-Spektrum bei schwach saurem pH und bei einer 1:1-Stöchiometrie die Resonanzen für eine N7-Koordination von 5'dGMP (**10**). Als Folge der Metallkoordination an der N7-Position der Guaninbase wird aufgrund des elektronenziehenden Effekts des Metalls eine Tieffeldverschiebung für das H8-Proton beobachtet. Im ^1H -NMR-Spektrum des ternären Komplexes (**10**) spiegelt sich die Palladiumkoordination über N7 des 5'dGMP in diesem typischen Tieffeldshift von 0.26 ppm wider ($\delta = 8.39$ bei pD 5.7) [138-140, 150] Im Zuge der Phosphatdeprotonierung



des 5'dGMP erfährt die H8-Resonanz mit steigendem pD-Wert von 3.9 bis 7.9 einen Tieffeldshift von 0.20 ppm. Die pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung dieser Resonanzen im ^1H -NMR-Spektrum zeigt, daß der pK_a -Wert der Phosphatdeprotonierung des 5'dGMP ca. 6.08 beträgt und aufgrund der höheren Acidität durch die Palladiumkoordination um 0.22 pH-Einheiten unter dem der freien Liganden liegt [150, 153, 156].

Nimmt man das ^1H -NMR-Spektrum im schwach sauren pH-Bereich auf, so beobachtet man das Auftreten neuer Signale; im aromatischen Bereich entstehen sogar drei neue Signale ($\delta = 8.29, 8.25$ und 8.12 ppm bei pD 5.4) (Abb. 35). Diese Protonensignale der Folgeprodukte können anhand der in Kap. II 3.1.1.1 beschriebenen pD-Abhängigkeit zugeordnet

Abb. 35 : ^1H -NMR-Spektrum von Pd(GlyLys)(5'dGMP) in D_2O bei einem pD-Wert von 6.2 in einer Pufferlösung aus 100mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 [• Pd(GlyLys)(5'dGMP-N7) **10**, ◆ {Pd(GlyLys)}₂(5'dGMP-N1/N7) **11**, □ 5'dGMP]

werden [138-140, 150, 153, 156]. Dies spricht für eine Entstehung eines guaninverbrückten Komplexes. Eines der drei neuen Signale (8.12 ppm) ist dem H8-Proton des freien 5'dGMP zuzuordnen, das bei der Bildung des N1, N7-verbrückten Komplexes entstehen muß. Im alkalischen Bereich mit steigendem pD-Wert verändern die beiden anderen Signale ihre Lage nicht, da es sich hierbei um die verbrückende Guaninbase handelt. Der geringe Unterschied in der chemischen Verschiebung zwischen beiden Signalen weist auf Rotationsisomere hin. Im Komplex $[\text{Pd}(\text{GlyLys})]_2$ (5'dGMP-N1/N7) (**11**) ist eine gehinderte Rotation sowohl um die Pd-N7- als auch um die Pd-N1-Bindung zu erwarten. In der N1-Region des 5'dGMP sind aber im Gegensatz zur N7-Umgebung räumlich anspruchsvollere Gruppen vorhanden (exozyklische Amino- und Carbonylgruppe). Im Vergleich zur NMR-Zeitskala ist die Rotation um die Pd-N1-Achse bereits bei Raumtemperaturen nicht genügend, um die Signale des H8-Protons im ^1H -NMR aufzuspalten. Das Fehlen von Rotationsisomeren bei $[\text{Pd}(\text{TyrLys})]_2(5'\text{dGMP-N1/N7})$ (**8**) (Kap. II 3.1.1.1) kann durch die im Vergleich zu (**11**) größere Rotationsbarriere um die Pd-N1-Bindung erklärt werden. Dieser Unterschied kann auf die Abwesenheit des Phenolrings im ternären Komplex des GlyLys zurückgeführt werden, so daß die sterische Hinderung zur Rotation abnimmt und die Rotationsbarriere dementsprechend kleiner werden kann. Die Rotameren liegen im schwach Sauren im Verhältnis 1:1 vor. Aus dem verbrückten Komplex (**10**) bildet sich um pD 6 langsam der N1-koordinierte Komplex (**12**), wobei die Isomerisierung nach dem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus für $\text{Pd}(\text{TyrLys})(5'\text{dGMP})$ (**7**) erfolgt, der im Schema 1 im Kap. II 3.1.1.1 beschrieben ist.

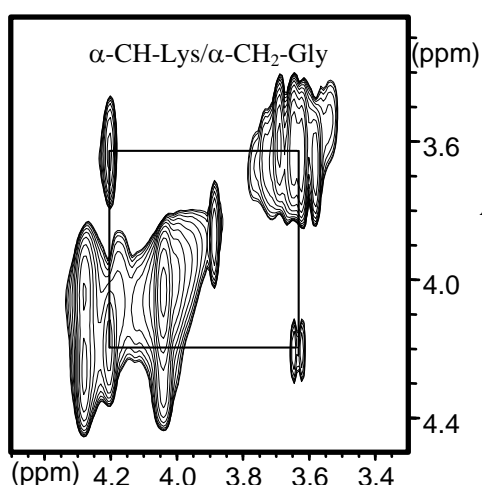
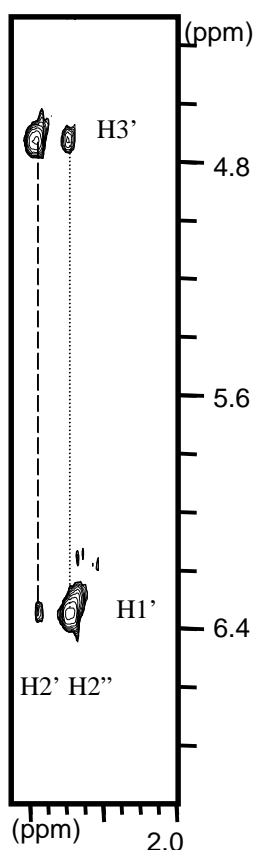


Abb. 36 : Ausschnitt des TOCSY-Spektrum von $\text{Pd}(\text{GlyLys})(5'\text{dGMP-N7})$ (**10**) in D_2O bei pD 5.4 in einer Pufferlösung aus 100mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 . Die Kopplung zwischen den Protonen des $\alpha\text{-CH-Lys}$ und $\alpha\text{-CH}_2\text{-Gly}$ ist durch durchgezogene Linien gekennzeichnet.

3.1.2.2. Zuordnung der Protonenresonanzen anhand zweidimensionaler NMR-Spektroskopie

Die aliphatischen Zuckerresonanzen des 5'dGMP verschieben sich nach der Pd-Koordination an der N7-Position nur wenig im Vergleich zur Ausgangsverbindung, so daß alle Signale durch Vergleich identifiziert werden können. Hingegen wird für die aliphatischen Protonenresonanzen des GlyLys eine Tieffeldverschiebung beobachtet ($\Delta\delta = 0.13$ bis 0.20 ppm), die möglicherweise auf den Einfluß der elektrostatischen Wechselwirkungen bzw. der Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Phosphatgruppe des 5'dGMP und den Seitenketten des Lysinrestes und zwischen jenen der koordinierten α -Aminogruppe zurückzuführen ist. Die erhöhte Acidität der Phosphatgruppe (in Kap. II 3.1.2.1 beschrieben) könnte als weiterer Hinweis auf diese Wechselwirkungen angesehen werden. Eine ähnliche intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen koordinierter Amino- und nicht-koordinierter 5'Phosphat-Gruppe in 5'-



Nucleotiden wurden in Kristallen von $\text{enPd}(5'\text{GMPH})_2$ [156(a)] und von $\text{cis}(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{d}(\text{pGpG}))$ [159(a)] beobachtet und wird für analoge Komplexe [159] auch in wäßriger Lösung gefunden. Auch andere Ergebnisse von NMR-Untersuchungen von $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2(5'\text{GMP})_2$ [156(d)], $\text{Pt}(\text{en})(5'\text{GMP})_2$ [156(e)], $\text{Pt}(\text{en})[\text{d}(\text{pGpG})]$ [159(b)], und $(\text{dien})\text{Pt}(5'\text{-GMP})_2$ [156(b)] stützen diese Annahme.

Die getroffene Zuordnung wird auch durch ein 2D- ^1H -TOCSY-Spektrum bestätigt. Die mit dem HDO-Signal überlagerte $\text{H}3'$ -Resonanz kann mit Hilfe dieses Spektrums leicht zugeordnet werden. Die $\text{H}5'$ - und $\text{H}5''$ -Resonanzen sind degeneriert. Die auffälligste Kopplung im TOCSY-Spektrum ist die Kopplung der $\alpha\text{-CH}_2\text{-Gly}$ zum Lysinrest des GlyLys. Diese Kopplungen geben einen Hinweis darauf, daß der GlyLys-Ligand bei Reaktion des binären Komplexes mit 5'dGMP in jedem Fall an das Palladiumzentrum koordiniert ist. Die Abb. 36, in der die Kopplung zwischen

Abb. 37 : Ausschnitt des ^1H -ROESY-Spektrums von $\text{Pd}(\text{GlyLys})(5'\text{dGMP-N}7)$ (**10**) in D_2O bei pD 5.7, 268 K und einer Pufferlösung aus 100mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 im Bereich der $\text{H}2'/\text{H}2''$ und $\text{H}1'/\text{H}3'$ -Protonen.

Tab. 7 : Chemische Verschiebungen (ppm) des Produktes Pd(GlyLys)(5'dGMP-N7) (**10**) in D₂O bei pD 5.7 und einer Pufferlösung aus 100 mM NaClO₄, 10 mM Mg(ClO₄)₂ und 50 mM NaH₂PO₄. In Klammern sind die Multiplizitäten der Protonenresonanzen und die Wechselwirkungsshifts infolge der Koordination von Palladium an N7 bei gleichbleibendem pH-Wert angegeben.

Zuordnung	δ	Zuordnung	δ
H8	8.39(s; 0.26)	α -CH ₂ -Gly	3.60(dd; 0.20)
H1'	6.34(t; 0.02)	α -CH-Lys	4.17(t; 0.14)
H2'	2.76(dd; -0.02)	β -CH ₂ -Lys	2.01(md; 0.13)
H2''	2.57(dd; 0.03)	γ -CH ₂ -Lys	1.46(m; 0.14)
H3'	4.71(t; -)	δ -CH ₂ -Lys	1.79(m; 0.14)
H4'	4.25(t; 0.00)	ϵ -CH ₂ -Lys	3.09(t; 0.13)
H5'/H5''	4.05(m; 0.00)		

den Protonen des α -CH₂-Gly und α -CH-Lys mit durchgezogenen Linien gekennzeichnet ist, zeigt einen Ausschnitt des TOCSY-Spektrums.

Bei der Zuordnung der Protonenresonanzen unterscheidet sich das H2'-Proton von H2'' in den Intensitäten der ROE-Crosspeaks zu H1' und H3' im ROESY-Spektrum. Im ROESY-Spektrum von (**10**) bei pD 6.2 ist der Crosspeak des H1' zu H2'' deutlich stärker als der zu H2' aufgrund ihrer räumlichen Nähe. Das Gegenteil gilt für H3' (Abb. 37). Nach den in Kap. II 3.1.1.2 ausgeführten Kriterien werden die Resonanzen des H2'- und H2''-Protons eindeutig zugeordnet, so daß das H2''-Proton des 5'dGMP hochfeldverschoben zu H2' auftritt. Mit Hilfe unterschiedlicher 2D-¹H-NMR-Techniken und unter Berücksichtigung dieser Spektren ist es möglich, alle Protonen in (**10**) zu identifizieren. In Tab. 7 sind die chemischen ¹H-NMR-Verschiebungen von (**10**) angegeben, sowie die Multiplizitäten der Protonenresonanzen und die Wechselwirkungsshifts infolge der Koordination von Palladium an N7 bei gleichbleibendem pD-Wert. Mit steigendem pD-Wert, jedoch bereits unter schwach sauren Bedingungen bildet sich der N1, N7-verbrückte Komplex (**11**). Aufgrund des Rotamers um die N1-Bindung sind die Signale im aromatischen Teil des ¹H-NMR-Spektrums aufgespalten. Die nicht-aromatischen Protonen weisen demgegenüber keine Aufspaltungen auf.

Tab. 8 : Die aus dem ROESY-Spektrum ermittelten Abstände der Zuckerprotonen des 5'dGMP in Pd(GlyLys)(5'dGMP-N7) (**10**) in D₂O bei pD 5.7, 268 K in einer Pufferlösung aus 100 mM NaClO₄, 10 mM Mg(ClO₄)₂ und 50 mM NaH₂PO₄.

Proton1 ↔ Proton2	Abstände (Å)	Proton1 ↔ Proton2	Abstände (Å)
H8 ↔ H1'	2.43	H1' ↔ H4'	2.63
H8 ↔ H2'	2.31	H3' ↔ H2'	2.14
H8 ↔ H3'	2.79	H3' ↔ H2''	2.84
H8 ↔ H4'	3.93	H3' ↔ H4'	2.33
H1' ↔ H2'	3.43	H4' ↔ H2''	2.99
H1' ↔ H2''	2.08	H2' ↔ H2''	1.80

3.1.2.3. Untersuchungen der Konformation des koordinierten 5'dGMP-Liganden und der räumlichen Anordnung der koordinierten Liganden im ternären Komplex

Zur Strukturaufklärung wird zunächst **die Zuckerwellung des koordinierten 5'dGMP** analysiert, die durch vicinale Kopplungskonstanten und umgerechnete interatomare Abstände anhand von ROE-Intensitäten bestimmt wird. Für die nicht überlagerten Crosspeaks zwischen H1' und H2'/H2'' im COSY-Spektrum können im einzelnen Kopplungskonstanten von 6.97 Hz für ³J_{1,2'} und 6.21 Hz für ³J_{1,2''} erhalten werden. Außerdem betragen die aus der Summe der Kopplungskonstanten berechneten Werte für ³J_{2,3'}, ³J_{2,3''} und ³J_{3,4'} 5.9, 4.0 und 2.79 Hz. Qualitative Überlegungen zeigen für die vicinalen Kopplungskonstanten der Zuckerprotonen keine einheitliche Tendenz zur Begrenzung des Pseudorotationswinkels; damit wird die Größe des möglichen endocyclischen Torsionswinkels für die Konformation des Zuckerrings nicht eingeschränkt. Die aus dem ROESY-Spektrum von Pd(GlyLys)(5'dGMP-N7) (**10**) enthaltenen Protonenabstände hingegen deuten auf eine N-Konformation des Zuckerrings für N7-koordiniertes 5'dGMP hin. Im ¹H-ROESY-Spektrum von (**10**) treten für die Crosspeaks des H4'-Protons zum H2'' und H1' mittelstarke ROEs auf, und die aus diesen Crosspeaks umgerechneten Protonenabstände betragen 2.99 und 2.63 Å (Tab. 8), was ein Indiz für eine N-Konformation des Zuckerrings ist[83, 86, 166]. Die Existenz des mittelstarken Crosspeaks zwischen H8- und H3'-Proton ist auch der häufigst zitierte Beweis für N-Zuckerwellung. Darüber hinaus geben die Intensitäten der Crosspeaks der aromatischen Protonen zu den Zuckerprotonen im ¹H-ROESY-Spektrum einen Hinweis für **die Basenanordnung relativ zum Zuckerring**[82, 162,

165]. Bei pD 5.7 weisen die Crosspeaks von H8 zu H1' und H2' im ROESY-Spektrum von **(10)** vergleichbare Stärke auf, die deutlich intensiver sind als der zu H3', während kein Crosspeak von H8 zu H2'' sichtbar ist (Tab. 8). Diese Beobachtungen beweisen, wie im Kap. 3.1.1.3 dargelegt, daß die N7-koordinierte Guaninbase des 5'dGMP in **(10)** eine *anti*-Konformation relativ zum Zuckerring mit N-Typ einnimmt.

Um **die räumliche Anordnung des koordinierten Dipeptids** im ternären Komplex zu analysieren, muß man Kopplungskonstanten um die C_α—C_β-Bindung der Seitenkette des Dipeptids bestimmen. Das Methinproton des Lysinrestes bildet den X-Teil eines ABX-Systems, und tritt als Triplett bei $\delta = 4.17$ ppm ($^3J_{av} = 8.16$ Hz bei pD 5.7) auf. Die berechnete Konformation dieser Seitenkette weist einen Rotamer h-Anteil von 69.2 % und einen (g + t)-Anteil von 30.8 % auf. Überwiegend oberhalb der Koordinationsebene des Chelatkomplexes **(10)** befindet sich die Seitenkette des Lysinrestes. Der h-Anteil der Seitenketten hat im Vergleich zum binären Komplex **(3)** durch die Koordination des 5'dGMP um 2% zugenommen. Wenn der Chloroligand in Komplex **(3)** durch das N7-Stickstoffatom des 5'dGMP substituiert wird, können aber Rotamere g und t gegenüber dem Rotamer h auf Grund sterischer Hinderung bevorzugt werden. Eine Zunahme des h-Rotamers würde sich dadurch erklären lassen, daß die Seitenkette des Lysinrestes die elektrostatischen Wechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrückenbindungen mit 5'dGMP eingeht, so daß der Rotamer h stabilisiert wird.

Das ROESY-Spektrum kann weitere Informationen über **die Anordnung des koordinierten 5'dGMP relativ zur Koordinationsebene des Chelatkomplexes** liefern. Wenn sich die Protonen des GlyLys und 5'dGMP in räumlicher Nähe befinden, sollten Crosspeaks im Spektrum erscheinen. Im ROESY-Spektrum von **(10)**, sogar in dem einer Pufferlösung aus 100 mM NaClO₄, 10 mM Mg(ClO₄)₂ und 50 mM NaH₂PO₄ bei 268 K, sind keine Crosspeaks zwischen der Seitenketten des Lysinrestes und 5'dGMP zu sehen. Molekülmodelle bestätigen, daß die Struktur der Seitenkette auch dann sehr flexibel ist, wenn man elektrostatische Wechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen koordinierten Liganden voraussetzt. Eine Tieffeldverschiebung der aliphatischen Protonenresonanzen des GlyLys-Liganden ($\Delta\delta = 0.13$ bis 0.20 ppm) deutet solche Wechselwirkungen an. Die erhöhte Acidität der Phosphatgruppe (in Kap. II 3.1.2.1 beschrieben) könnte einen weiteren Hinweis auf elektrostatische Wechselwirkungen bzw. eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Phosphatgruppe des 5'dGMP und der Seitenkette des Lysinrestes bzw. der koordinierten α -Aminogruppe geben. Nur in der in Abb. 33 dargestellten *anti*-

Anordnung des 5'dGMP befindet sich die Phosphatgruppe auf derselben Seite der Koordinationsebene des Chelatkomplexes wie die Seitenkette des Lysinrestes. Damit kann sich diese intramolekulare Wechselwirkung aufbauen.

Schließlich läßt sich für 5'dGMP eine Rotamerform zur Metallkoordinationsebene und *anti*-Konformation in Bezug auf die glycosidische Bindung mit N-Typ Zuckerwellung ableiten (Abb. 38); Dabei befindet sich der Zuckerrest des 5'dGMP auf derselben Seite der Koordinationsebene des Chelatkomplexes wie die Seitenkette des koordinierten GlyLys.

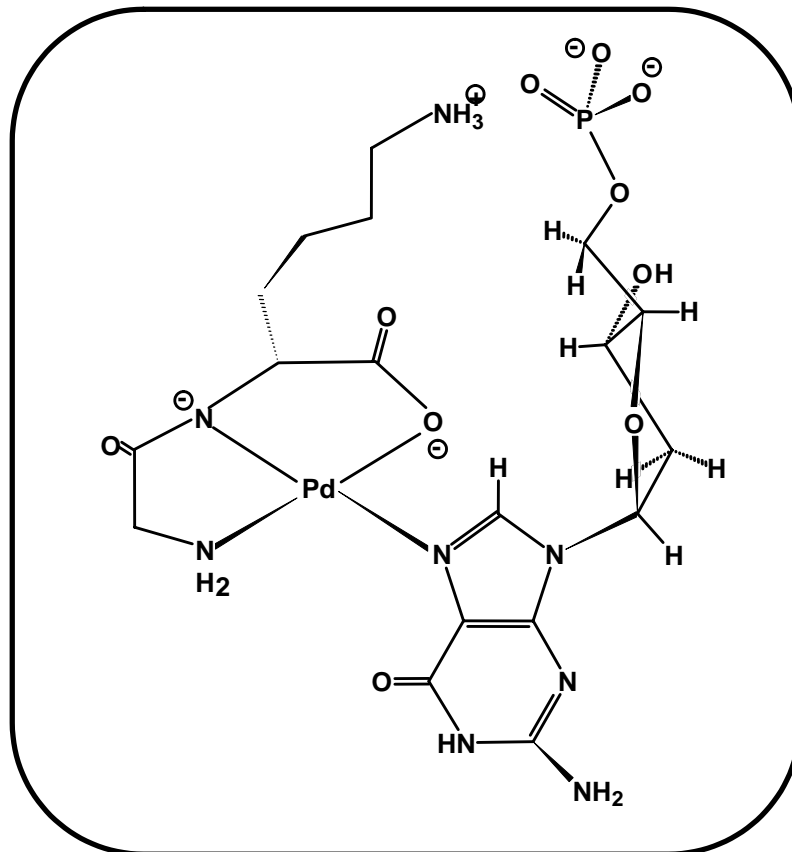


Abb. 38 : Strukturvorschlag für Pd(GlyLys)(5'dGMP-N7) (10)

3.1.3. Charakterisierung von Pd(L-Lys-Gly)(5'dGMP)

Der binäre Komplex Pd(LysGly)Cl (**5**) zeigt in schwach saurem Milieu ein interessantes Reaktionsverhalten gegenüber Pd(TyrLys)Cl (**7**) und Pd(GlyLys)Cl (**10**) auf. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei pD 5.4 zeigt für den ternären Komplex ein komplizierteres Signalmuster. Wie erwartet, erfolgt die Koordination des 5'dGMP an das Palladiumelektrophil bei einer 1:1-Stöchiometrie über die N7-Position der Nucleobase. Mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie kann auf die Entstehung von Pd(LysGly)(5'dGMP-N7) (**13**) als Hauptprodukt geschlossen werden. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des ternären Komplexes (**13**) spiegelt sich die Palladiumkoordination über N7 des 5'dGMP im typischen Tieffeldshift von 0.28 ppm wider ($\delta = 8.45$ bei pD 5.9) [138-140, 150]. Im Zuge der Phosphatdeprotonierung des 5'dGMP erfährt die H8-Resonanz mit steigendem pD-Wert von 4.1 bis 7.4 den erwarteten Tieffeldshift von 0.22 ppm. Die pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung dieser Resonanz im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt, daß der pK_a -Wert der Phosphatdeprotonierung des 5'dGMP ca. 5.87 beträgt und aufgrund der höheren Acidität durch die Palladiumkoordination um 0.37 pH-Einheiten unter dem des freien Liganden liegt [150, 153, 156].

Allerdings sind auch andere Produktsignale zu erkennen. Die im aromatischen Teil

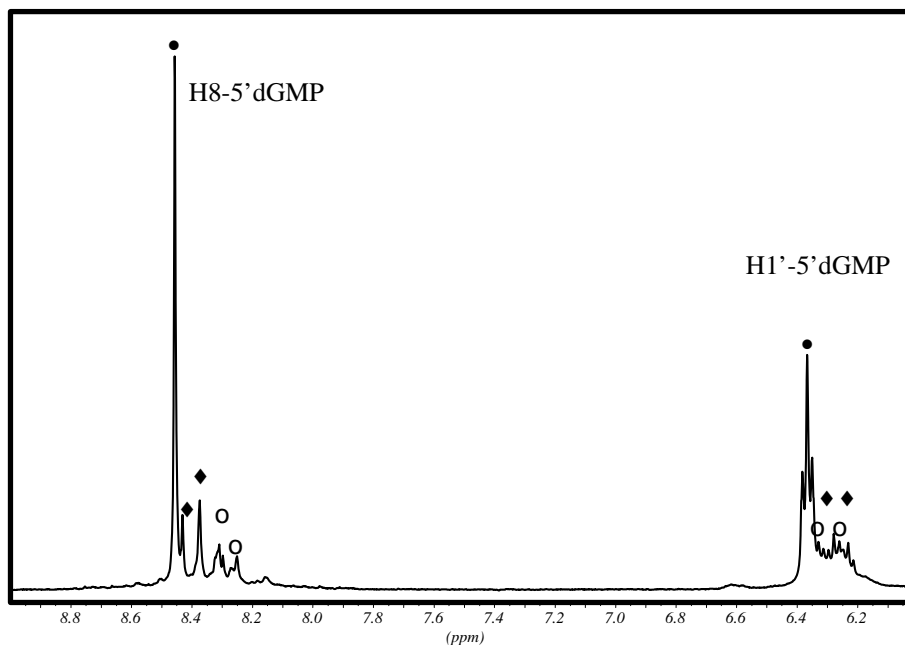


Abb. 39 : $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Pd(LysGly)(5'dGMP) in D_2O bei einem pD-Wert von 6.3 in einer Pufferlösung aus 100 mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 [● Pd(LysGly)(5'dGMP-N7) **13**, ◆ $\{\text{Pd}(\text{LysGly})\}_2(5'd\text{GMP-N1/N7})$ **14**, ○ Pd(LysGly)(5'dGMP-N1) **15**]

des Spektrums beobachteten H8-Protonen weisen auf die Bildung von mindestens zwei unterschiedlich gebundenen ternären Komplexen hin (Abb. 39)[138-140, 150, 153, 156]. Speziell zwei weitere H8-Signale deuten auf die Existenz der Rotameren hin (bedingt durch gehinderte Rotation um die Pd-N1-Achse); hierbei könnte es sich um den N1, N7-verbrückten (**14**) und N1-gebundenen Komplex (**15**) handeln. Diese H8 Signale verändern im basischen pD-Bereich ihre Lage erwartungsgemäß nicht. Da im Bereich des pK_a -Wertes für die N1-Position kein Tieffeldshift und somit keine Deprotonierung an dieser Position zu beobachten ist, sind diese Signale dem N7/N1- und N1-koordinierten Komplex zuzuordnen ($\delta = 8.43$ und 8.37 ppm für N1/N7-, $\delta = 8.31$ und 8.25 ppm für den N1-koordinierte Komplex). Der geringen Unterschied in der chemischen Verschiebung zwischen beiden Signalen dieser Komplexe weist auf Rotationsisomere hin. Im Komplex $\{Pd(LysGly)\}_2(5'dGMP-N1/N7)$ (**14**) ist eine gehinderte Rotation sowohl um die Pd-N7- als auch um die Pd-N1-Bindung zu erwarten. In der N1-Region des 5'dGMP sind aber im Gegensatz zur N7-Umgebung räumlich anspruchsvollere Gruppen vorhanden (exozyklische Amino- und Carbonylgruppe). Somit ist die Rotation um die Pd-N1-Achse auf der NMR-Zeitskala bei Raumtemperatur nicht genügend, um das Signal des H8-Protons im 1H -NMR

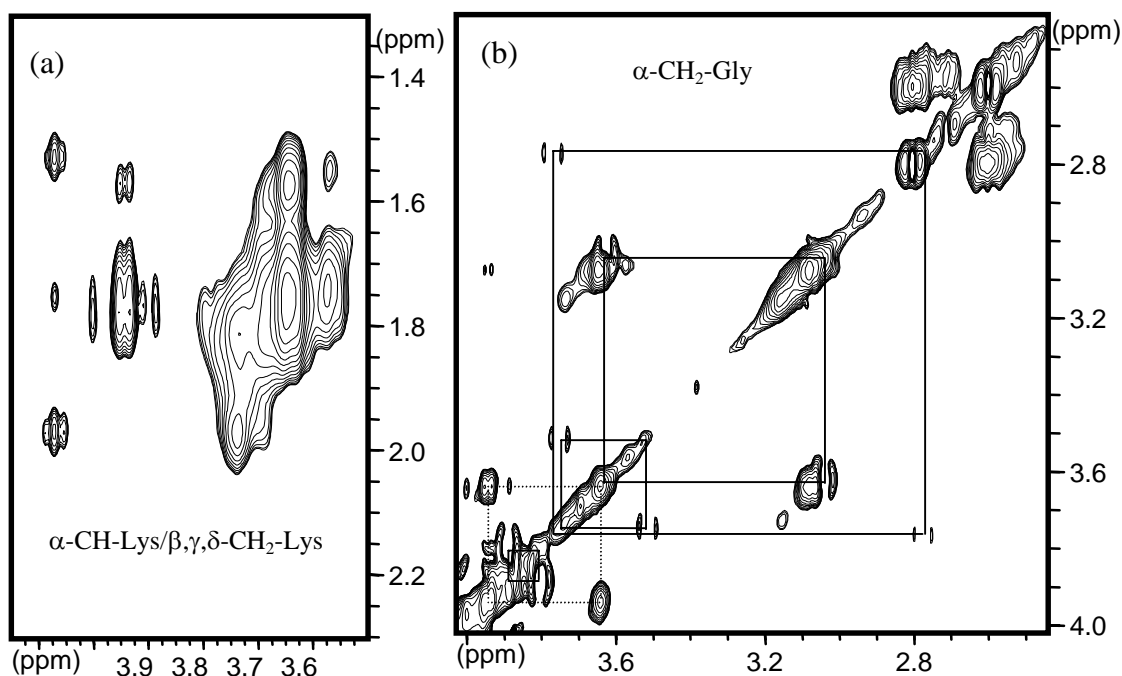


Abb. 40 : Ausschnitt des TOCSY-Spektrum von $Pd(LysGly)(5'dGMP)$ in D_2O bei pD. 5.4 (a) Bereich der α -CH-Lys-/ β , δ , γ -CH₂-Lys- (b) Bereich der α -CH₂-Gly-Protonen Die Kopplungen zwischen den Protonen des α -CH₂-Gly sind mit durchgezogenen Linien gekennzeichnet, die zwischen den Protonen des α -CH₂-Gly und α -CH-Lys mit gestrichelten Linien.

aufzuspalten.

Auch im nicht-aromatischen Teil des Spektrums zeigen sich gegenüber dem binären Komplex (**5**) zusätzliche Aufspaltungen. In den Rotameren des N1, N7-verbrückten und N1-gebundenen Komplexes besitzen die LysGly-Liganden dieser Pd-Komplexe eine unterschiedliche Umgebung; sie sind also chemisch nicht äquivalent. Im 1D-¹H-NMR-Spektrum läßt die Signalüberlagerung eine Zuordnung zu den verschiedenen Produkten nicht zu. Erst durch ein 2D-¹H-TOCSY-Spektrum wird eine sichere Bestimmung des Signalsets möglich (Abb. 40). Auffällig ist in diesem Fall, daß das α -CH₂-Gly-Signal mindestens in 5 Sets des Dublett-von-Dubletts aufgespalten ist. Dies liegt daran, daß infolge der Koordination von LysGly an das Metallion das C _{α} -Atom des Glysinrestes relativ zur Koordinationsebene eine fixierte Position einnimmt und die beiden Methylenprotonen in entgegengesetzte Richtung der Koordinationsebene zeigen. Da die beiden Methylenprotonen, insbesondere die des N1, N7-verbrückten und des N1-gebundenen Komplexes, jeweils unterschiedlich durch den Ringstrom der Guaninbase beeinflußt werden, werden die Methylenprotonen inäquivalent und koppeln miteinander. Das in Abb. 40 (b) dargestellte TOCSY-Spektrum im Bereich zwischen 2.4 bis 4.1 ppm belegt deutlich, daß die beiden intensiveren Dubletts für den N7-koordinierten Komplex (**13**) bei 3.98 und 3.90 ppm miteinander koppeln (²J_{HH} = 19.1 Hz) und ebenso die vier anderen Signalsets. Bemerkenswert in diesem TOCSY-Spektrum ist ferner die Kopplung der α -CH₂-Gly-Protonen mit dem α -CH-Lys-Proton des LysGly. Diese Kopplungen sind ein entscheidender Hinweis dafür, daß der Dipeptidligand bei der Reaktion des binären Komplexes (**5**) mit 5'dGMP zumindest noch an das Palladiumzentrum koordiniert ist. In Tab. 9 sind die chemischen Verschiebungen der α -

Tab. 9 : Die chemischen Verschiebungen (ppm), die geminale Kopplungskonstante und die Differenz der chemischen Verschiebungen der α -CH₂-Gly-Signale bei Umsetzung von 5'dGMP mit Pd (LysGly)Cl (**5**) in D₂O bei pD 5.4.

Chemische Verschiebungen (ppm)	² J _{HH} (Hz)	$\Delta\delta$ (ppm)
3.98, 3.90	19.1	0.08
3.89, 3.80	18.7	0.09
3.75, 3.52	17.8	0.23
3.77, 2.77	18.6	1.00
3.63, 3.04	16.2	0.59

CH₂-Gly-Signale für verschiedene Produkte sowie die geminale Kopplungskonstante und die Differenz der chemischen Verschiebungen angegeben. Die restlichen vier Signalsets dürften jeweils Rotameren der N7/N1- und N1-koordinierten Komplexe zuzuordnen sein, doch ist eine genauere Identifizierung dieser Resonanzen zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Auffällig ist auch das Vorliegen einer großen Aufspaltung der α -CH₂-Gly-Resonanzen der Nebenprodukte, welche im Vergleich zum Hauptprodukt (**13**) zwischen 0.09 – 1.00 ppm gegeneinander verschoben sind. Für die α -CH-Lys-Gruppe treten darüberhinaus fünf Signale auf (Abb. 40 (a)). Durch die Kopplung zwischen α -CH₂-Gly und α -CH-Lys ist die Resonanz bei 3.66 ppm als die des N7-koordinierten Komplexes (**13**) zu identifizieren, jedoch ist auch hier eine genaue Identifizierung anderer Resonanzen, welche Rotameren der N7/N1- und N1-koordinierten Komplexe zuzuordnen sind, nicht möglich.

Trotz gravierender Signalüberlagerungen im 1D-¹H-NMR-Spektrum können durch ein 2D-¹H-TOCSY-Spektrum sowie ein ROESY-Spektrum alle Protonenresonanzen des N7-koordinierten Komplexes zugeordnet werden (Tab. 10). Die dem HDO-Signal überlagerte H3'-Resonanz kann mit Hilfe dieses Spektrums leicht zugeordnet werden. Die H5'- und H5''-Resonanzen sind degeneriert. Nach Kriterien, wie sie in Kap. II 3.1.1.2 diskutiert werden, lassen sich die Resonanzen des H2'- und H2''-Protons eindeutig zuordnen. Wiederum tritt das H2''-Proton des 5'dGMP hochfeldverschoben

Tab. 10 : Chemische Verschiebungen (ppm) des Produkts Pd(LysGly) (5'dGMP-N7) (**13**) in D₂O bei pD 5.7 in einer Pufferlösung aus 100 mM NaClO₄, 10 mM Mg(ClO₄)₂ und 50 mM NaH₂PO₄. In Klammern sind die Multiplizität der Protonenresonanzen und die Wechselwirkungsshifts infolge der Koordination von Palladium an N7 bei gleichem pH-Wert angegeben.

Zuordnung	δ	Zuordnung	δ
H8	8.41(s; 0.28)	α -CH ₂ -Gly	3.94(dd; 0.04)
H1'	6.34(t; 0.02)	α -CH-Lys	3.66(dd; 0.10)
H2'	2.78(dd; 0.00)	β -CH ₂ -Lys	1.76(m; 0.06)
H2''	2.61(dd; 0.07)	γ -CH ₂ -Lys	1.58(m; 0.06)
H3'	4.73(m; -)	δ -CH ₂ -Lys	1.76(m; 0.06)
H4'	4.28(t; 0.03)	ϵ -CH ₂ -Lys	3.08(t; 0.05)
H5'/H5''	4.09(m; 0.04)		

zu H2' auf.

Zur Strukturaufklärung von Pd(LysGly)(5'dGMP-N7) (**13**) wird zunächst die Zuckerwellung des koordinierten 5'dGMP analysiert, die durch vicinale Kopplungskonstanten und umgerechnete interatomare Abstände anhand von ROE-Intensitäten bestimmt wird. Für die nicht überlagerten Crosspeaks zwischen H1' und H2'/H2'' im COSY-Spektrum können im einzelnen Kopplungskonstanten von 6.59 Hz für die ${}^3J_{1'2'}$ und von 6.51 Hz für die ${}^3J_{1'2''}$ erhalten werden. Außerdem betragen die aus der Summe der Kopplungskonstanten berechneten Werte für ${}^3J_{2'3'}$, ${}^3J_{2''3'}$ und ${}^3J_{3'4'}$ 6,24, 3.73 und 3.28 Hz. Qualitative Überlegungen zeigen für die vicinalen Kopplungskonstanten der Zuckerprotonen keine eindeutige Tendenz für die Begrenzung des Pseudorotationswinkels. Damit wird die Anzahl möglicher endocyclischer Torsionswinkel für die Konformation des Zuckerrings nicht eingeschränkt. Im ${}^1\text{H}$ -ROESY-Spektrum von (**13**) treten für die Crosspeaks des H4'-Protons zum H2'' und H1' mittelstarke ROEs auf, was ein Hinweis für eine N-Konformation des Zuckerrings ist. Die Existenz des mittelstarken Crosspeaks zwischen dem H8- und H3'-Proton ist auch ein Beweis für die N-Zuckerwellung. Darüber hinaus bieten die Intensitäten der Crosspeaks der aromatischen Protonen zu den Zuckerprotonen im ${}^1\text{H}$ -ROESY-Spektrum einen Hinweis für die Basenkonformation relativ zum Zuckerring. Bei pD 5.7 weisen die Crosspeaks von H8 zu H1' und H2' im ROESY-Spektrum von (**13**) vergleichbare Stärke auf, die deutlich intensiver sind als der Crosspeak zu H3', während kein Crosspeak von H8 zu H2'' sichtbar ist. Diese Beobachtungen beweisen, wie im Kap. 3.1.1.3 dargelegt, daß die N7-koordinierte Guaninbase des 5'dGMP in (**13**) eine *anti*-Konformation relativ zum Zuckerring mit N-Typ einnimmt.

Um die räumliche Anordnung der koordinierten Dipeptide im ternären Komplex zu analysieren, muß man Kopplungskonstanten um die C_α — C_β -Bindung der Seitenketten des Dipeptids bestimmen. Das Methinproton des Lysinrestes bildet den X-Teil eines ABX-Systems und tritt als Triplet bei $\delta = 3.66$ ppm (${}^3J_{av} = 10.66$ Hz bei pD 5.4) auf. Die berechnete Konformation dieser Seitenkette weist einen Rotamer h-Anteil von 46.2 % und einen (g + t)-Anteil von 53.8 % auf. Die Seitenkette des Lysinrestes befindet sich überwiegend oberhalb der Koordinationsebene des Chelatkomplexes (**13**). Der h-Anteil der Seitenketten hat im Vergleich zum binären Komplex (**5**) durch Koordination des 5'dGMP um 4 % zugenommen[143]. Wenn der Chloroligand in Komplex (**5**) durch N7-Stickstoffatome des 5'dGMP substituiert wird, kann aber der Rotamer g und t gegenüber dem Rotamer h auf Grund sterischer Hinderung begünstigt werden. Diese Zunahme des h-Rotamers dürfte auch hier wieder darauf beruhen, daß

die Seitenkette des Lysinrestes elektrostatische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen mit 5'dGMP eingehen.

Das ROESY-Spektrum kann weitere Informationen über die Anordnung des koordinierten 5'dGMP zu der Koordinationsebene des Chelatkomplexes liefern. Wenn sich die Protonen des LysGly und 5'dGMP in räumlicher Nachbarschaft befinden, sollten Crosspeaks im Spektrum erscheinen. Im ROESY-Spektrum von (**13**) sind selbst in einer Pufferlösung aus 100 mM NaClO₄, 10 mM Mg(ClO₄)₂ und 50 mM NaH₂PO₄ und 268 K keine Crosspeaks zwischen den Seitenketten der Lysinreste und dem 5'dGMP zu sehen. Die Struktur der Seitenketten ist auch dann sehr flexibel, wenn man elektrostatische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen zwischen koordinierten Liganden voraussetzt. Eine Tieffeldverschiebung für die aliphatischen Protonresonanzen des LysGly-Liganden ($\Delta\delta = 0.04 \sim 0.10$ ppm) deutet entsprechende Wechselwirkungen an. Die erhöhte Acidität der Phosphatgruppe (in dem ersten Abschnitt des Kap. II 3.1.3 beschrieben) könnte ein weiterer Hinweis auf elektrostatische Wechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Phosphatgruppen des 5'dGMP, den Seitenketten des Lysinrestes und den koordinierten α -Aminogruppen sein. Nur bei der in Abb. 33 dargestellten *anti*-Anordnung des 5'dGMP befindet sich die Phosphatgruppe und die Seitenkette des Lysinrestes auf derselben Seite der Koordinationsebene, d. h. oberhalb der Koordinationsebene, um entsprechende intramolekulare Wechselwirkungen einzugehen.

Schließlich läßt sich für 5'dGMP eine *anti*-Rotamerenform bezüglich der Metallkoordinationsebene und *anti*-Konformation in Bezug auf die glycosidische Bindung mit N-Typ Zuckerwellung ableiten.

3.2. Umsetzungen mit 5'dCMP

3.2.1. Charakterisierung von Pd(L-Tyr-L-Lys)(5'dCMP)

3.2.1.1. ¹H-NMR-Untersuchungen

Weiterhin wird der binäre Komplex Pd(TyrLys)Cl (**1**) mit dem 5'dCMP-Liganden umgesetzt, wobei der Chloroligand durch 5'dCMP substituiert wird. Unter stark sauren Bedingungen ist der binäre Komplex (**1**) instabil, während im Alkalischen die Reaktivität der Pd-Komplexe infolge der Ausbildung dimerer Spezies und Hydroxylspezies erschwert wird. Aus diesen Gründen wird die Reaktion bei dem schwach sauren pD-Wert (ca. pD 5) durchgeführt.

Das ¹H-NMR-Spektrum bei pD 5.4 zeigt im aromatischen Bereich drei deutlich unterscheidbare Signalsets bei $\delta = 8.02$, 7.94 und 7.86 ppm (Abb. 41). Im Bereich der H6-Resonanzen des 5'dCMP können neben dem Signalset für den freien Liganden ($\delta = 8.02$) lediglich zwei Signalsets unterschieden werden ($\delta = 7.94$ und 7.86 ppm). Durch die Senkung des pD-Wertes von 7 auf 4 verschieben sich die H5- und H6-Resonanzen von freiem 5'dCMP aufgrund der N3-Protonierung zu tiefem Feld, während die entsprechenden Produktsignale wegen der Phosphatprotonierung einer Hochfeldverschiebung ($\Delta\delta = -0.09$ ppm) unterliegen[151, 154, 157]. Die pH-

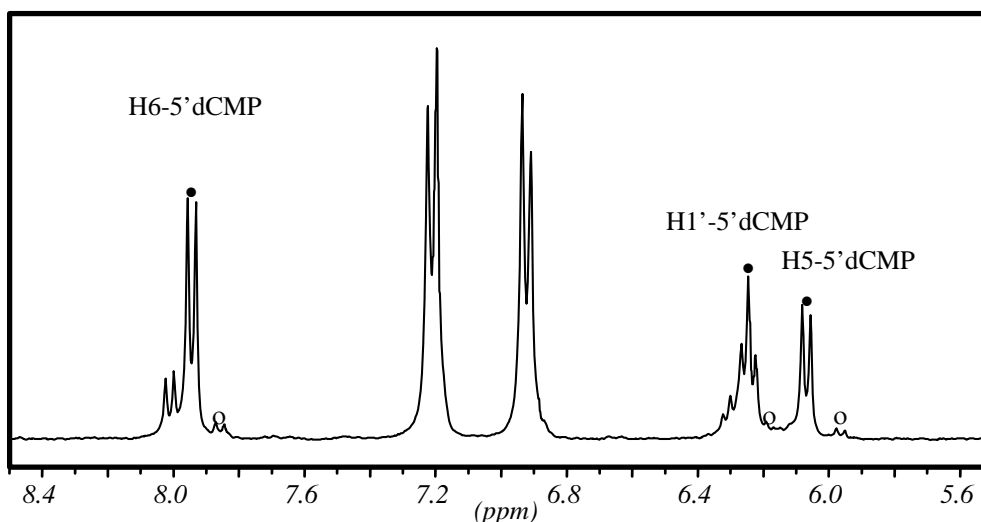


Abb. 41 : ¹H-NMR-Spektrum von Pd(TyrLys)(5'dCMP) in D₂O bei einem pD-Wert von 5.4 in einer Pufferlösung aus 100mM NaClO₄, 10 mM Mg(ClO₄)₂ und 50 mM NaH₂PO₄ [• Pd(TyrLys)(5'dCMP-N3) **16**, o {Pd(TyrLys)}₂(5'dCMP-N3/N4) **17**, 5'dCMP]

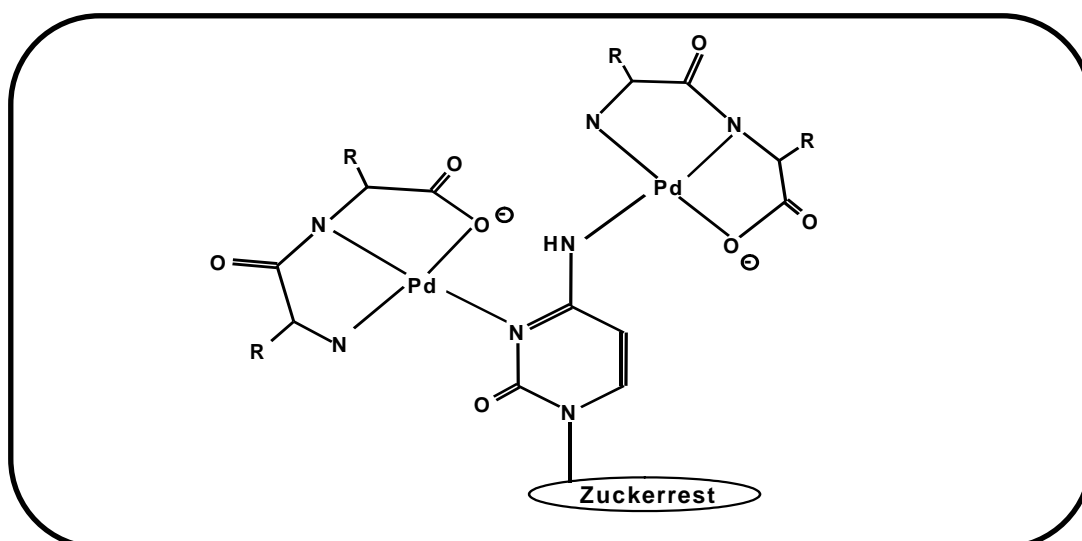


Abb. 42. : Strukturvorschlag für den $\{[\text{Pd}(\text{TyrLys})]\}_2(5'\text{dCMP-N3/N4})$ (**17**)

Abhängigkeit der chemischen Verschiebungen dieser Resonanzen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt, daß der pK_a -Wert der Phosphatdeprotonierung des 5'dCMP ca. 5.78 beträgt und aufgrund der höheren Acidität durch die Palladium-Koordination um 0.46 pH-Einheiten unter dem des freien Liganden liegt. Bei dem Hauptprodukt ($\delta = 7.94$ ppm) ist durch die Koordination am Palladiumzentrum für H6 des 5'dCMP eine Tieffeldverschiebung ($\Delta\delta = 0.02$ ppm), für H5 eine Hochfeldverschiebung ($\Delta\delta = -0.02$ ppm) gegenüber dem freien 5'dCMP zu beobachten. Es kann also auf die Bildung von $\text{Pd}(\text{TyrLys})(5'\text{dCMP-N3})$ (**16**) geschlossen werden. Eine Tieffeldverschiebung für die H6-Resonanz ist charakteristisch für eine N3-Koordination der Cytosinbase[151, 154, 157]. Die unterschiedliche Verschiebung der aromatischen Resonanzen könnte durch Ring-Ring-Wechselwirkungen, wie sie bei der Röntgenstruktur eines Tyrosin-Cytidin-Palladium-Komplexes gefunden wurden[154(a)], oder durch intramolekulare Ligand-Ligand-Wechselwirkungen erklärt werden. Das am stärksten hochfeldverschobene Signal kann einem N3, N4-koodinierten Komplex (**17**) zugeordnet werden (Abb. 42). In diesem pD-Bereich wird bereits der verbrückte Komplex beobachtet. Bei der Metallkoordination über die exocyclische Aminogruppe N4 unter Deprotonierung werden die Cytosinresonanzen aufgrund der negativen Ladung im Heterocyclus im Vergleich zu einem Proton zu hohem Feld verschoben ($\Delta\delta = -0.15$ ppm für H6 und -0.11 ppm für H5). Allerdings erschwert die Möglichkeit der Protonierung an N3 die Interpretation.

Eine Rotationsisomerie des Produktes um die Pd-N3-Bindung ist denkbar[151, 154, 157], was mit Hilfe einer temperaturabhängigen $^1\text{H-NMR}$ -Messung untersucht werden kann. Da im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei 368 K noch zwei Signalsets der Produkte

vorhanden sind, kann man daraus schließen, daß eine Rotationsisomerie nicht vorliegt. Mit sinkender Temperatur verliert die Resonanz des Hauptproduktes für H6-5'dCMP sehr wenig an Intensitäten, und scharfe Signale werden noch bei 268 K beobachtet. Diese beiden Beobachtungen sprechen dafür, daß eine Rotation um die Pd-N3-Bindung nicht erfolgt, vermutlich aufgrund der sterisch anspruchsvollen Seitenketten des Dipeptides und des Zucker-Phosphat-Restes von 5'dCMP. Molekülmodelle zeigen, daß der intramolekulare Abstand zwischen koordiniertem TyrLys und 5'dCMP kürzer als der zwischen TyrLys und 5'dGMP im Komplex (7) ist, so daß die Hinderung einer Rotation um die Pd-N3-Bindung stärker als die um Pd-N7-Bindung ist. (Siehe die Diskussion im Kap. II 3.1.1.4)

Der bevorzugte Koordinationsort eines Metallelektrophils ist die N3-Position von 5'dCMP, da sie einen pK_a Wert von 4.5 besitzt und im schwach Sauren deprotoniert vorliegt. Infolge dieser Pd-Koordination an die N3-Position von 5'dCMP wird generell der pK_a -Wert der N4-Position um durchschnittlich 1.5 bis 2 log-Einheiten auf ≈ 14.5 gesenkt[157]. Wie man aus dem pK_a -Wert erkennen kann, sollte die Metallkoordination am N4-Stickstoff theoretisch erst bei stark basischem pD möglich sein. Sie wird aber in bestimmten Beispielen bereits in mäßig saurem Milieu beobachtet[151(a)-(c), 157(a), (b)]. Dennoch findet man sowohl für Pd als auch für Pt Beispiele verbrückender Koordination[151(a)-(e), 157(a)-(e)]. Neben der N3, N4-Chelatkomplexbildung[151(f)] ist auch die einzähnige N4-Koordination beschrieben worden[151(g), (h)]. Weiterhin sind auch Beispiele für eine Metallkoordination am exocyclischen Sauerstoff O2 bekannt[151(i)]. Mit zunehmenden pD-Werten könnten auch N3/N4-verbrückte und N4-koordinierte Spezies als Folgeprodukte gebildet werden. Bei den hier durchgeführten Umsetzungen tritt bereits im schwach sauren Milieu das N3/N4-verbrückte Produkt auf (oben beschrieben). Im Gegensatz zur Umsetzung mit GlyLys bzw. LysGly bleibt mit steigendem pD-Wert das Intensitätsverhältnis der beiden Produktsignalsets von 1:0.1 unverändert, und bis pD 8.0 wird kein N4-koordinierter Komplex ausgebildet.

3.2.1.2. Zuordnung der Protonenresonanzen anhand zweidimensionaler NMR-Spektroskopie

Die getroffene Zuordnung der aufgespaltenen aromatischen Signale von Pd(TyrLys)(5'dCMP-N3) wird auch durch ein 2D- ^1H -DQF-COSY- und ein ROESY-Spektrum bestätigt. In diesen Spektren treten die H5- und H1'- Resonanzen auf, die eine gleiche Reihenfolge wie die der chemischen Verschiebung von H6-Resonanzen zeigen.

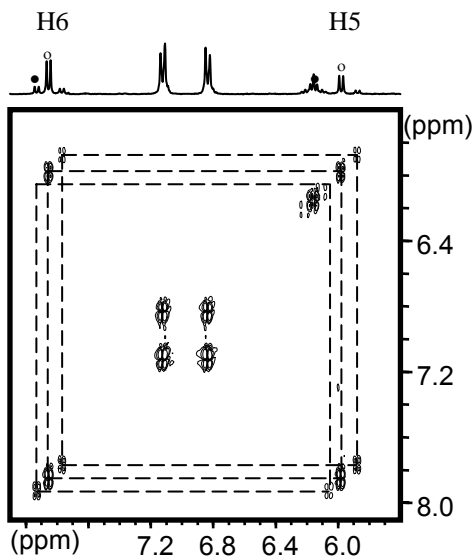


Abb. 43 : Ausschnitt des DQF-COSY-Spektrums von Pd(TyrLys)(5'dCMP) in D₂O bei einem pD-Wert von 5.1 und einer Pufferlösung aus 100 mM NaClO₄, 10 mM Mg(ClO₄)₂ und 50 mM NaH₂PO₄. Bereich der H6/H5-Protonen des 5'dCMP. Die Kopplungen zwischen den Protonen des H6 und H5 sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet. [○ Pd(TyrLys)(5'dCMP-N3), {Pd(TyrLys)}₂(5'dCMP-N3/N4), ● 5'dCMP]

Abb. 43 zeigt die Kopplungen zwischen den Protonen des H6 und H5 der jeweiligen Verbindungen im DQF-COSY, wobei skalare Kopplungen über Bindungen sichtbar sind. Darüber hinaus können durch ein ROESY-Spektrum, das die räumliche Nähe zweier Protonen nachweist, H1'-Resonanzen der jeweiligen Verbindungen zugeordnet werden (Abb. 44).

Nachdem die Resonanzen der aromatischen- und H1'-Protonen identifiziert sind, erfolgt die Zuordnung der übrigen Protonenresonanzen mit Hilfe eines DQF-COSY-, TOCSY-, ROESY-Spektrums (Abb.45). Die aliphatischen Protonenresonanzen des TyrLys verschieben sich nach Koordinierung von 5'dCMP im Vergleich zur Ausgangsverbindung nur wenig zum Tieffeld. Hingegen werden für die aliphatischen

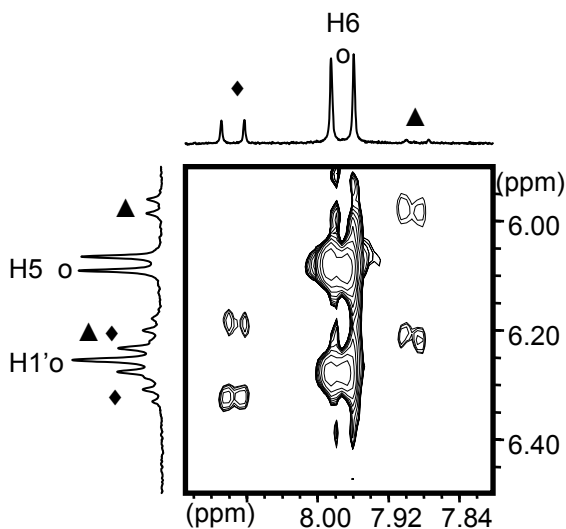


Abb. 44 : Ausschnitt des ¹H-ROESY-Spektrums von Pd(TyrLys)(5'dCMP) in D₂O bei einem pD-Wert von 5.1, 278 K, in einer Pufferlösung aus 100 mM NaClO₄, 10 mM Mg(ClO₄)₂ und 50 mM NaH₂PO₄ im Bereich der H6/H5 und H6/H1' protonen des 5'dCMP. [○ Pd(TyrLys)(5'dCMP-N3), ▲ {Pd(TyrLys)}₂(5'dCMP-N3/N4), ◆ 5'dCMP]

Tab. 11 : Chemische Verschiebungen (ppm) des Produktes Pd(TyrLys) (5'dCMP-N3) (**16**) bei pD 5.9 in D₂O. In Klammern sind die Multiplizität der Protonenresonanzen und die Wechselwirkungsshifts infolge der Koordination von Palladium an N3 bei gleichem pD-Wert angegeben.

Zuordnung	δ	Zuordnung	δ
H5	6.08(d; -0.02)	α -CH-Tyr	3.84(t; 0.07)
H6	8.00(d; 0.02)	β -CH ₂ -Tyr	2.95(qd; 0.04)
H1'	6.25(t; -0.07)	2, 6H-Tyr	7.21(d; 0.01)
H2'	2.29(m; -0.03)	3, 5H-Tyr	6.92(d; 0.01)
H2''	2.44(dd; 0.04)	α -CH-Lys	4.18(m; 0.05)
H3'	4.52(t; -0.03)	β -CH ₂ -Lys	1.78(md; 0.01)
H4'	4.19(m; 0.01)	γ -CH ₂ -Lys	1.20(m; 0.00)
H5'/H5''	4.01(m; -0.04)	δ -CH ₂ -Lys	1.54(md; 0.00)
		ϵ -CH ₂ -Lys	2.99(t; 0.00)

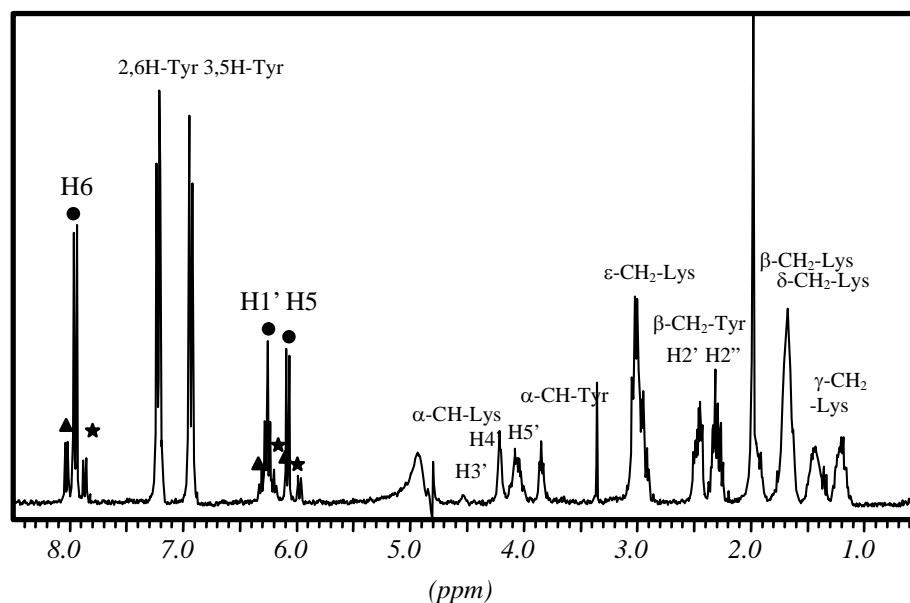
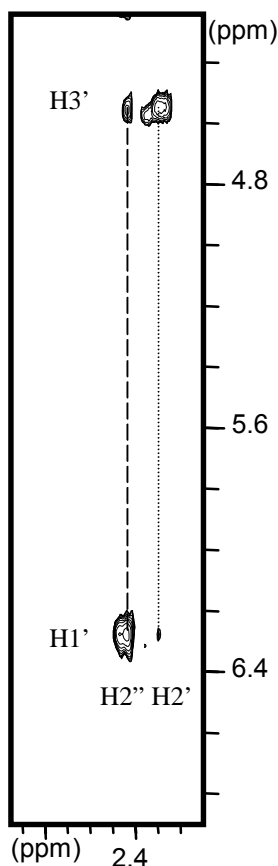


Abb. 45 : ¹H-NMR-Spektrum von Pd(TyrLys)(5'dCMP) (**16**) in D₂O bei einem pD-Wert von 6.8. [• Pd(TyrLys)(5'dCMP-N3), {Pd(TyrLys)}₂(5'dCMP-N3/N4), ▲ 5'dCMP]

Zuckerresonanzen leichte Hochfeldverschiebungen beobachtet, die möglicherweise auf den Einfluß des abschirmenden Ringstromeffekts des Phenylrings des Tyrosinrestes zurückzuführen sind [84-88].

Im 1D- ^1H -NMR-Spektrum ist die H3'-Resonanz mit dem HDO-Signal überlagert, kann aber mit Hilfe eines 2D-Spektrums leicht identifiziert und zugeordnet werden. Die



H5'- und H5''-Resonanzen sind degeneriert. Bei pD 5.1 erkennt man im ROESY-Spektrum von **(16)** starke Crosspeaks von H3' zu H2'' und von H1' zu H2', die deutlich intensiver sind als die zu anderen geminalen Protonen (Abb. 46). Beide Beobachtungen beweisen, daß im Gegensatz zum ternären Komplex mit 5'dGMP die H2'-Protonen des 5'dCMP hochfeldverschoben zu H2'' auftreten, welche unter Berücksichtigung der im Kap. II 3.1.1.2 beschriebenen Kriterien eindeutig zugeordnet werden können [83, 87].

Mit Hilfe unterschiedlicher 2D- ^1H -NMR-Techniken ist es möglich, alle Protonen in **(16)** zu identifizieren. In Tab. 11 sind die ^1H -NMR chemischen Verschiebungen von **(16)** angegeben, sowie die Multiplizität der Protonenresonanzen und die Wechselwirkungsshifts infolge der Koordination von Palladium an N3 bei konstantem pD-Wert. Bei schwach sauren pD-Werten kann bereits der N3, N4-verbrückte Komplex **(17)** gebildet werden. Im nicht-aromatischen Teil des ^1H -NMR-Spektrums zeigen sich aber gegenüber dem aromatischen keine Aufspaltungen der Protonensignale für die einzelnen Spezies (Abb. 44).

Abb. 46 : Ausschnitt des ^1H -NOESY-Spektrums von Pd(TyrLys)(5'dCMP-N3) **(16)** in D_2O bei einem pD-Wert von 5.1 und einer Pufferlösung aus 100 mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ in 50 mM NaH_2PO_4 im Bereich der H2'/H2'' und H1'/H3'-Protonen.

3.2.1.3. Konformationsanalyse des koordinierten 5'dCMP-Liganden.

Mit der im Kap. II 3.1.1.3 beschriebenen Methode kann die Konformation des koordinierten 5'dCMP analysiert werden. Im DQF-COSY Spektrum des Pd(TyrLys)(5'dCMP) (**16**) ist deutlich zu erkennen, daß die Kopplung des H1'- zum H2''-Proton stärker ausgeprägt ist als die zu H2' und daß die Kopplung des H3'- zum H2'-Proton schwach hervortritt, während die zum H2''-Proton fast gar nicht zu beobachten ist. Für die nicht überlagerten Crosspeaks zwischen H1' und H2'/H2'' können im einzelnen Kopplungskonstanten 6.77 für ${}^3J_{1'2'}$ und 6.25 Hz für ${}^3J_{1'2''}$ bestimmt werden. Wenn ${}^3J_{1'2'}$ größer als ${}^3J_{1'2''}$ ist, wird bei einer Wellungsamplitude von 36° bis 44° der Pseudorotationswinkel auf den Bereich von $90^\circ < P < 198^\circ$ eingeschränkt. (Abb. 29 (c)) [162-164]. Außerdem werden die Werte für ${}^3J_{2'3'}$, ${}^3J_{2''3'}$ und ${}^3J_{3'4'}$ aus der Summe der Kopplungskonstanten wie $\Sigma 2'$, $\Sigma 2''$, bzw. $\Sigma 3'$ (z. B. $\Sigma 2' = {}^3J_{1'2'} + {}^3J_{2'3'} + {}^3J_{2''3'}$) gewonnen, die man aus der Differenz zwischen den äußeren Linien jeder Resonanz erhalten kann. Die erhaltenen Kopplungskonstanten ${}^3J_{2'3'}$, ${}^3J_{2''3'}$ und ${}^3J_{3'4'}$ betragen 6.11, 3.82 und 5.95 Hz. Die Kopplungskonstante des H1' zu H2'' ist größer als die des H2' zu H3', was auf den Pseudorotationswinkel des Zuckerrings zwischen 144° und 252° deutet. Damit ergibt sich der mögliche endocyclische Torsionswinkel für die Konformation des Zuckerrings zu $144^\circ < P < 198^\circ$. Ein Vergleich der Kopplungskonstanten ${}^3J_{2''3'}$ mit ${}^3J_{3'4'}$ führt zu einer weiteren Eingrenzung des Pseudorotationswinkels ($36^\circ < P < 162^\circ$), so daß hier die Zuckerkonformation im Bereich von $144^\circ < P < 162^\circ$ liegt. Hieraus ist zu schließen, daß der Pseudorotationswinkel für den Zuckerring des 5'dCMP im Bereich von $144^\circ < P < 162^\circ$ liegt.

Diese Interpretation wird durch die Analyse des 2D- ${}^1\text{H}$ -ROESY-Spektrums von Komplex (**16**) unterstützt. Für die quantitative Auswertung wurde ein ${}^1\text{H}$ -ROESY-Spektrum von Komplex (**16**) mit einer Mischzeit von 150 ms in D_2O bei pD 5.1, 268 K in einer Pufferlösung aus 100mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 aufgenommen (wie bereits in Kap. II 3.1.1.3 beschrieben wurde). In diesem Spektrum wird der Crosspeak des H4'-Protons zum H2''-Proton intensitätsschwach beobachtet, während der zum H1' mittelstark ausgebildet ist. Die aus diesen Crosspeaks umgerechneten Protonenabstände betragen 3.14 und 2.74 Å (Tab. 12). Das bedeutet, daß der Zuckerring des 5'dCMP in einer S-Konformation vorliegt[85, 162, 165]. Dieses Ergebnis und dazu die oben erhaltene Pseudorotationswinkel aus dem DQF-COSY-Spektrum lassen auf eine C2'-endo (S-Typ) ähnliche Zuckerwellung für das N3-koordinierte 5'dCMP in (**16**) schließen.

Tab. 12 : Die aus dem ROESY-Spektrum ermittelten Abstände der Zuckerprotonen von 5'dCMP in Pd(TyrLys)(5'dCMP-N3) (**16**)

Proton1 ↔ Proton2	Abstände (Å)	Proton1 ↔ Proton2	Abstände(Å)
H6 ↔ H5	2.50	H1' ↔ H4'	2.74
H6 ↔ H1'	2.57	H3' ↔ H2'	2.30
H6 ↔ H2'	2.45	H3' ↔ H2''	2.79
H6 ↔ H3'	2.81	H3' ↔ H4'	2.47
H6 ↔ H4'	3.56	H4' ↔ H2''	3.13
H1' ↔ H2'	3.10	H2' ↔ H2''	1.80
H1' ↔ H2''	2.18		

Daneben sind die Intensitäten der Crosspeaks der aromatischen Protonen zu den Zuckerprotonen an C1' und C2' im ¹H-ROESY-Spektrum ein Indiz für die Basenkonformation relativ zum Zuckerring[85, 162, 165]. Bei S-Konformation ist eine *syn-anti*-Rotation um die glycosidische Bindung mit einer Verkürzung des Abstandes zwischen H6 ↔ H2' sowie einer Verlängerung von H6 ↔ H1' verbunden (In Abb. 28 verdeutlicht), so daß in einer *anti*-Konformation mit S-Typ der Abstand der Basenprotonen zum H2'-Proton kleiner wird (kleinster Abstand in dieser Anordnung) wird, dafür aber der zum H1' größer wird als in einer *syn*-Konformation von S-Typ. Bei pD 5.1 sind die Crosspeaks von H8 zu H2' im ROESY-Spektrum von (**16**) deutlich intensiver als jene zu H1' und H3', während kein Crosspeak von H8 zu H2'' beobachtet wird (Tab. 12). Diese Beobachtungen beweisen, daß die N3-koordinierte Cytosinbase des 5'dCMP in (**16**) eine *anti*-Konformation relativ zum Zuckerring mit S-Typ einnimmt.

Zusammenfassend läßt sich also für das koordinierte 5'dCMP in (**16**) eine *anti*-Konformation mit C2'-*endo* (S-Typ) ähnlicher Zuckerwellung ableiten. Eine ähnliche Zuckerkonformation wird auch in der Röntgenstrukturanalyse des Pd(GlyTyr)(Cyd) (P = 160.9°, τ_m = 38.1°, Torsionswinkel χ(O₄-C₁'-N₁-C₆) = 47.4°) sowie in anderen Lösungsstudien von Nucleinsäuren beobachtet[154(a), 157(f)-(h)].

3.2.1.4. Untersuchung der räumlichen Anordnung der koordinierten Liganden im ternären Komplex

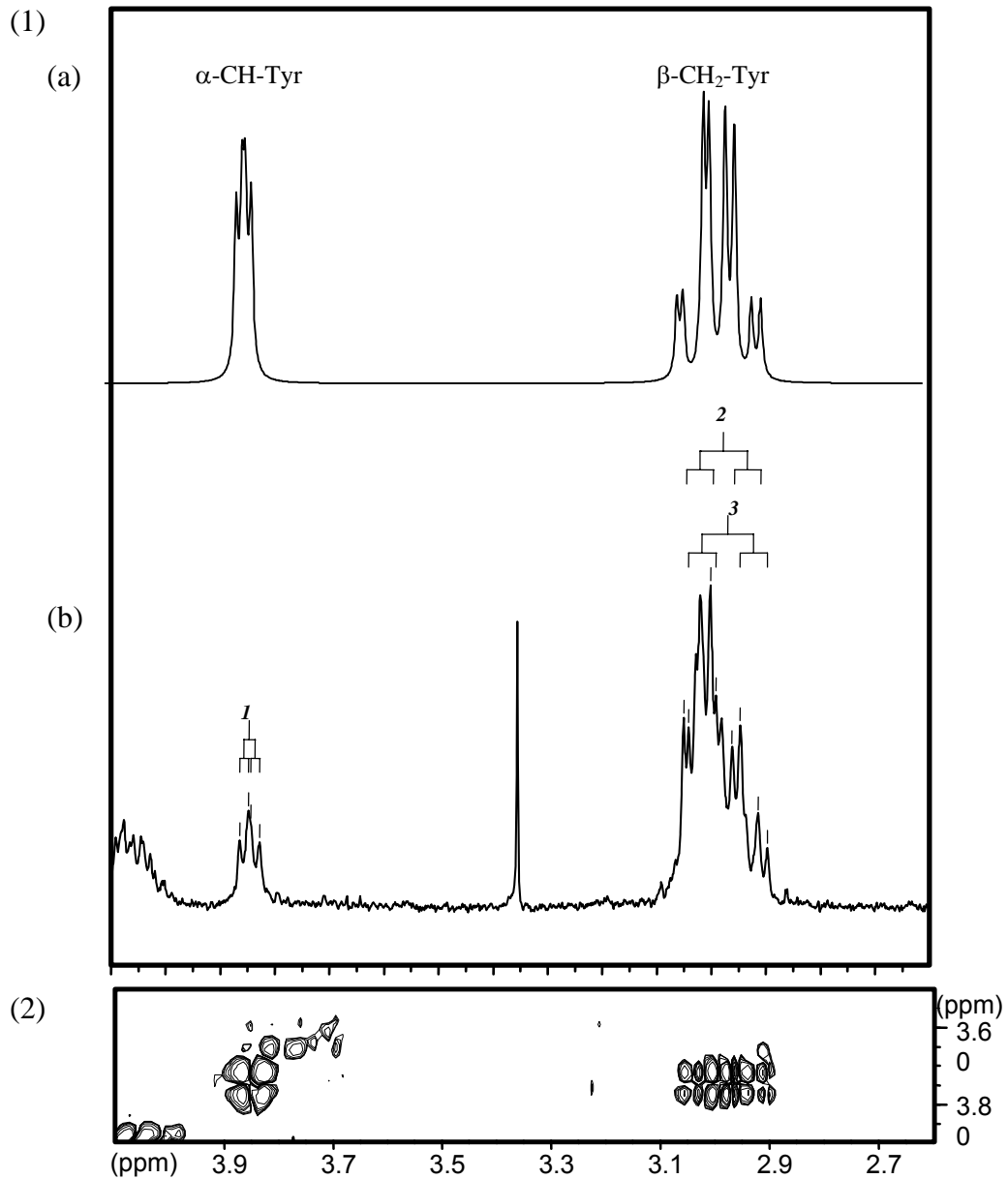


Abb.47 : (1) Gegenüberstellung von Ausschnitten aus den ^1H -NMR-Spektren von (**16**) bei pD 5.7 in D_2O .
 (a) experimentell bestimmtes Spektrum
 (b) simuliertes Spektrum (nur ABX-Spinsystem von $\text{C}_\alpha\text{H}-\text{C}_\beta\text{H}_2$ des Tyrosinrestes)
 (2) Ausschnitt des DQF-COSY-Spektrums von $\text{C}_\alpha\text{H}-\text{C}_\beta\text{H}_2$ des Tyrosinrestes

Zur weiteren Strukturaufklärung sollte die räumliche Anordnung der koordinierten Liganden im ternären Komplex (**16**) analysiert werden. Um die Konformation der Seitenketten eines koordinierten Dipeptids zu analysieren, sollte man zuerst die Kopplungskonstanten um die C_α — C_β -Bindung der Seitenketten des Dipeptids bestimmen[103-109]. Im 1D- ^1H -NMR-Spektrum sind die Protonresonanzen des β - CH_2 -Tyr- mit dem ε - CH_2 -Lys-Signal überlagert. Erst durch ein DQF-COSY-Spektrum wird eine sichere Zuordnung des β - CH_2 -Tyr-Signals möglich. Anschließend kann man die Kopplungskonstanten durch Spektrensimulation ermitteln. Für die Spektrensimulation wird das Programm Win-DAISY (Version 4.0) und gNMR verwendet[89]. Die Methin- und Methylenprotonen des Tyrosinrestes erzeugen wieder eine ABX-Aufspaltung. Abb. 47 zeigt den Ausschnitt des DQF-COSY-Spektrums von (**16**) im Bereich der β - CH_2 - und α -CH-Protonen des Tyrosinrestes. Das experimentell ermittelte 1D- ^1H -NMR-Spektrum wird dem simulierten im selben Bereich gegenübergestellt. Eine gute Übereinstimmung ist erkennbar. Die durch die Spektrensimulation erhaltenen Kopplungskonstanten $^3J_{\text{AX}}$ und $^3J_{\text{BX}}$ betragen 3.29 und 4.75 Hz für die Seitenkette des Tyrosinrestes bei pD = 5.1. Die berechnete Konformation der Seitenkette weist demnach einen Rotamer h-Anteil von 70.3 % für den Tyrosinrest auf. Das Methinproton des Lysinrestes bildet den X-Teil eines ABX-Systems und ruft ein Triplett bei $\delta = 4.18$ ppm ($^3J_{\text{av}} = 7.81$ Hz bei pD 5.1) hervor. Die berechnete Konformation dieser Seitenkette weist demnach einen Rotamer h-Anteil von 72.4 % und einen (g + t)-Anteil von 27.6 % auf. Die beiden Seitenketten des TyrLys liegen überwiegend oberhalb der Koordinationsebene des Chelatkomplexes (**16**) vor. Tab. 13 gibt die durch eine Spektrensimulation erhaltenen Kopplungskonstanten von $C_\alpha\text{H}$ - $C_\beta\text{H}_2$ des Tyrosinrestes und die Kopplungskonstanten von $C_\alpha\text{H}$ - $C_\beta\text{H}_2$ des Lysinrestes an, mit denen die Populationen der Rotameren für die Seitenketten bestimmt werden. Der Chloroligand

Tab. 13 : Kopplungskonstanten (durch Spektrensimulation ermittelt), und Rotamerenverteilung um C_α — C_β -Bindung der Seitenkette vom Dipeptid in Pd(TyrLys)(5'dCMP-N3) (**16**) in D_2O bei pD 5.1 und einer Pufferlösung aus 100 mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 .

Seitenkette von	3J (Hz)		Rotamerenverteilung(%)		
	$^3J_{\text{AX}}$	$^3J_{\text{BX}}$	h	G	t
Tyrosinrest	3.29	4.75	70.2	8.2	21.6
Lysinrest	7.81($^3J_{\text{av}}$)		72.4	27.6(g + t)	

im Komplex (1) wird gegen N3-Stickstoffatome des 5'dCMP ersetzt und dabei kann der Rotamer g und t gegenüber dem Rotamer h auf Grund sterischer Hinderung begünstigt werden. Im Vergleich zum binären Komplex (1) steigt aber der h-Anteil für den Tyrosinrest um 29.3 % durch Koordination des 5'dCMP, und der h-Anteil des Lysinrest

bleibt nahezu unverändert. Diese Tatsache läßt sich so erklären, daß die koordinierten Liganden elektrostatische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Seitenketten des Dipeptids und der 5'dCMP-Nucleobase eingehen, so daß Rotamer h stabilisiert wird.

Diese Interpretation wird durch die Analyse des 2D-¹H-ROESY-Spektrums vom Komplex (16) unterstützt. Befinden sich Protonen des Dipeptids, insbesondere die der beiden Seitenketten, in diesem Komplex in räumlicher Nähe, sollten Crosspeaks im Spektrum erscheinen. Abb. 48 zeigt einen Ausschnitt des ¹H-ROESY-Spektrums von (16) in D₂O bei pD 5.1, 268 K in einer Pufferlösung aus 100 mM NaClO₄, 10 mM Mg(ClO₄)₂ und 50 mM NaH₂PO₄ im Bereich der 2,6H- und 3,5H-Protonen des Tyr/Lysinrestes. Im Gegensatz zum binären Komplex

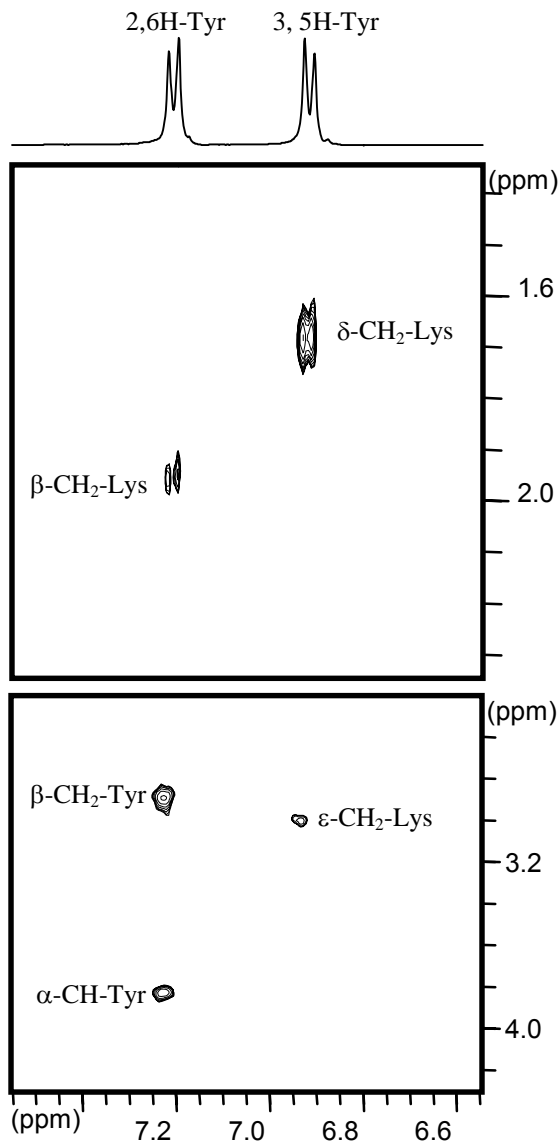


Abb. 48 : Ausschnitt des ¹H-ROESY-Spektrums von Pd(Tyr-Lys)(5'dCMP-N3) (16) in D₂O bei pD 5.1, 268 K in einer Pufferlösung aus 100 mM NaClO₄, 10 mM Mg(ClO₄)₂ und 50 mM NaH₂PO₄. Der Bereich der 2,6H- und 3,5H-Protonen des Tyrosinrestes/Protonen des Lysinrestes ist gezeigt.

(1) sind die Crosspeaks zwischen 3,5H-Tyr und δ -CH₂-Lys bzw. ϵ -CH₂-Lys Protonen, und zwischen 2,6H-Tyr und β -CH₂-Lys deutlich zu erkennen. Dieses Signal ist ein entscheidender Hinweis dafür, daß die beiden Seitenketten des TyrLys weitgehend als h Rotamere vorliegen und sich oberhalb der Koordinationsebene des Chelatkomplexes besonders nahe kommen. Da in der resultierenden Struktur elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Phosphatgruppe des 5'dCMP und der positiv geladenen Seitenkette des Lysinrestes sowie Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Seitenkette des Tyrosinrestes und der Cytosinbase möglich sind, werden die Protonenabstände zwischen den Seitenketten kürzer als im binären Komplex. Damit erscheinen Crosspeaks im ROESY-Spektrum.

Das 2D-¹H-ROESY-Spektrum kann weitere Informationen über die Anordnung der Liganden im Komplex (16) liefern. Wie bei 5'dGMP in Komplex (7) gibt es zwei bevorzugte Anordnungen des 5'dCMP-Liganden in Komplex (16). Bei der *syn*-Konformation befindet sich die exocyclische NH₂-Gruppe der Cytosinbase auf derselben Seite der Koordinationsebene des Metalls wie die Seitenketten des Dipeptids. In der zweiten Struktur (*anti*-Anordnung) nimmt der O2-Sauerstoff die Position der NH₂-Gruppe ein. Da im ROESY-Spektrum kein Crosspeak zwischen TyrLys und 5'dCMP auftritt, ist unklar, in welcher Anordnung sich der koordinierte 5'dCMP-Ligand relativ zur Koordinationsebene des Chelatkomplexes befindet. Allerdings wäre auch eine schnelle Rotation um die Pd-N3-Bindung prinzipiell denkbar [84, 151, 156(c), 157]. Temperaturabhängige ¹H-NMR-Messungen belegen aber, daß keine Rotation um die Pd-N3-Bindung erfolgt (im Kap. II 3.2.1.1. wurde darüber diskutiert), wobei nur das *syn*-Konformer durch intramolekulare Wechselwirkungen zwischen exocyclischer Aminogruppe und Seitenketten des TyrLys sowie zwischen dem Zucker-Phosphatrest und der koordinierten α -Aminogruppe stabilisiert werden könnte. Molekulardynamische Berechnungen haben gezeigt, daß die Hinderung der Rotation um die Pd-N3-Achse durch den sterisch anspruchsvollen Zucker-Phosphatrest von 5'dCMP, durch die exocyclische Aminogruppe von diesem, wie auch durch die Seitenkette des Peptids beeinflußt wird. Die entscheidende Rotationsbarriere um die Pd-N3-Achse ist demnach größer als die um die Pd-N7-Bindung des 5'dGMP-Liganden. In der Röntgenstrukturanalyse des Pd(GlyTyr)(Cyd) wurde eine *syn*-Konformation des Cytidins gefunden, obwohl keine Wechselwirkungen zwischen Liganden vorliegen [154(a)]. Um die Abwesenheit von Rotationsisomeren und eine Stabilisierung der *syn*-Konformation in Pd(TyrLys)(5'CMP-N3) (16) zu erklären, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Eine Konformationsanalyse des koordinierten 5'dCMP-Liganden sowie qualitative Auswertung des ROESY-Spektrums führt zur Annahme, daß 5'dCMP eine *syn*-Konformation relativ zur Metallkoordinationsebene sowie *anti*-Konformation in Bezug auf die glycosidische Bindung mit C2'-*endo* ähnlicher Zuckerwellung aufweist (Abb. 49). Die exocyclische Aminogruppe N4 der 5'dCMP-Base liegt hierbei auf derselben Seite der Metall-Koordinationssebene wie die Seitenketten des koordinierten TyrLys-Dipetides.

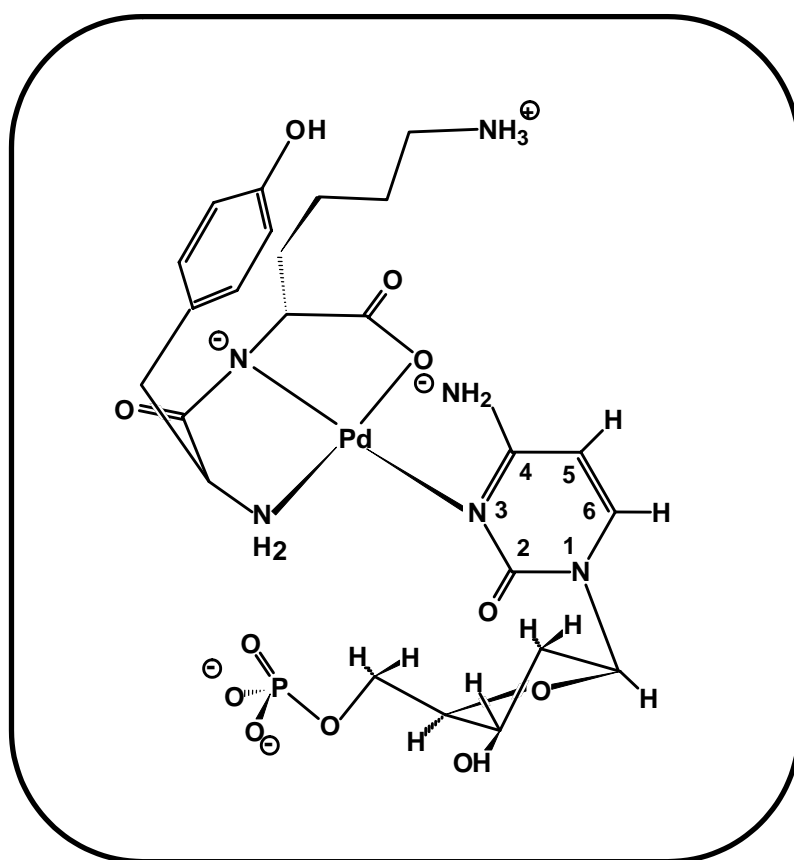


Abb. 49 : Strukturvorschlag für Pd(TyrLys)(5'dCMP-N3) (16)

3.2.2. Charakterisierung von Pd(Gly-L-Lys)(5'dCMP)

Bei der Umsetzung von Pd(GlyLys)Cl (**3**) mit 5'dCMP im schwach sauren pH-Bereich wird der Chloroligand durch 5'dCMP substituiert. Bei dieser Umsetzung zeigt der binäre Komplex Pd(GlyLys)Cl (**3**) im Vergleich zu Pd(TyrLys)Cl (**1**) einige Unterschiede im Reaktionsverhalten. Im aromatischen Bereich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums treten bei einer 1:1-Stöchiometrie drei verschiedene Signalsets auf. Im Bereich der H6-Resonanzen des 5'dCMP können neben dem Signalset für die freien Liganden ($\delta = 7.98$) lediglich zwei Signalsets unterschieden werden ($\delta = 8.01$ und 7.91 ppm bei pD 6.1). Durch die Senkung des pD-Wertes von 7.0 auf 4.0 verschieben sich die H5- und H6-Resonanzen von freiem 5'dCMP aufgrund der N3-Protonierung zu tiefem Feld, während die entsprechenden Produktsignale aufgrund der Phosphatprotonierung einer Hochfeldverschiebung ($\Delta\delta = -0.08$ ppm) unterliegen[151,154,157]. Die pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung dieser Resonanzen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt, daß der pK_a -Wert der Phosphatdeprotonierung des 5'dCMP ca. 5.77 beträgt und aufgrund der höheren Acidität durch die Palladiumkoordination um 0.47 pH-Einheiten unter dem des freien Liganden liegt.

Bei dem Hauptprodukt ($\delta = 8.01$ ppm) ist durch die Koordination an das Palladiumzentrum für H6 des 5'dCMP eine Tieffeldverschiebung ($\Delta\delta = 0.03$ ppm) zu

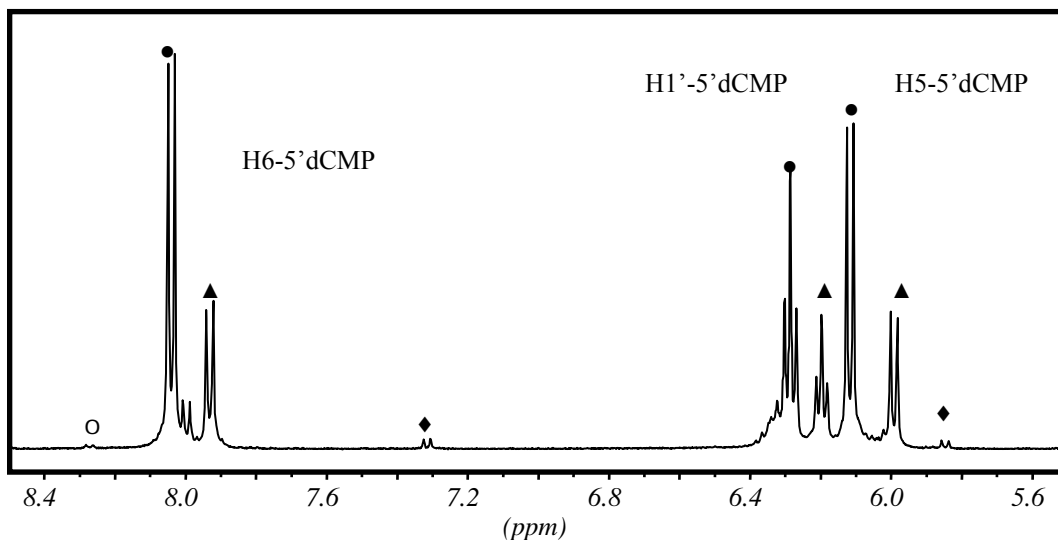


Abb. 50 : $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Pd(GlyLys)(5'dCMP) in D_2O bei einem pD-Wert von 6.7. [●, ○ die Rotamere von Pd(GlyLys)(5'dCMP-N3) **18**, ▲ {Pd(GlyLys)}₂(5'dCMP-N3/N4) **19**, ◆ Pd(GlyLys)(5'dCMP-N4) **20**, 5'dCMP]

beobachten. Hieraus kann auf die Bildung von Pd(GlyLys)(5'dCMP-N3) (**18**) geschlossen werden. Die Tieffeldverschiebung der H6-Resonanz ist charakteristisch für eine N3-Koordination der Cytosinbase [109]. Das am stärksten hochfeldverschobene Signal kann einem N3, N4-koodinierten Komplex (**19**) zugeordnet werden. Bei der Metallkoordination über die exocyclische Aminogruppe unter Deprotonierung werden die Cytosinresonanzen aufgrund des geringeren Elektronenzuges vom Pd(II) im Vergleich zu einem Proton zu höherem Feld verschoben ($\Delta\delta = -0.07$ ppm für H6 und -0.17 ppm für H5) [151, 154, 157]. Bei Umsetzung des binären Komplexes mit 5'dCMP ist der Anteil an einzähnigen bzw. verbrückten Komplexen abhängig vom pH-Wert und von der Stöchiometrie. Mit steigendem pD-Wert erhöht sich in einer Lösung von Pd(GlyLys)(5'dCMP-N3) (**18**) der Anteil an Pd(GlyLys)(5'dCMP-N3/N4) (**19**). Bei einem Ansatz mit dem stöchiometrischen Verhältnis Pd : 5'dCMP = 1:1 werden die Verbindungen N3, (N3, N4) Verhältnis 1 : 0.26 bei pD 3.9 und 1: 0.43 bei pD 6.7 erhalten. Prinzipiell wäre auch hier eine Rotationsisomerie des Produktes um die Pd-N3-Bindung denkbar [151, 154, 157]. Da beide Produkte ein ähnliches Verhalten in den temperaturabhängigen ^1H -NMR-Messungen zeigen, ist die Möglichkeit der Existenz einer Rotationsisomerie auch hier auszuschließen.

Nimmt man das ^1H -NMR-Spektrum bei pD 6.3 auf, so beobachtet man das Auftreten neuer Signale; im aromatischen Bereich entstehen zwei neue Signale ($\delta = 8.27$ und 7.29 ppm bei pD 6.3) (Abb. 50). Das ^1H -ROESY-Spektrum bei pD 6.3 (Abb. 51) zeigt einen breiten negativen Crosspeak (gleiches Vorzeichen wie Diagonalpeak) zwischen dem H8-Proton des neuen tieffeldverschobenen Signals und dem des Komplexes (**18**). Dieser Peak spiegelt nicht die räumliche Nähe zweier Protonen wider,

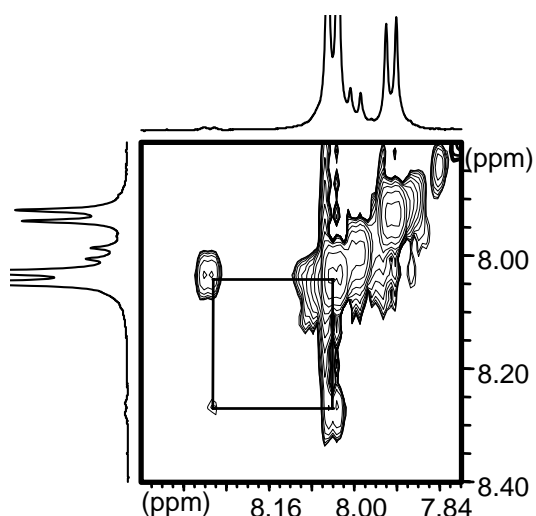
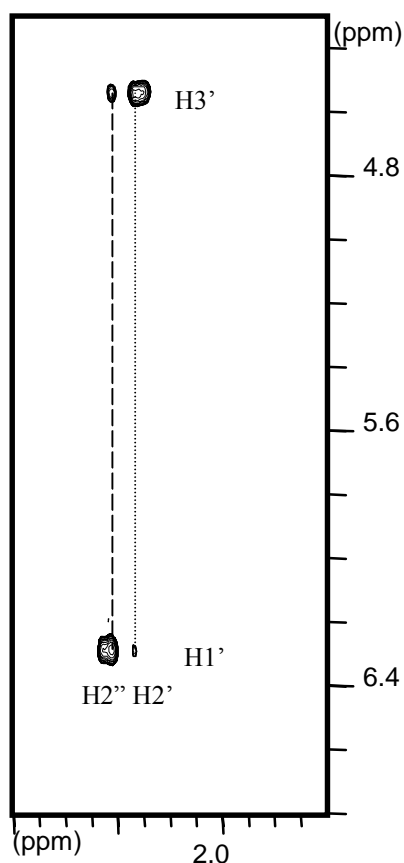


Abb. 51 : Ausschnitt des ^1H -ROESY-Spektrums von Pd(GlyLys)(5'dCMP-N3) (**18**) in D_2O bei einem pD-Wert von 5.1 in einer Pufferlösung aus 100 mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 im Bereich der H6-Protonen des 5'dCMP.

sondern einen Austauschmechanismus [83, 86]. Im ROESY-Spektrum ergibt der ROE-Effekt für Diagonal- und Crosspeaks ein entgegengesetztes Vorzeichen, während ein Austauschmechanismus immer ein gleiches Vorzeichen liefert. Das Zustandekommen der beschriebenen Crosspeaks ist Folge einer Rotationsisomerie, die durch die langsame Rotation um die Pd-N3-Bindung im Komplex (**18**) entsteht. Das andere neue, hochfeldverschobene Signal wird in Analogie zu ähnlichen Komplexen des 1-Methylcytosins [151(j)] einem N4-kooordinierten Komplex (**20**) zugeschrieben. Darüber hinaus mit steigendem pD-Wert wird eine Zunahme von Komplex (**20**) beobachtet.

Die getroffene Zuordnung der aromatischen Signale der Pd(GlyLys)(5'dCMP-N3) Spezies wird durch ein 2D-¹H-DQF-TOCSY- und ROESY-Spektrum bestätigt. Abb. 53



zeigt die Kopplungen zwischen des Protonen H6 und H5 der jeweiligen Verbindungen im TOCSY-Spektrum. Darüber hinaus können durch das ROESY-Spektrum H1'-Resonanzen für die jeweiligen Verbindungen zugeordnet werden (Abb. 54).

Nachdem die Resonanzen der aromatischen- und H1'-Protonen identifiziert sind, erfolgt die Zuordnung der übrigen Protonresonanzen mit Hilfe eines TOCSY-, ROESY-Spektrums. Bei pD 6.3 erkennt man im ROESY-Spektrum von (**18**) den starken Crosspeak von H3' zu H2'' und von H1' zu H2', der deutlich intensiver ist als der zum anderen geminalen Proton (Abb. 52). Beide Beobachtungen beweisen, daß im Gegensatz zum ternären Komplex mit 5'dGMP die H2'-Protonen des 5'dCMP hochfeldverschoben zu H2'' auftreten, welche unter Berücksichtigung der im Kap. II 3.1.1.2 beschriebenen Kriterien eindeutig zugeordnet werden können.

Abb. 52 : Ausschnitt des ¹H-NOESY-Spektrums von Pd(GlyLys)(5'dCMP-N3) (**18**) in D₂O bei einem pD-Wert von 5.1 in einer Pufferlösung aus 100 mM NaClO₄, 10 mM Mg(ClO₄)₂ und 50 mM NaH₂PO₄ im Bereich der H2'/H2'' und H1'/H3'-Protonen des 5'CMP.

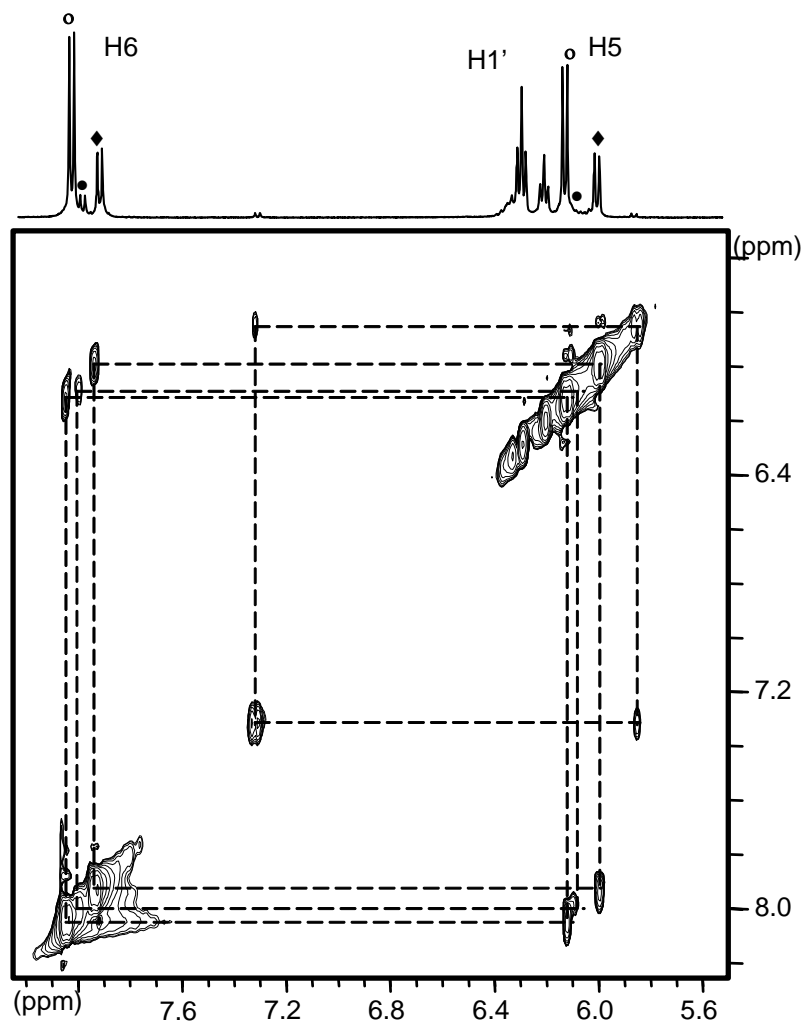


Abb. 53 : Ausschnitt des TOCSY-Spektrum von Pd(GlyLys)(5'dCMP) in D₂O bei einem pD-Wert von 6.3 in einer Pufferlösung aus 100mM NaClO₄, 10 mM Mg(ClO₄)₂ und 50 mM NaH₂PO₄. Bereich der H6/H5 des 5'dCMP. Die Kopplungen zwischen den Protonen des H6 und H5 sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet. [○ Pd(GlyLys)(5'dCMP-N3) **18**, ◆ Pd(GlyLys)(5'dCMP-N3/N4) **19**, Pd(GlyLys)(5'dCMP-N4) **20**, ● 5'dCMP]

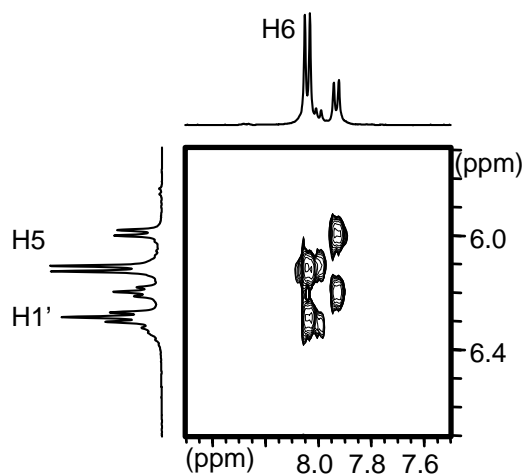


Abb. 54 : Ausschnitt des ¹H-ROESY-Spektrums von Pd(GlyLys)(5'dCMP) in D₂O bei einem pD-Wert von 5.1, 278 K in einer Pufferlösung aus 100mM NaClO₄, 10 mM Mg(ClO₄)₂ und 50 mM NaH₂PO₄. Bereich der H6/H5- und H6/H1'-Protonen des 5'dCMP.

Mit Hilfe unterschiedlicher 2D-¹H-NMR-Techniken ist es möglich, alle Protonen in (**18**) zu identifizieren. In Tab. 14 sind die chemischen Verschiebungen von (**18**) sowie die Multiplizitäten der Protonenresonanzen und die Wechselwirkungsshifts infolge der Koordination von Palladium an N3 bei gleichbleibendem pD-Wert im ¹H-NMR Spektrum angegeben. Bei schwach sauren pD-Werten kann auch schon der N3, N4-verbrückte Komplex (**19**) gebildet werden [151, 154, 157]. Im nicht-aromatischen Teil des ¹H-NMR-Spektrums zeigen sich auch wie im Aromatischen Aufspaltungen der Protonensignale, besonders die der α-CH₂-Gly-Protonen und der ε- CH₂-Lys-Protonen (δ = 3.50 ppm für α-CH₂-Gly und 3.00 ppm für ε- CH₂-Lys).

Tab. 14 : Chemische Verschiebungen (ppm) des Produktes Pd(GlyLys) (5'dCMP-N3) (**18**) bei pD 6.3 in D₂O. In Klammern sind die Multiplizitäten der Protonenresonanzen und die Wechselwirkungsshifts infolge der Koordination von Palladium an N7 bei gleichbleibendem pH-Wert angegeben.

Zuordnung	δ	Zuordnung	δ
H5	6.10(d; 0.00)	H5'/H5''	4.03 (m; -0.04)
H6	8.01(d; 0.03)	α-CH ₂ -Gly	3.56(t; 0.16)
H1'	6.29(t;-0.03)	α-CH-Lys	4.17(m; 0.14)
H2'	2.32(m; -0.01)	β-CH ₂ -Lys	1.98(md; 0.11)
H2''	2.42(dd; 0.00)	γ- CH ₂ -Lys	1.78(m; 0.13)
H3'	4.53(t; -0.02)	δ- CH ₂ -Lys	1.57(md; 0.11)
H4'	4.19(m; -0.01)	ε- CH ₂ -Lys	3.07(t; 0.11)

Um die **Konformation des koordinierten 5'dCMP** zu analysieren, sollten vicinale Kopplungskonstanten aus den ¹H-NMR-Spektrum gewonnen werden. Die erhaltenen Kopplungskonstanten haben folgende Werte : ³J_{1'2'} = 7.30, ³J_{1'2''} = 6.02, ³J_{2'3'} = 6.00, ³J_{2''3'} = 4.01 und ³J_{3'4'} = 5.85 Hz. Bei der qualitativen Überlegung dieser Kopplungskonstanten zeigen die vicinalen Kopplungskonstanten des Zuckerprotons eine gleiche Tendenz wie die beim Pd(TyrLys)(5'dCMP) (**16**), damit wird der Pseudorotationswinkel für den Zuckerring des 5'dCMP auf den Bereich von 144° < P < 162° eingeschränkt. Diese Interpretation wird durch eine Analyse des 2D-¹H-ROESY-Spektrums von Komplex (**18**) unterstützt. Die Resonanzen des N3-koordinierten Komplexes (**18**) sind mit denen des N3, N4-koordinierten Komplexes (**19**) überlagert, so daß die quantitative Auswertung des ¹H-ROESY-Spektrums nicht sinnvoll ist. In

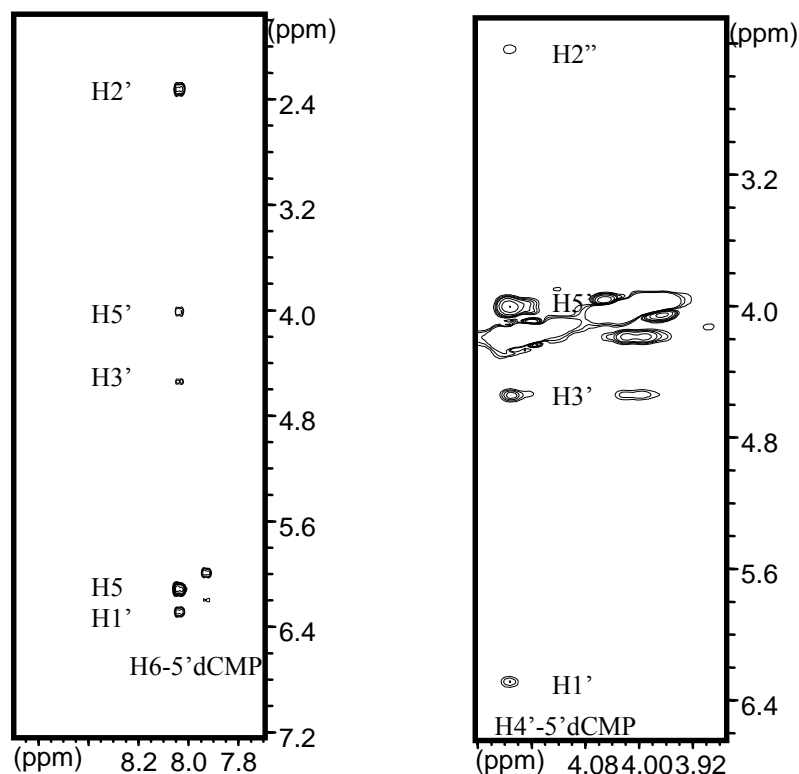


Abb. 55 : Ausschnitt des ^1H -ROESY-Spektrums von $\text{Pd}(\text{GlyLys})(5'\text{dCMP-N3})$ (**18**) in D_2O bei pD 6.3, 268 K und einer Pufferlösung aus 100mM NaClO_4 , 10 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 . Bereich der 6H- und H4'-Proton/Zuckerprotonen.

diesem Spektrum wird der Crosspeak des H4'-Proton zum H2'' intensitätsschwach beobachtet, während der zum H1' mittelstarke ROEs ausbildet (Abb. 55). Das bedeutet, daß der Zuckerring des 5'dCMP in einer S-Konformation liegt. Dieses Ergebnis und dazu die oben erhaltenen Pseudorotationswinkel aus dem ^1H -NMR-Spektrum lassen auf eine C2'-endo (S-Typ) ähnliche Zuckerwellung für das N3-kordinierte 5'dCMP in (**18**) schließen.

Daneben sind die Intensitäten der Crosspeaks der aromatischen Protonen zu den Zuckerprotonen an C1' und C2' im ^1H -ROESY-Spektrum ein Indiz für **die Basenkonformation relativ zum Zuckerring** [85, 162, 165]. Bei S-Konformation ist eine *syn-anti*-Rotation um die glycosidische Bindung mit einer Verkürzung des Abstandes zwischen H6 und H2' sowie mit einer Verlängerung des H6 und H1' verbunden (In Abb. 28 verdeutlicht), so daß in einer *anti*-Konformation mit S-Typ der Abstand der Basen-Protonen zum H2'-Proton kleiner (der kleinste Abstand in dieser Anordnung) wird. Hingegen wird der Abstand zum H1' größer als der in einer *syn*-

Konformation mit S-Typ. Bei pD 6.3 weisen die Crosspeaks von H8 zu H2' im ROESY-Spektrum von **(18)** deutlich eine Stärke auf, die intensiver sind als der Crosspeak zu H1' und H3', während kein Crosspeak von H8 zu H2'' sichtbar ist (Tab. 14). Diese Befunde beweisen, daß die N3-koodinierte Cytosinbase des 5'dCMP in **(18)** eine *anti*-Konformation relativ zum Zuckerring mit S-Typ einnimmt. Zusammenfassend, und unter Einbeziehung anderer Hinweise wie der quantitativen und qualitativen Überlegungen zu vicinalen Kopplungskonstanten aus dem ¹H-NMR-Spektrum sowie der ROE-Intensitäten, läßt sich für das koodinierte 5'dCMP in **(18)** eine *anti*-Konformation mit C2'-*endo* (S-Typ) ähnlicher Zuckerwellung wie die in Pd(TyrLys)(5'dCMP) ableiten.

Das ROESY-Spektrum kann weitere Informationen über **die Anordnung des koodinierten 5'dCMP zu der Koordinationsebene des Chelatkomplexes** liefern. Wenn die Protonen des GlyLys und 5'dCMP sich in räumlicher Nähe sich befinden, sollten Crosspeaks im Spektrum erscheinen. Im ROESY-Spektrum von **(18)** sind wie in dem des Pd(GlyLys)(5'dGMP) keine Crosspeaks zwischen Seitenketten des Lysinreste und 5'dCMP zu sehen. Eine Tieffeldverschiebung für die aliphatischen Protonresonanzen der GlyLys-Liganden ($\Delta\delta = 0.11 \sim 0.16$ ppm) deutet hingegen auf die Wechselwirkungen zwischen koodinierten Liganden hin. Die erhöhte Acidität der Phosphatgruppe könnte einen anderen Hinweis auf die elektrostatischen Wechselwirkungen bzw. die Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Phosphatgruppen des 5'dCMP und Seitenketten des Lysinrestes sowie den koodinierten α -Aminogruppen geben.

Nur in der in Abb. 33 dargestellten *anti*-Anordnung des 5'dCMP befindet sich die Phosphatgruppe auf derselben Seite der Koordinationsebene vom Chelatkomplex wie die Seitenkette des Lysinrestes, und damit kann sich diese intramolekulare Wechselwirkung aufbauen.

Schließlich läßt sich für 5'dCMP eine *syn*-Konformation zur Metallkoodinationsebene und *anti*-Konformation in Bezug auf die glycosidische Bindung mit S-Typ Zuckerwellung ableiten, wobei sich der Zuckerrest des 5'dCMP auf derselben Seite der Koordinationsebene vom Chelatkomplex wie die Seitenkette des koodinierten GlyLys befindet.

Kapitel III. Binäre Palladium(II)-Komplexe mit Oligopeptiden

1. Darstellung und Charakterisierung des Pd(II)-Komplexes mit L-Arg-L-Lys-L-Asp

1.1. Einführung

Thymopoietin ist ein aus den 49 Aminosäuren bestehendes Hormon der Thymusdrüse [167]. Dieses Hormon ist notwendig für das Immunsystem. Kurze synthetische Segmente einschließlich *Thymopentin* (TP5, ArgLysAspValTyr, die Sequenz im 32-36 Aminosäure-Bereich des natürlich vorkommenden Polypeptids), *Thymocartin* (TP4, ArgLysAspVal) und *Thynotrinan* (TP3, ArgLysAsp) zeigen ähnliche biologische Aktivität [168(a)-(c)]. Das deutet darauf hin, daß diese Fragmente ähnliche Konformationen wie die des aktiven Zentrums des *Thymopoietin* aufweisen. Die Koordinationschemie von TP5, TP4 und TP3 mit verschiedenen Übergangsmetallen [168(d)-(g)] und Lanthaniden [168(h)-(i)] wurde untersucht.

Bei dem Tripeptid L-Arg-L-Lys-L-Asp (TP3) handelt es sich um das einfachste synthetische Segment von *Thymopoietin* (Abb. 56). Die Seitenketten des Lysin- sowie des Argininrestes sind insofern interessant, als die positiv geladenen Aminosäure-Seitenketten mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA ionische Wechselwirkungen eingehen können [22-24, 43]. Die β -Carboxylatgruppe der Asparaginsäure ist auch deshalb bemerkenswert, weil eine Amiddeprotonierung oder Koordinierung der benachbarten α -Carboxylatgruppe durch Koordination der β -Carboxylatgruppe verhindert werden kann [58,63,76] (Abb. 4), wenn Asparaginsäure die zweite oder dritte Position des Aminoterminus von Oligopeptiden einnimmt. Mit diesen Oligopeptiden wurden Reaktionen von Übergangsmetallen bisher nur mittels potentiometrischer Titrations untersucht [168(d)-(g)]. NMR-spektroskopische Studien hierzu liegen nicht vor. Nachfolgend soll der Pd(II)-Komplex von TP3 in wässriger Lösung mittels NMR-Spektroskopie und ESI-Massenspektroskopie näher untersucht werden.

1.2. Der Ligand L-Arg-L-Lys-L-Asp (TP3)

¹H-NMR-spektroskopische Charakterisierung

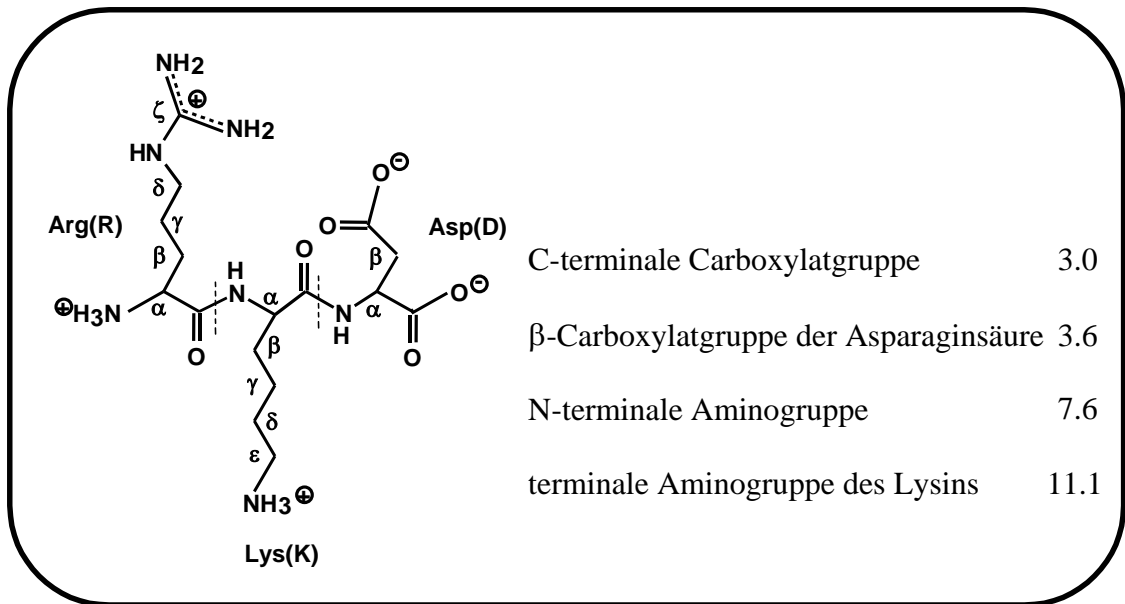


Abb. 56 : Strukturformel von ArgLysAsp (TP3) und pK_a -Werte.

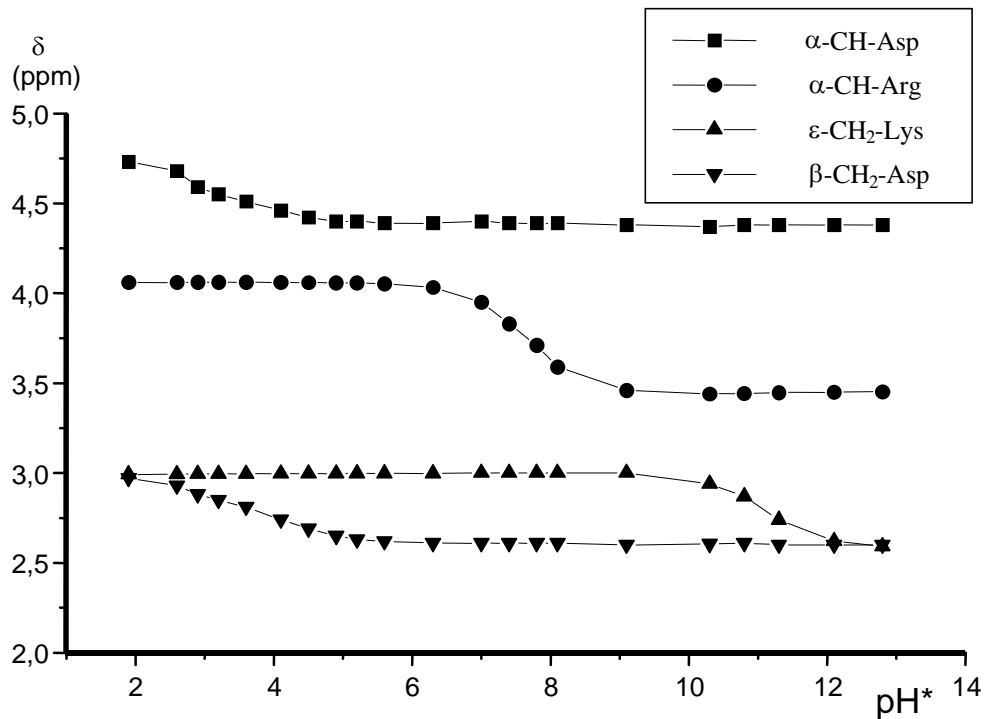


Abb. 57 : pH^* -abhängige Auftragung der 1H -NMR- chemischen Verschiebungen der unterschiedlichen Resonanzen von ArgLysAsp.

Das $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ des TP3 in D_2O zeigt in schwach saurem Milieu ($\text{pD} = 5.6$), in dem das Tripeptid als Zwitterion vorliegt, für $\alpha\text{-CH-Arg}$ ein Triplet bei $\delta = 4.06$ ppm. Das Methinproton des Argininrestes bildet, bedingt durch das Chiralitätszentrum am α -Kohlenstoff, den X-Teil eines ABX-Systems [84, 87, 88]. Dieses scheinbare Triplet des Methinprotons entsteht durch vicinale Kopplung ($^3J_{\text{av}} = 13.4$ Hz) mit den nicht-äquivalenten Methylenprotonen. Bei Erhöhung des pD-Wertes führt die Deprotonierung der α -Aminogruppe zu einem Hochfeldshift des Signals ($\Delta\delta = -0.62$ ppm). Die Methylenprotonen des Argininrestes, mit Ausnahme der $\delta\text{-CH}_2$ -Protonen, erzeugen weiterhin durch Kopplung mit den sie umgebenden Protonen zwei Multipletts ($\delta(\beta\text{-CH}_2) = 1.65$ und $\delta(\gamma\text{-CH}_2) = 1.60$ ppm). Im 1D- $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ sind diese Resonanzen mit dem Signal des Lysinrestes überlagert, können aber mit Hilfe eines DQF-COSY- und TOCSY-Spektrums leicht zugeordnet werden. Die $\delta\text{-CH}_2$ -Protonen bilden ein Triplet bei $\delta = 3.22$ ppm, welches durch die Spin-Spin-Wechselwirkung mit der $\gamma\text{-CH}_2$ -Gruppe entsteht. Wie der Argininrest erzeugt auch das Methinproton des Lysinrestes ein Triplet bei $\delta = 4.42$ ppm ($^3J_{\text{av}} = 14.6$ Hz). Die Methylenprotonen der Lysinseitenkette, mit Ausnahme der $\varepsilon\text{-CH}_2$ -Protonen, ergeben drei Multipletts ($\delta(\beta\text{-CH}_2) = 1.84$, $\delta(\gamma\text{-CH}_2) = 1.42$, und $\delta(\delta\text{-CH}_2) = 1.73$ ppm), und die $\varepsilon\text{-CH}_2$ -Protonen bilden ein Triplet bei $\delta = 2.99$ ppm. Die Methin- und Methylenprotonen des Asparaginsäurerestes zeigen, bedingt durch das chirale α -Kohlenstoff-Atom, eine ABX-Aufspaltung [84, 87, 88]. Das Triplet des Methinprotons entsteht durch vicinale Kopplung ($^3J_{\text{AX}} = 3.93$ $^3J_{\text{BX}} = 9.10$ Hz) und mit den beiden nicht-äquivalenten Methylenprotonen. Neben der vicinalen Kopplung mit dem Methinproton koppeln die $\beta\text{-CH}_2\text{-Asp}$ -Protonen auch geminal miteinander ($^3J_{\text{AB}} = 15.7$ Hz); dadurch spalten die Signale der Methylenprotonen in acht Linien auf. Bei Erhöhung des pD-Wertes führt die Deprotonierung der Carboxylatgruppe zu einem Hochfeldshift der beiden Signale ($\Delta\delta = -0.34$ ppm für $\alpha\text{-CH-Asp}$ und $\Delta\delta = -0.36$ ppm für $\beta\text{-CH}_2\text{-Asp}$).

In Abb. 57 sind die chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale in Abhängigkeit vom pH^* -Wert aufgetragen. Diese Auftragung weist auf mehrere Protonierungsgleichgewichte in Lösung hin, aus denen die pK_a -Werte nachfolgender Gleichgewichte bestimmt werden: 3.00 für die C-terminale Carboxylatgruppe, 3.6 für die β -Carboxylatgruppe des Asparaginsäurerestes, 7.6 für die α -Aminogruppe und 11.1 für die ε -Aminogruppe des Lysinrestes (Abb. 56). Der Amidstickstoff wird erst im stark basischen Milieu mit einem $\text{pK}_a \sim 15.2$ deprotoniert [64].

Zur weiteren Strukturaufklärung werden die Konformationen der Seitenketten des Tripeptids analysiert, die durch den Diederwinkel um die $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ -Bindung bestimmt

sind, wie in Kap. I bereits dargelegt wurde. Die aus vicinalen Kopplungskonstanten berechnete Konformation der Seitenketten bei pD 5.6 weist einen h-Anteil von 18.3 % für den Argininrest, 7.3 % für den Lysinrest und 18.1 % für den Asparaginsäurerest auf. Bei Erhöhung des pD-Wertes erfolgt Deprotonierung sowohl der Carbonsäure als auch der Aminogruppe. Der Einfluß der Protonierung/Deprotonierung der Carbonsäure bzw. Aminofunktion auf die Populationen der drei Rotameren ist allerdings gering.

Weitere Indizien für die Struktur des TP3 sollen in Wasser aufgenommene ^1H -NMR- und ein 2D-TOCSY-Spektren liefern. Im nächsten Abschnitt werden wir dies diskutieren.

1.3. Pd-Komplex

1.3.1. ^1H -NMR-spektroskopische Charakterisierung

Die Darstellung des binären Komplexes erfolgt durch die äquimolare Umsetzung von K_2PdCl_4 mit dem Tripeptid. Die Umsetzung wird bei einem pH von 4.0 und Raumtemperatur in Wasser durchgeführt. Der pD-Wert fällt während der Reaktion, was auf eine Koordination des Dipeptids unter Deprotonierung hinweist. Der absinkende pD-Wert wird so lange mit KOD reguliert, bis die pD-Wert-Konstanz das Ende der Reaktion anzeigt.

Der Chelateffekt bewirkt bei der Reaktion eine Deprotonierung des Amidstickstoffs bereits im stark sauren pH-Bereich (ca. pD 2) [58, 60, 64]. Das Reaktionsprodukt mit Pd(II) ist durch ein neues Triplett des α -CH-Arg-Protons im ^1H -NMR-Spektrum gekennzeichnet, welches gegenüber dem Signal des Eduktes bei pD = 5.6 um 0.51 ppm

Tab. 15 : Chemische Verschiebungen (ppm) des Produktes Pd(ArgLysAsp) (**21**) bei pD 5.6 in D_2O . In Klammern sind die Multiplizitäten der Protonenresonanzen und die Differenz der chemischen Verschiebungen infolge der Koordination von Palladium bei gleichem pD-Wert angegeben.

Zuordnung	δ	Zuordnung	δ
α -CH-Arg	3.55(m; -0.51)	α -CH-Lys	4.14(t; -0.29)
δ -CH ₂ -Arg	3.23(m; 0.01)	β -CH ₂ -Lys	1.82(md; -0.04)
α -CH-Asp	4.37(t; -0.03)	γ -CH ₂ -Lys	1.36(m; -0.09)
β -CH ₂ -Asp	2.75(qd; 0.12)	ε -CH ₂ -Lys	3.01(t; 0.01)

zu höherem Feld verschoben ist. Dies läßt auf eine Pd(II)-Koordination an der α -Aminogruppe schließen [60, 72]. Der X-Teil des ABX-Spinsystems zeigt eine Kopplungskonstante von ${}^3J_{av} = 7.7$ Hz, und die chemische Verschiebung des Protons liegt bei $\delta = 3.55$ ppm. Weiterhin entsteht für das β -CH₂-Asp ein neues Signal bei 2.75 ppm, welches relativ zum freien Liganden um 0.12 ppm tieffeldverschoben erscheint. Die Tieffeldverschiebung der β -CH₂-Asp-Protonen läßt auf eine Pd(II)-Koordination an die Carboxylatgruppe schließen, da die Elektronendichte an den β -CH₂-Asp-Protonen verringert wird [60, 63, 72, 76]. Hingegen erfährt die Resonanz des α -CH-Asp (${}^3J_{av} = 8.5$ Hz) eine sehr geringe Hochfeldverschiebung. Die elektronenziehende Wirkung der Metallkoordination an der β -Carboxylatgruppe wird hier vermutlich durch die Koordination des benachbarten Amidstickstoffs kompensiert. Weiterhin erscheint die Resonanz des α -CH-Lys bei 4.14 ppm (${}^3J_{av} = 7.5$ Hz), welche gegenüber dem Signal des Eduktes bei pD = 5.6 um 0.29 ppm zu höherem Feld verschoben ist. Dies deutet auf eine Pd(II)-Koordination am Amidstickstoff hin. TP3 fungiert somit als vierzähliger Ligand, wobei die Koordination über den α -Amino-, zwei Amidstickstoffe und der β -Carboxylatsauerstoff der Asparaginsäure unter Ausbildung von zwei fünf- und einen sechsgliedrigen Ring erfolgt (**21**). Dieses Koordinationsmuster des TP3 ist auch schon bei Cu(II) festgestellt worden [168(d)-(g)].

Die aus vicinalen Kopplungskonstanten berechnete Konformation der Seitenketten des an Pd koordinierten TP3 bei pD 5.6 weist einen h-Anteil von 70.6 % für den Argininrest, 72.5 % für den Lysinrest und 64.3 % für den Asparaginsäurerest auf. Wie im Fall anderer Metall-Peptid-Komplexe werden Änderungen der Seitenkettenkonformationen zugunsten des h-Rotamer auch bei der Palladiumkoordination von TP3 beobachtet, obwohl die Rotamere g und t bei

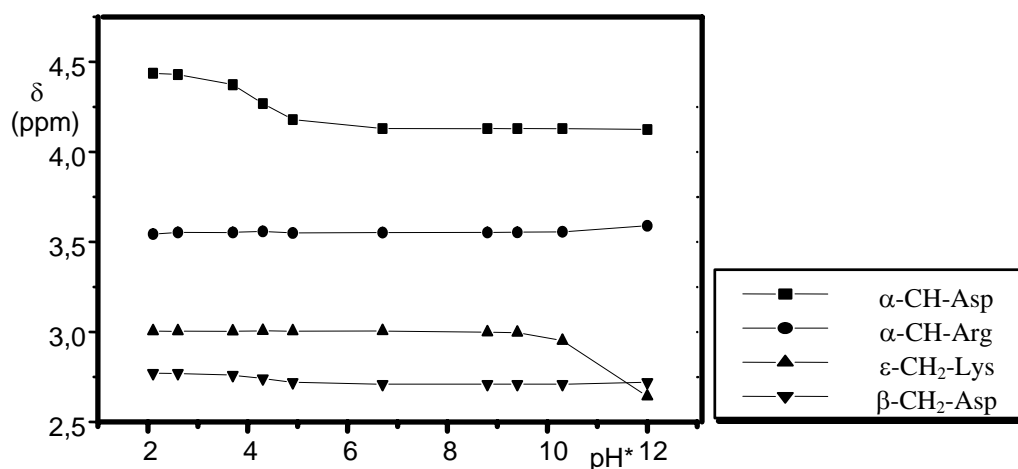


Abb. 58 : pH*-abhängige Auftragung der chemischen Verschiebungen der unterschiedlichen Resonanzen im ¹H-NMR-Spektrum von Pd(ArgLysAsp) (**21**).

Abwesenheit sterischer Hinderung in wäßriger Lösung bevorzugt sind. Im Vergleich zum freien Liganden steigt damit der h-Anteil für den Argininrest um 52.3 % (18.3 % Rotamer h-Anteil für den freien Liganden) und für den Lysinrest um 65.2 % (7.3 % Rotamer h-Anteil für den freien Liganden). Die Seitenketten des Argininrestes und Lysinrestes liegen überwiegend oberhalb der Koordinationsebene des Chelatkomplexes. Dies ist vermutlich auf die nachgewiesenen schwachen Wechselwirkung zwischen den Seitenketten des koordinierten Peptides und dem Metallion zurückzuführen [105-109].

Die Bildung eines entsprechenden Komplexes wird durch eine pH-Titration bestätigt. Wie die graphische Darstellung in Abb. 58 zeigt, erfährt das Signal des α -CH-Asp im saurem Milieu einen Tieffeldshift um 0.31 ppm, was auf die Protonierung der Carboxylatgruppe zurückgeführt werden kann. Der pK_a -Wert dieser funktionellen Gruppe erhöht sich um 1.6 Einheiten gegenüber dem freien Liganden ($pK_a = 4.4$). Dieses Verhalten steht mit einer Koordination des Palladiumelektrophils an die β -Carboxylatgruppe des Asparaginsäurerestes im Einklang, da durch induktive Effekte die Acidität der Gruppe erniedrigt werden kann (Ersatz eines Protons der Aminofunktion durch Palladium). Im Gegensatz zum freien Liganden ist für den Komplex mit einem über ein Sauerstoffatom der β -Carboxylatgruppe koordinierten Metall kein Sprungbereich der β -CH₂-Resonanzen zu detektieren. Die chemischen Verschiebungen bleiben bei den gewählten pH*-Werten nahezu unverändert, d. h. die α -Carboxylatfunktion ist nicht de- bzw. protonierbar. Die pD-Abhängigkeit zeigt auch, daß in diesem Komplex TP3 über den α -Aminostickstoff gebunden ist, da im schwach alkalischen Milieu keine zweite Deprotonierungsstufe beobachtet wird.

Weiterhin beweisen die in Wasser aufgenommenen ¹H-NMR- und 2D-TOCSY-Spektren eindeutig die Ausbildung eines vierzähligen Metall-Chelatkomplexes [85]. Gegenüber dem 1D-¹H-Spektrum in D₂O treten in 90% H₂O/10% D₂O neue Signale im Bereich 6 ppm bis 10 ppm auf (Abb. 60). Alle Amid- und Aminoprotonen sind sichtbar und können eindeutig durch die bei unterschiedlichen Mischzeiten aufgenommenen TOCSY-Spektren zugeordnet werden (Abb. 59). Kurze Zeiten (20-50 ms) liefern vorwiegend *cross-peaks* stark gekoppelter Protonen, während längeres Mischen (100-300 ms) den Magnetisierungstransfer zwischen entfernteren Protonen des Spinsystems begünstigt. Auf diese Weise können die Peptidprotonen, die zu den gleichen Aminosäureresten gehören, leicht identifiziert werden. Die breiten Diagonalpeaks gehören zur endständigen Aminogruppe des Lysinrestes und Argininrestes. Der rasche Protonenaustausch mit dem Wasser führt zu einer großen Signalverbreiterung.

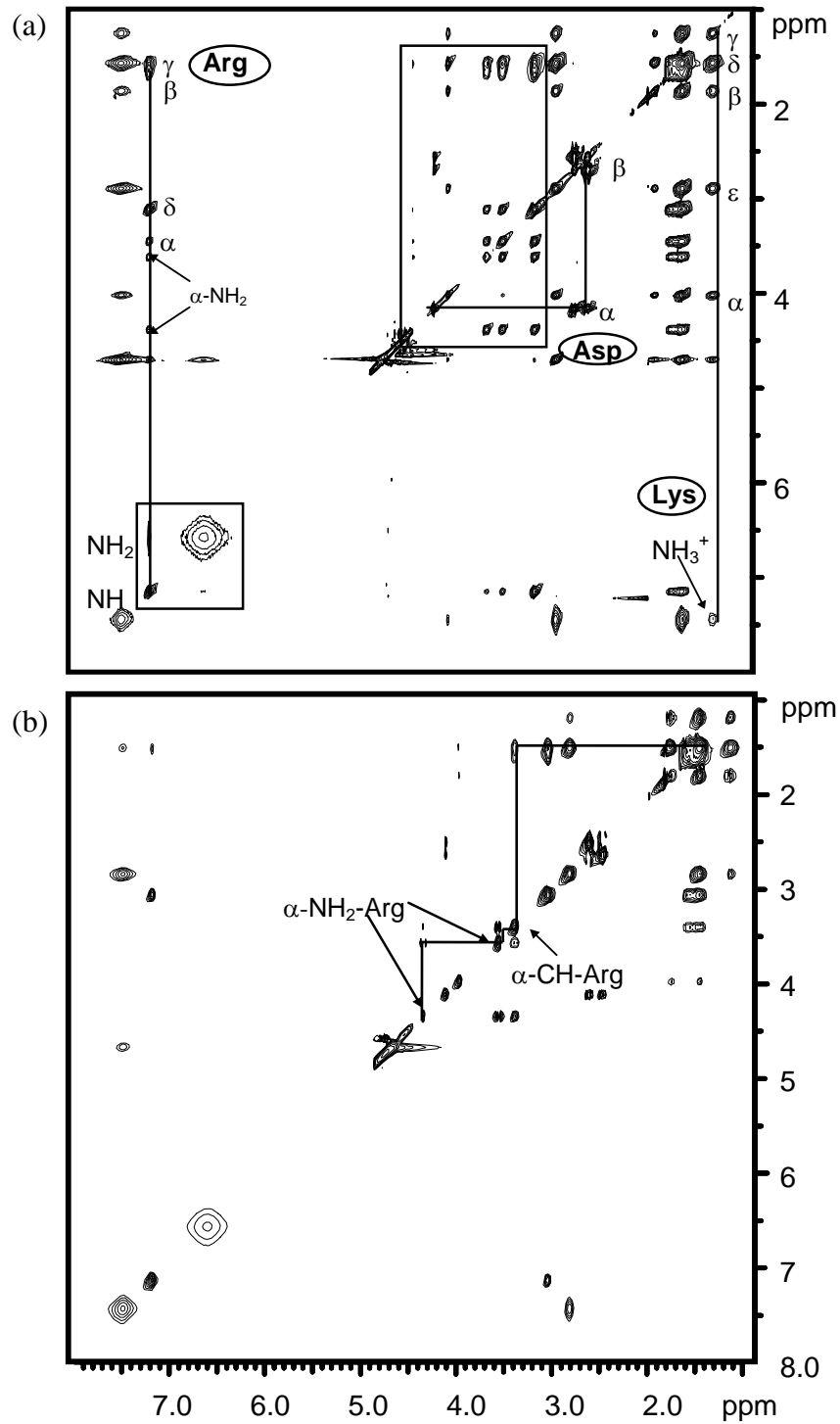


Abb. 59 : 2D- ^1H -TOCSY-Spektrum von Pd(ArgLysAsp) (**21**) in 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O bei pD 5.3. Mischzeiten sind (a) 200 msec (b) 20 msec

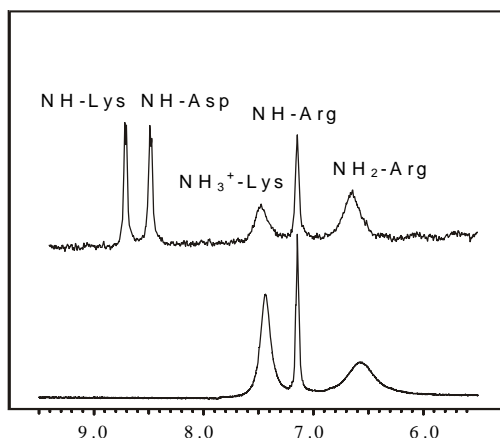


Abb. 60 : Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums von (a) ArgLysAsp (b) Pd(ArgLysAsp) (**21**) in 90% H_2O /10% D_2O bei pD 5.3.

Bemerkenswert ist, daß im Gegensatz zu freiem TP3 keine Resonanzen der Amidstickstoff-Protonen auftreten. Beim freien Liganden zeigen die Protonen der Amidstickstoffe des Lysinrestes und Asparaginsäurerestes aufgrund der langsameren Austauschrate mit Wasser relativ schmale Peaks, die zum Dublett aufgespalten sind (Kopplung mit dem C_αH). Die Abwesenheit dieser Resonanzen im Komplex (**21**) deutet darauf hin, daß diese Protonen abwesend sind und somit beide Amidstickstoffe an Palladium koordiniert sind. Weiterhin ist die Aufspaltung der beiden $\alpha\text{-NH}_2$ -Protonen des Argininrestes um $\Delta\delta = 0.95$ ppm auffällig. Im 1D- ^1H -NMR-Spektrum sind diese Resonanzen mit dem Wasser-Signal überlagert, können aber mit Hilfe der TOCSY-Spektren leicht zugeordnet werden. In dem mit einer Mischzeit von 20 msec aufgenommenem TOCSY-Spektrum werden die Kopplungen der $\alpha\text{-CH}$ - und $\alpha\text{-NH}_2$ -Protonen miteinander deutlich. Beide Protonen müssen eine unterschiedliche chemische Umgebung haben, die dadurch erklärt werden kann, daß durch die Koordination des Dipeptids an das Metallion die $\text{C}_\alpha\text{-N}$ -Bindung zur Koordinationsebene eine fixierte Position einnimmt und die Beweglichkeit der Seitenketten des Dipeptids um die $\text{C}_\alpha\text{-N}$ -Bindung abnimmt.

1.3.2 ESI-MS Spektrum

Neben der NMR-spektroskopischen Charakterisierung kann die Bildung des Komplexes (**21**) auch mittels der Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) nachgewiesen werden. Sie ist eine Weiterentwicklung der klassischen Elektronenstoßionisations-Massenspektrometrie. Die Verwendung einer Elektrospray-Quelle ermöglicht ein besonders schonendes Ionisierungs-Verfahren, so daß es möglich ist, überwiegend intakte Moleküle und auch hochmolekulare Verbindungen wie Salze, Metallkomplexe oder Biomoleküle nachzuweisen. Bei einer ausreichend hohen

Auflösung kann man eine charakteristische Feinstruktur, die eine Isotopenmuster des Metallkomplexes wiedergibt, anhand einzelner Linien beobachten. Bei Molekülen mit einer nicht zu großen Anzahl von Atomen kann eine Isotopenverteilung, wie z. B. bei Pd oder Pt, auch zur Identifizierung der Verbindung benutzt werden. Mit Hilfe eines Computerprogramms können die theoretischen und experimentell erhaltenen Isotopenmuster verglichen werden.

Der Molekülmassenpeak des Komplexes (**21**) ($m/z = 519.9$) ist das intensivste Signal im Spektrum und zeigt ein charakteristisches Isotopenmuster, das hauptsächlich durch die verschiedenen Isotope des Palladiums erzeugt wird. Abb. 61 zeigt die gute Übereinstimmung des experimentellen mit dem theoretisch berechneten Muster. Das Massenspektrum zeigen neben dem Molekülmassenpeak intensive Peaks der K^+ -Addukte monomerer Spezies. Auch für sie ist eine hohe Tendenz zur Assoziation in der Gasphase zu beobachten. Dementsprechend sind im höheren Massenbereich neben dem Dimerpeak bei m/z 1043.1 weitere Peaks eines K^+ -Addukts des Dimers ($m/z = 1078$) zu finden.

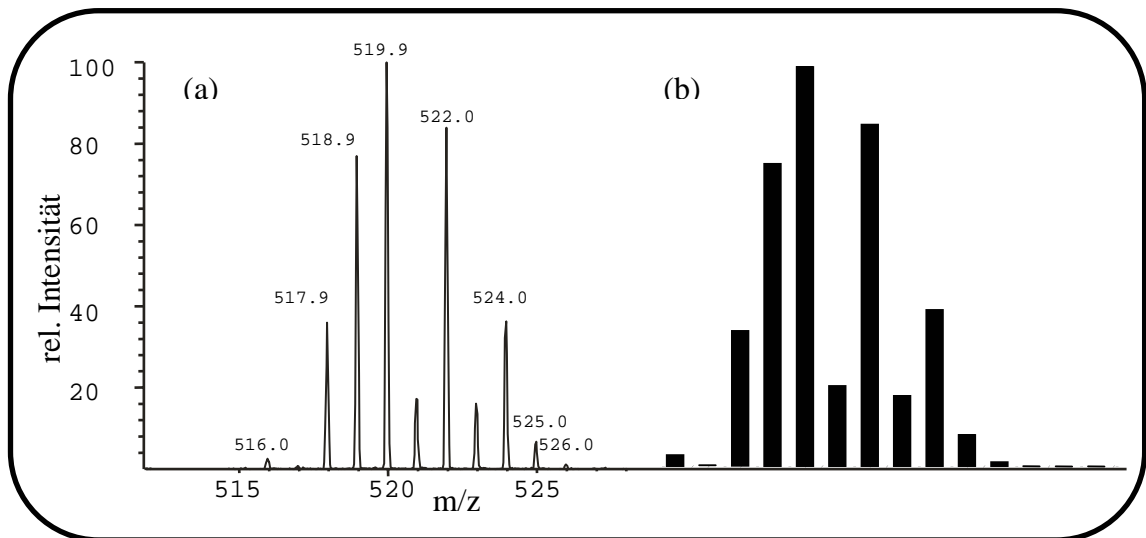


Abb. 61 : Ausschnitt des ESI-MS-Spektrums von Pd(ArgLysAsp) (**21**) im Bereich des Molekülmassenpeaks (a) im Vergleich zum theoretisch berechneten Spektrum des Palladiumkomplexes (b).

1.3.3. Zusammenfassung und Diskussion

Alle Untersuchungen sprechen dafür, daß das Tripeptid ArgLysAsp im Sauren mit dem Palladiumion ein vierzähliges Chelat bildet. Vier Koordinationsstellen werden

vom Tripeptid besetzt, welches über die α -Amino-, zwei Amid- und die β -Carboxylatgruppe der Asparaginsäure an das Metall unter Ausbildung von zwei fünf- sowie einen sechsgliedrigen Ring koordiniert ist. Dieses Koordinationsmuster des TP3 ist bisher nur durch potentiometrische Titrations bei Cu(II) festgestellt worden [168(d)-(g)]. Unter Einbeziehung anderer Hinweise wie der pH-abhängigen $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchungen sowie der in Wasser aufgenommenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren läßt sich für Pd(ArgLysAsp) (**21**) nachfolgender Strukturvorschlag und es lassen sich mögliche Protonierungs- und Deprotonierungsgleichgewichte ableiten (Abb.62).

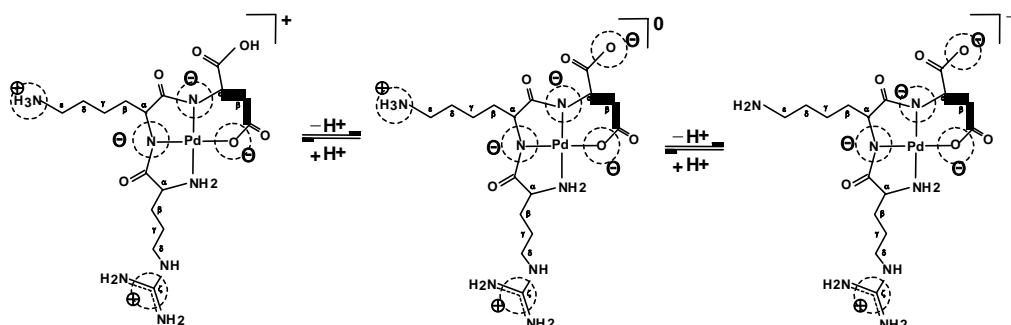


Abb. 62 : Strukturvorschlag und mögliche Protonierungs-Deprotonierungsgleichgewichte von Pd(ArgLysAsp) (**21**)

Durch Koordination an Pd(II) wird die Struktur von ArgLysAsp drastisch verändert. Trotz sterischer Hinderung nehmen gegenüber dem freien Liganden in **21** die Seitenketten des Argininrestes und Lysinrestes h-Konformationen ein und liegen überwiegend oberhalb der Koordinationsebene des Palladiums. Nur für hydrophobe oder aromatische Seitenketten sind ähnliche Änderungen der Seitenketten-Konformation koordinierter Peptidliganden beschrieben [105-109]. Entsprechend Konformationsänderungen treten bei Seitenketten auf, die basische Funktionen enthalten. Die nicht koordinierenden Reste bedingen Faktoren wie lokale Hydrophilie oder Hydrophobie, sterische Blockierung von Koordinationsstellen und Wasserstoffbrückenbildung in biologischen Systemen. Man muß also Faktoren, die durch eine Metallkoordination an ein Protein bedingt werden, immer berücksichtigen, wenn man biologische Funktionen verstehen will [1,2,17,18].

2. Darstellung und Charakterisierung von Pd(II)-Komplex mit ATCUN *motif*.

2.1. Einführung

Wie gelangen Metall-Ionen in die Zellen, und wie werden sie gespeichert? Dieses Gebiet wird in der Bioanorganischen Chemie intensiv erforscht. Kupfer wird von dem Serumprotein Ceruloplasmin transportiert, sowie vom Protein Albumin, das Metall-Ionen bindet und transportiert. Das Albumin ist das mengenmäßig häufigste Protein im Plasma. Die Albumine sind bedeutungsvoll für die Erhaltung des osmotischen Blutdrucks und für Überführung, Verteilung und des Metabolismus vieler endogenen und exogenen Liganden. Frühere Studien über die Bindung des Cu(II) und Ni(II) an Albumin haben gezeigt, daß Cu(II)- und Ni(II)- Rezeptorstellen am Aminoterminus einiger Albumine (ATCUN *motif*) auftreten [15]. Durch Untersuchungen zur Geometrie der Liganden in natürlichen Albuminen und verschiedenen Tripeptiden sowie über den Charakter der Donorguppen konnte man feststellen, daß die minimalen Voraussetzungen für dieses *motif* die folgenden sind:

- (1) ein freier Aminoterminus,
- (2) ein Histidinrest in dritter Position des Aminoterminus,
- (3) zwei frei vorhandene Amid-Stickstoffe der Peptidbindung zwischen dem ersten und dritten Aminosäurerest.

Das Tripeptid GlyGlyHis (GGH) stellt das einfachste Modell des ATCUN *motif* dar [15(a)-(d)]. Die Struktur des Kupfer-Komplexes konnte durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden und zeigt ein vierzäniges Chelat-Bindungsmuster, wobei die Koordination jeweils über den α -Amino-, zwei Amidstickstoffe und den N3-Stickstoff von Histidinrestes unter Ausbildung von zwei fünf- und einem sechsgliedrigen Ring erfolgt [15(b)]. Die entsprechenden Ni(II) und Cu(II)-Komplexe (Gly-Gly-His) waren in letzter Zeit Gegenstand intensiverer Untersuchungen, da mit ihrer Hilfe in Gegenwart von Oxidantien eine sequenzspezifische DNA-Spaltung bzw. Erkennung von "nicht normal gepaartem" Guanin in der DNA stattfinden kann [15(g)-(j)].

Im Allgemeinen gehen die positiv geladenen Aminosäure-Seitenketten des Lysin-Restes mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA ionische Wechselwirkungen ein [23, 24, 43]. Sie beeinflussen damit die Aktivität dieses *motif* für DNA, d. h. diese wird im Vergleich zu GlyGlyHis *motif* stärker. Das *motif*, in dem der Lysin-Rest in der ersten oder zweiten Position vorhanden ist, hat gezeigt, daß dieser

Rest die Koordination dieses *motifs* am Metall nicht verhindert, und daß die Cu(II)- oder Ni(II)-Komplexe dieser Tripeptide [15(g), (h)] und des modifizierten Proteins [15(j)] eine Zunahme der Sequenzspezifität bei der DNA-Spaltung aufweist. Das läßt darauf schließen, daß die Seitenkette des Lysin-Restes bei der molekularen Erkennung von Rezeptorstellen am Albumin von Bedeutung ist.

Vom koordinationschemischen Standpunkt aus ist der Aminosäurerest Histidin interessant. Er besitzt als weitere Koordinationsstellen die Heteroatome des Imidazolrings. So ist im Hämoglobin der N1-Imidazolstickstoff an der Bindung von Fe beteiligt [5], hingegen koordiniert der N3-Stickstoff an Zn in Superoxiddismutase(SOD) [6] oder Cu in Plastocyanin [7]; verbrückende Koordination liegt an anderer Stelle in SOD vor. Das Vorhandensein der N1, N3 Bindungsisomerie spiegelt sich auch in der Tautomerie des Imidazolrings wieder [58, 61, 62, 73-75]. Das N1 protonierte Tautomer der monoprotonierten His-Verbindungen überwiegt bei physiologischem pH in wäßriger Lösung. Das Tautomergleichgewicht kann jedoch durch eine Metallkoordination beeinflusst werden. Auch aus biologischer Sicht ist dies von großem Interesse, da der Imidazolring in Histidin-Seitenketten eine wichtige Rolle in vielen Enzymen spielt. Auf Grund des pK_a -Wertes von ungefähr 7 liegt das Imidazol im physiologischen Milieu zu mehr als 50 % unprotoniert vor und kann somit unter diese Bedingungen als Base oder Säure fungieren [58].

Röntgenstrukturdaten eines Metall-Komplexes mit ACTUN *motif* des *Human Serum Albumin* (HSA) liegen nicht vor. Nachfolgend sollen Pd(II)-Komplex von AspAlaHisLys und GlyLysHis in Lösung näher untersucht werden, speziell unter dem Aspekt möglicher Wechselwirkungen der Peptid-Seitenketten. Mit Hilfe von NMR-Techniken sollen die Strukturen der Verbindungen und insbesondere ihr Verhalten in Lösung untersucht werden. Die Zuordnung und Aufklärung der Spinsysteme sowie Aussagen über die Konformation des Moleküls können nur über 2D-NMR-Spektren erfolgen. Daneben soll auch geklärt werden, inwiefern intramolekulare Wechselwirkungen zwischen Seitenketten nachgewiesen werden können und ob und wie diese möglicherweise zur Erkennung der DNA-Stränge und zur Stabilisierung der resultierenden Strukturen beitragen können.

2.2. Die freien Liganden

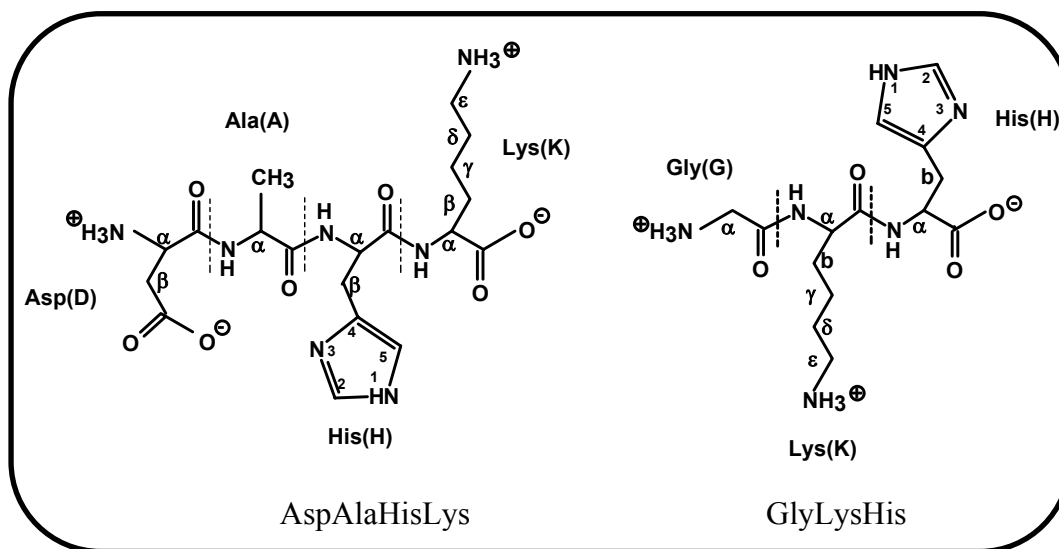


Abb. 63 : Strukturformeln von AspAlaHisLys und GlyLysHis.

2.2.1. Gly-L-Lys-L-His (GlyLysHis)

Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des GlyLysHis bei pD 7.9 weist im aromatischen Bereich zwei Signale für die H2- ($\delta = 8.61$ ppm) und H5-Protonen ($\delta = 7.34$ ppm) des Imidazolrings auf, welche durch Kopplung (ca. 1.2 Hz) jeweils als Dublett erscheinen. Das Methin- und die Methylenprotonen des Histidinrestes im aliphatischen Bereich zeigen, bedingt durch das Chiralitätszentrum am α -Kohlenstoff, eine ABX-Aufspaltung [84, 87, 88]. Das scheinbare Triplet des Methinprotons entsteht durch vicinale Kopplung ($^3J_{\text{av}} = 14.6$ Hz) mit den beiden nicht-äquivalenten Methylenprotonen. Neben der vicinalen Kopplung mit dem Methinproton koppeln die β -CH₂-His-Protonen auch geminal miteinander; dadurch spalten die Signale der Methylenprotonen in acht Linien auf. Im 1D- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind diese Resonanzen mit dem Signal des Lysinrestes überlagert, können aber mit Hilfe von DQF-COSY- und TOCSY-Spektren leicht zugeordnet werden. Bei Erhöhung des pD-Wertes führt die Deprotonierung der α -Carboxylatgruppe zu einem Hochfeldshift des Signals ($\Delta\delta = -0.62$ ppm). Wie beim Histidinrest erzeugen das Methinproton des Lysinrestes ein Triplet bei $\delta = 4.30$ ppm ($^3J_{\text{av}} = 14.3$ Hz), die Methylenprotonen der Lysinseitenkette, mit Ausnahme der ϵ -CH₂-Protonen, drei Multipletts (δ (β -CH₂) = 1.84, δ (γ -CH₂) = 1.42 und δ (δ -CH₂) = 1.73 ppm) und die ϵ -CH₂-Protonen bilden ein Triplet bei $\delta = 2.99$ ppm. Die

Methylenprotonen des Glycinrestes zeigen ein Singulett bei 3.73. Bei Erhöhung des pD-Wertes erfolgt Deprotonierung der α -Aminogruppe, was zu einem Hochfeldshift des Signals ($\Delta\delta = -0.34$ ppm) führt. In Abb. 64 (a) sind die chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale in Abhängigkeit vom pH*-Wert aufgetragen. Diese Auftragung weist auf mehrere Protonierungsgleichgewichte in Lösung hin. Hieraus können die angegebenen pK_a-Werte der Gleichgewichte bestimmt werden.

Zur weiteren Strukturaufklärung wird die Konformation der Seitenketten des Tripeptids analysiert, die durch den Diederwinkel um die C_α—C_β-Bindung bestimmt ist

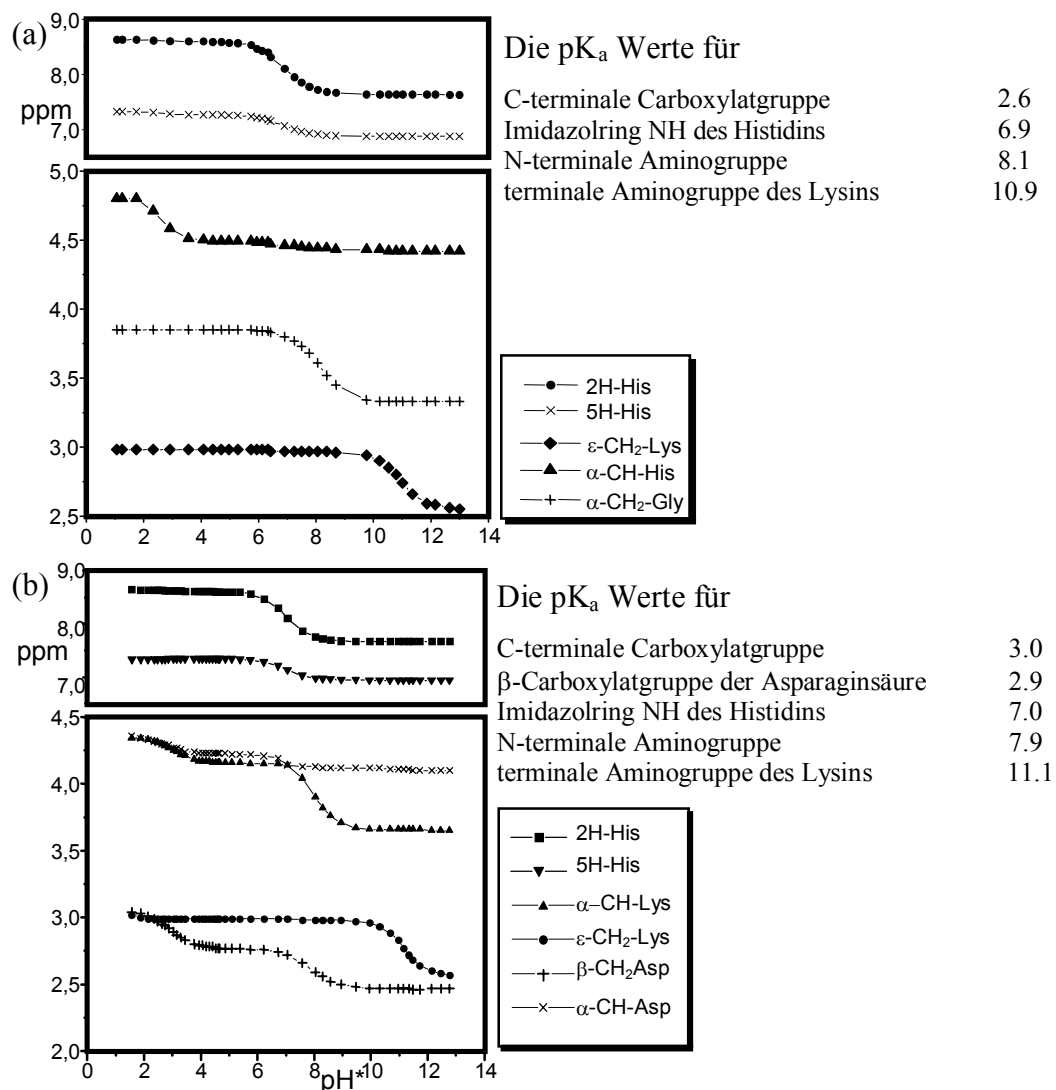


Abb. 64 : pH*-abhängige Auftragung der chemischen Verschiebungen der unterschiedlichen Resonanzen im ¹H-NMR-Spektrum von (a) GlyLysHis und (b) AspAlaHisLys mit der pK_a-Werten

(in Kap. I bereits dargelegt wurde). Die aus vicinalen Kopplungskonstanten berechnete Konformation der Seitenkette bei pD 7.9 weist einen h-Anteil von 7.3 % für den Histidinrest und 10.1 % für den Lysinrest auf. Erhöhung des pD-Wertes führt zur Deprotonierung der Carboxylatgruppe und Aminogruppe. Der Einfluß der Protonierung/Deprotonierung der Carboxy- bzw. Aminofunktion auf die Populationen der drei Rotameren ist aber nur gering. Weitere Hinweise auf die Struktur des GlyLysHis können $^1\text{H-NMR}$ - und 2D-TOCSY-Spektren liefern (vgl. nächster Abschnitt).

2.2.2. L-Asp-L-Ala-L-His-Lys (AspAlaHisLys)

Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von AspAlaHisLys bei pD 4.5 zeigt im aromatischen Bereich die beiden Signale für die H2- ($\delta = 8.61$ ppm) und H5-Protonen ($\delta = 7.34$ ppm)

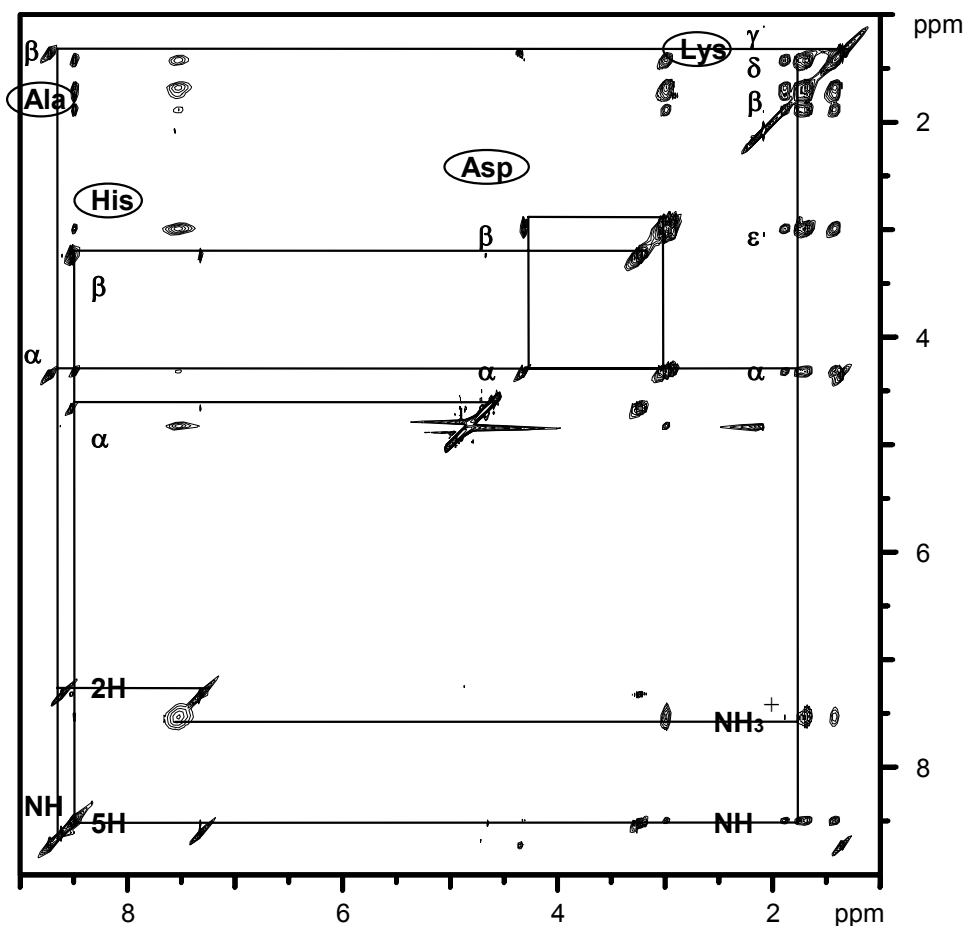


Abb. 65 : 2D- ^1H -TOCSY-Spektrum von AspAlaHisLys in 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O bei pD 2.5. Die Mischzeit ist 150 msec.

des Imidazolrings, welche infolge Kopplung (ca. 1.2 Hz) als Dublett erscheinen. Das Methin- und die Methylenprotonen des Histidinrestes und Asparaginsäurerestes im aliphatischen Bereich zeigen wiederum (vgl. oben) eine ABX-Aufspaltung (scheinbare Triplet bei $\delta = 4.65$ ppm für α -CH-His ($^3J_{av} = 13.45$ Hz) und Dublett- von -Dubletts bei $\delta = 4.23$ ppm für α -CH-Asp ($^3J_{av} = 13.09$ Hz)) [84, 87, 88]. Das Methin- und die Methylprotonen des Alaninrestes weisen eine AX₃-Aufspaltung (Quartett bei $\delta = 4.35$ ppm für α -CH-Ala und Dubletts bei $\delta = 1.35$ ppm für β -CH₃-Ala; $^3J_{AX} = 7.2$ Hz) auf. Das Methinproton des Lysinrestes bildet den X-Teil eines ABX-Systems und ruft ein Triplet bei $\delta = 4.17$ ppm ($^3J_{av} = 13.74$ Hz) hervor. Alle Resonanzen werden mit Hilfe von DQF-COSY- und TOCSY-Spektren leicht zugeordnet (Abb.65). Bei Erhöhung des pD-Wertes führt die Deprotonierung der α -Carboxylatgruppe zu einem Hochfeldshift des α -CH-Asp-Signals ($\Delta\delta = - 0.54$ ppm) und die der α -Aminogruppe zu einem Hochfeldshift des α -CH-Lys-Signals ($\Delta\delta = - 0.44$ ppm). In Abb. 64 (b) sind die chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale in Abhängigkeit vom pH*-Wert aufgetragen. Diese Auftragung weist auf mehrere Protonierungsgleichgewichte in Lösung hin. Hieraus können die angegebenen pK_a-Werte der Gleichgewichte bestimmt werden. Die aus vicinalen Kopplungskonstanten berechneten Konformationen der Seitenketten bei pD 4.5 weisen einen h-Anteil von 21.2% für den Asparaginsäurerest, 17.9 % für den Histidinrest und 15.2 % für den Lysinrest auf.

Weitere Hinweise auf die Struktur des AspAlaHisLys liefern in Wasser aufgenommenen ¹H-NMR- und 2D-TOCSY-Spektren.

2.3. Palladium(II)-Komplexe

2.3.1. ¹H-NMR-spektroskopische Charakterisierung

Die Oligopeptide GlyLysHis und AspAlaHisLys zeigen ein dem Tripeptid ArgLysAsp vergleichbares Reaktionsverhalten. Das Reaktionsprodukt mit Pd(II) ist durch ein neues Dublett des 2H-His-Protons des Histidinrestes im **¹H-NMR-Spektrum** gekennzeichnet (bei 7.57 ppm für GlyLysHis und 7.80 ppm für AspAlaHisLys), welches gegenüber dem Signal des Edukts zu höherem Feld verschoben ist. Charakteristisch ist die große Hochfeldverschiebung des 2H-His-Protons ($\Delta\delta = -0.29$ ppm für GlyLysHis und -0.81 ppm für AspAlaHisLys) im Vergleich zum 5H-Stickstoff (Tab. 16), was auf eine Pd(II)-Koordination an der N3-Position des Imidazolsystems schließen läßt, da sich das H2(His) in direkter Nachbarschaft zum N3-Stickstoff befindet. Eine Vergrößerung des eindimensionalen Spektrums (Abb. 66) zeigt, daß

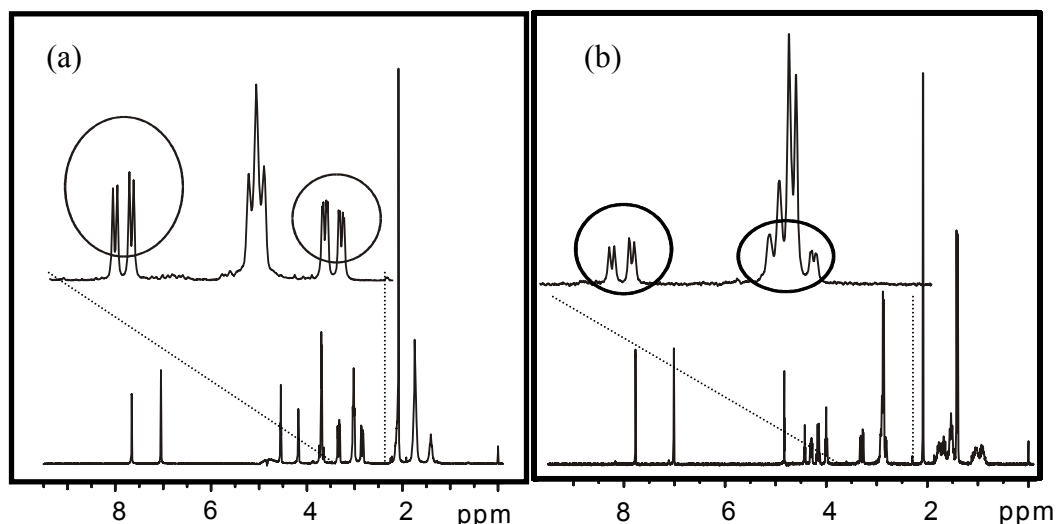


Abb. 66 : Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums von (a) Pd(GlyLysHis) (**22**) (b) Pd(AspAlaHisLys) (**23**) in D_2O bei pD 5.3.

sowohl in (**22**) als auch in (**23**) an einer der beiden Resonanzen des $\beta\text{-CH}_2\text{-His}$ eine Feinstruktur beobachtet wird, die durch weitreichende Kopplung zustande kommt. Diese ^4J -Kopplungen beobachtet man in gesättigten Verbindungen besonders dann, wenn die betreffenden C—H- und C—C-Bindungen in einer M- oder W-Anordnung vorliegen [87], was wiederum eine N3-Metallkoordination des Histidinrestes beweist. Ebenso entsteht jeweils für das $\alpha\text{-CH}_2\text{-Gly}$ des GlyLysHis und für das $\alpha\text{-CH-Asp}$ des

Tab. 16 : Chemische Verschiebungen (ppm) der Verbindungen Pd(GlyLysHis) (**22**) bei pD 7.9 und Pd(AspAlaHisLys) (**23**) bei pD 4.3 in D_2O . In Klammern sind die Multiplizitäten der Protonenresonanzen und die Differenz der chemischen Verschiebungen infolge der Koordination von Palladium bei gleichem pD-Wert angegeben.

Zuordnung	δ [Pd(GKH)]	δ [Pd(DAHK)]	Zuordnung	δ [Pd(GKH)]	δ [Pd(DAHK)]
2H-His	7.57 (d; -0.29)	7.80 (d; -0.81)	$\alpha\text{-CH}_2\text{-Gly}$	3.65 (s; -0.08)	-
5H-His	6.95 (d; -0.02)	7.02 (d; -0,32)	$\alpha\text{-CH-Asp}$	-	3.98 (t; -0.25)
$\alpha\text{-CH-His}$	4.27 (t; -0.18)	4.38 (t; -0.27)	$\beta\text{-CH}_2\text{-Asp}$	-	2.79 (m; 0.00)
$\beta\text{-CH}_2\text{-His}$	2.97 (qd; -0.10)	3.06 (qd; -0.21)	$\alpha\text{-CH-Ala}$	-	4.17 (dd; -0.18)
$\alpha\text{-CH-Lys}$	4.16 (d; -0.14)	4.08 (t; -0.09)	$\beta\text{-CH}_2\text{-Ala}$	-	1.40 (d; 0.04)
$\varepsilon\text{-CH}_2\text{-Lys}$	3.02 (t; 0.05)	2.89 (t; -0.10)			

AspAlaHisLys ein neues Signal, welches relativ zum freien Liganden hochfeldverschoben erscheint. Diese Hochfeldverschiebungen lassen auf eine Pd(II)-Koordination am α -Aminostickstoff schließen. Weiterhin sind die neuen Resonanzen des α -CH-His, des α -CH-Lys des GlyLysHis und des α -CH-Ala des AspAlaHisLys gegenüber den entsprechenden Signalen des Eduktes höherem Feld verschoben, was auf eine Pd(II)-Koordination am Amidstickstoff schließen läßt. Beide Oligopeptide fungieren als vierzählige Liganden, wobei die Koordination jeweils über den α -Amino-, zwei Amidstickstoffe und den N3-Stickstoff von Histidinrestes unter Ausbildung des zwei fünf- und einem sechsgliedrigen Ringen erfolgt. Dieses Koordinationsmuster histidinhaltiger Oligopeptide ist bereits früher bei verschiedenen Übergangsmetallen festgestellt worden [15, 58, 61, 62, 73-75]. Die Aufspaltung der beiden $C_{\beta}H_2$ -Protonen des Histidin-Restes um $\Delta\delta = 0.92$ ppm ist auffällig. Die beiden Protonen müssen eine unterschiedliche chemische Umgebung haben, die durch eine Fixierung der im Komplex frei drehbaren $C_{\alpha}-C_{\beta}$ -Bindung erklärt werden kann. Die aus vicinalen Kopplungskonstanten berechnete Konformation der Seitenketten des koordinierten GlyLysHis bei pD 4.5 weist einen h-Anteil von 76.2% für den Lysinrest auf. Für AspAlaHisLys ist dieser Wert 37.6 % für den Lysinrest und 29.5% für den Asparaginsäurerest. Wie im Fall anderer Metall-Peptid-Komplexe werden Änderungen der Seitenkettenkonformationen zugunsten des h-Rotameren auch bei der Palladiumkoordination beider Oligopeptide beobachtet, obwohl die Rotamere g und t bei Abwesenheit sterischer Hinderung in wäßriger Lösung bevorzugt sind.

Eine Bestätigung der Bildung der entsprechenden Komplexe liefert eine pH-Titration. Wie die graphische Darstellung in Abb. 67 zeigt, erfahren Signale der C-terminalen Aminosäure im sauren Milieu einen Tieffeldshift, was auf die Protonierung der Carboxylatgruppe zurückgeführt werden kann. Die pK_a -Werte dieser funktionellen Gruppe erhöhen sich gegenüber dem freien Liganden. Im Gegensatz zum freien Liganden sind im Komplex für das über ein Sauerstoffatom der β -Carboxylatgruppe koordinierte Metall keine Sprungbereiche der β -CH₂-Resonanzen zu detektieren. Die chemischen Verschiebungen bleiben bei den gewählten pH*-Werten nahezu unverändert, d. h. die β -Carboxylatfunktion ist nicht de- bzw. protonierbar. Die pD-Abhängigkeit zeigt, daß in diesen Komplexen auch der α -Aminostickstoff koordiniert ist, da im schwach alkalischen Milieu keine zweite Deprotonierungsstufe beobachtet wird. Durch die Auswertung pH-abhängiger ¹H-NMR-Spektren in D₂O konnten die pK_a -Werte der N₁H-Position zu ca. 12 bestimmt und eine Aciditäts-Steigerung gegenüber dem freien Liganden festgestellt werden [73-75].

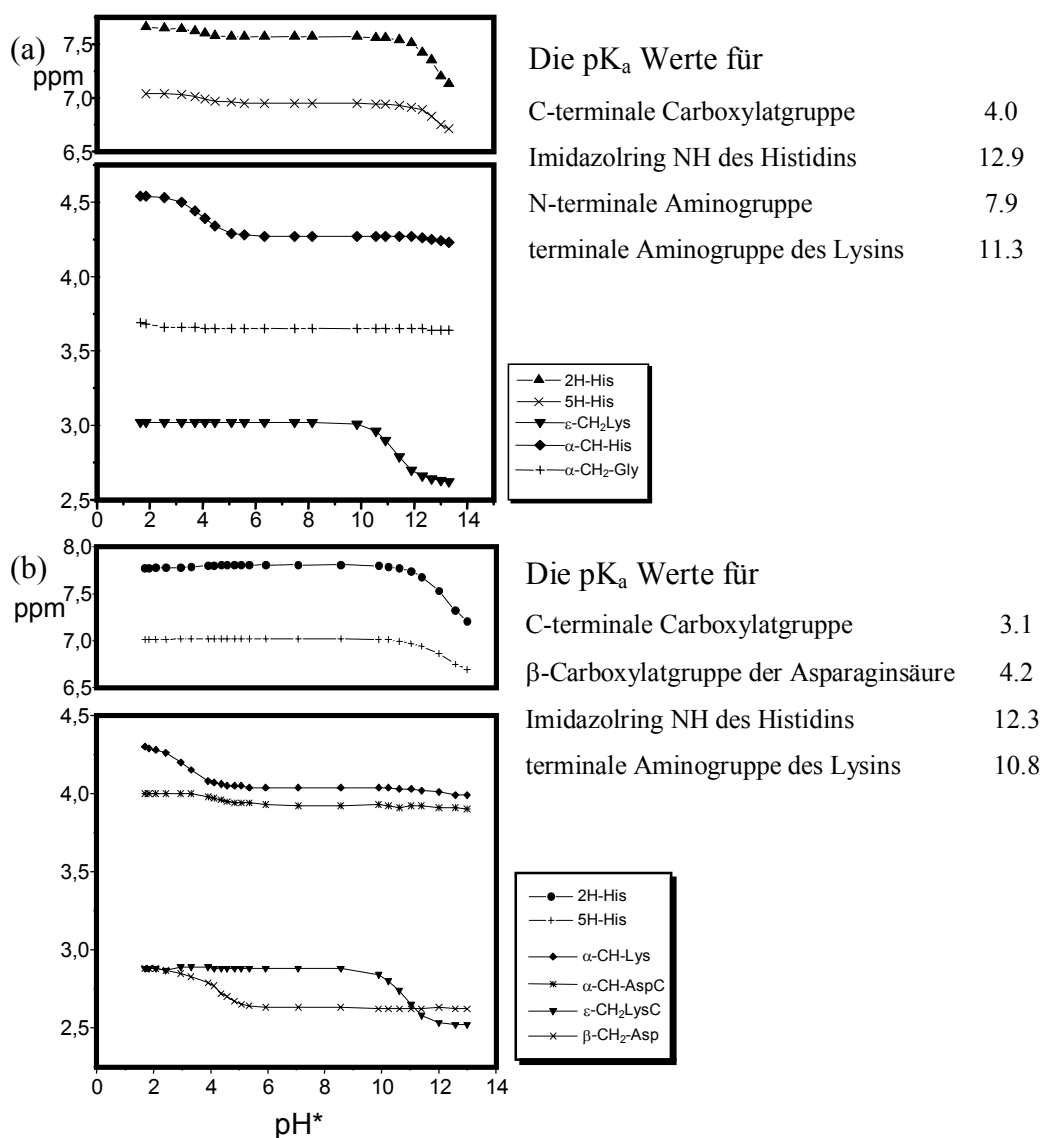


Abb. 67 : pH*-abhängige Auftragung der chemischen Verschiebungen der unterschiedlichen Resonanzen im ¹H-NMR-Spektrum von (a) Pd(GlyLysHis) (22) und (b) Pd(AspAlaHisLys) (23) mit der pK_a-Werten.

Weiterhin beweisen die in Wasser aufgenommenen ¹H-NMR- (Abb. 68) und 2D-TOCSY-Spektren eindeutig die Ausbildung eines vierzähligen Metall-Chelatkomplexes [94-95]. In den ¹H-NMR-Spektren der freien Liganden in 10% D₂O/90 % H₂O werden keine Resonanzen für N₁H beobachtet. Hingegen werden in den Spektren der Komplexe diese Protonen als Singulett gefunden. Bemerkenswert ist, daß im Gegensatz zum freien Liganden keine Resonanz des Proton des Amidstickstoff auftritt. Beim freien Liganden weist das Proton des Amidstickoffs aufgrund der langsameren

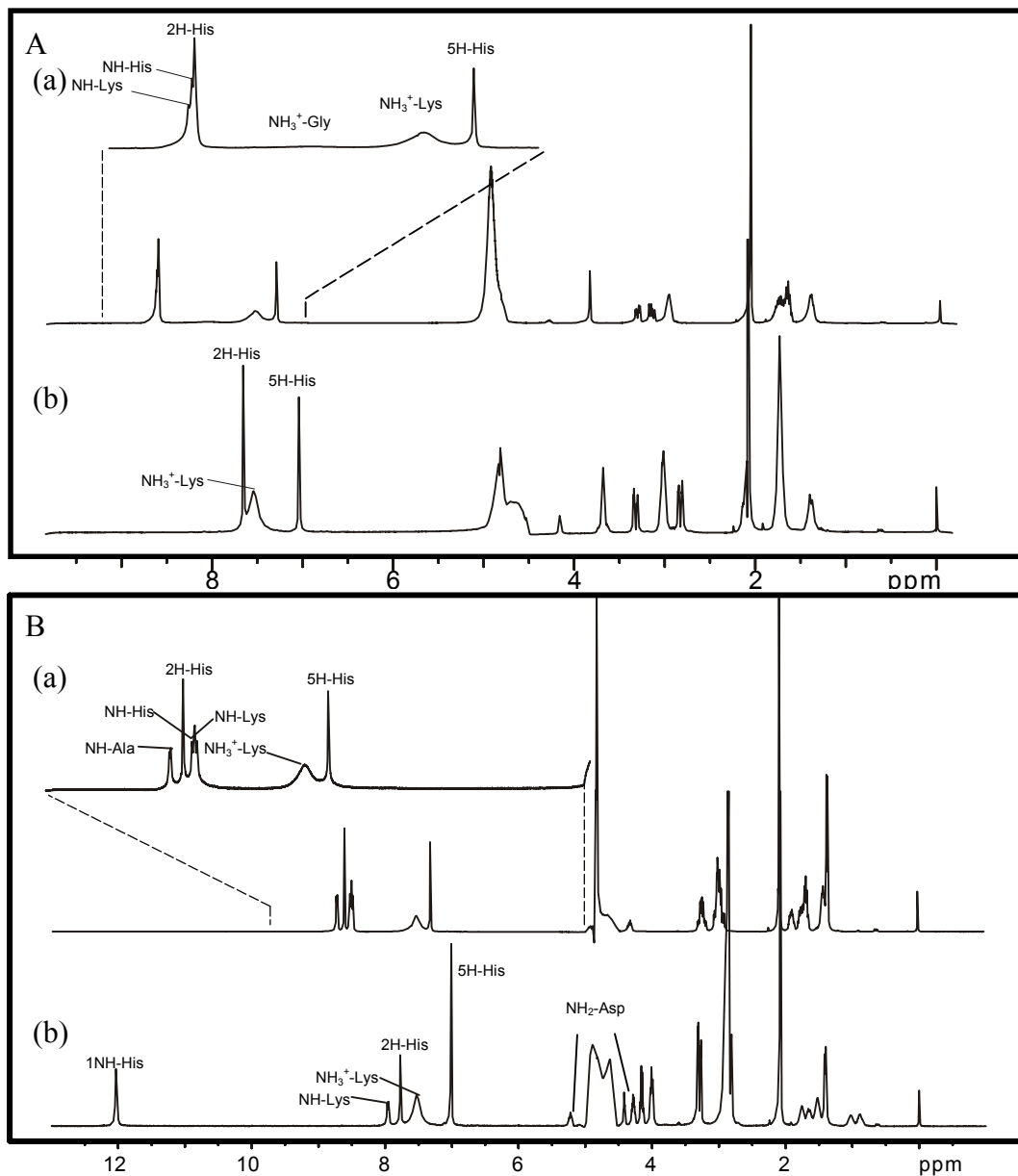


Abb. 68 : ¹H-NMR-Spektren von A: (a) GlyLysHis (b) Pd(GlyLysHis) (**22**) und B: (a) AspAlaHisLys (b) Pd(AspAlaHisLys) (**23**) in 90% H₂O/10% D₂O bei pD 2.5.

Austauschrate mit dem Wasser ein relativ scharfes Dublett auf (Kopplung mit C_αH). Die Abwesenheit dieser Signale im Komplex deutet darauf hin, daß diese Position deprotoniert ist und beide Amidstickstoff-Atome an Palladium koordiniert sind. Weiterhin ist die Aufspaltung der beiden α-NH₂-Protonen (Δδ = 0.95 ppm) auffällig.

2.3.2. ESI-MS-Spektrum

Der Molekülmassenpeak des jeweiligen Komplexes (**22**) und (**23**) ist das intensivste Signal im Spektrum und zeigt ein charakteristisches Isotopenmuster, das hauptsächlich durch die verschiedenen Isotope des Palladiums erzeugt wird. Abb. 69 zeigt die gute Übereinstimmung des experimentellen mit dem theoretisch berechneten Muster. Die Massenspektren zeigen weiterhin neben dem Molekülmassenpeak intensive Peaks der K^+ -Addukte der monomeren Spezies. Auch für diese ist eine hohe Tendenz zur Assoziation in der Gasphase zu beobachten. Dementsprechend sind im höheren Massenbereich neben dem Dimerpeak weitere Peaks eines K^+ -Addukts des Dimers zu finden.

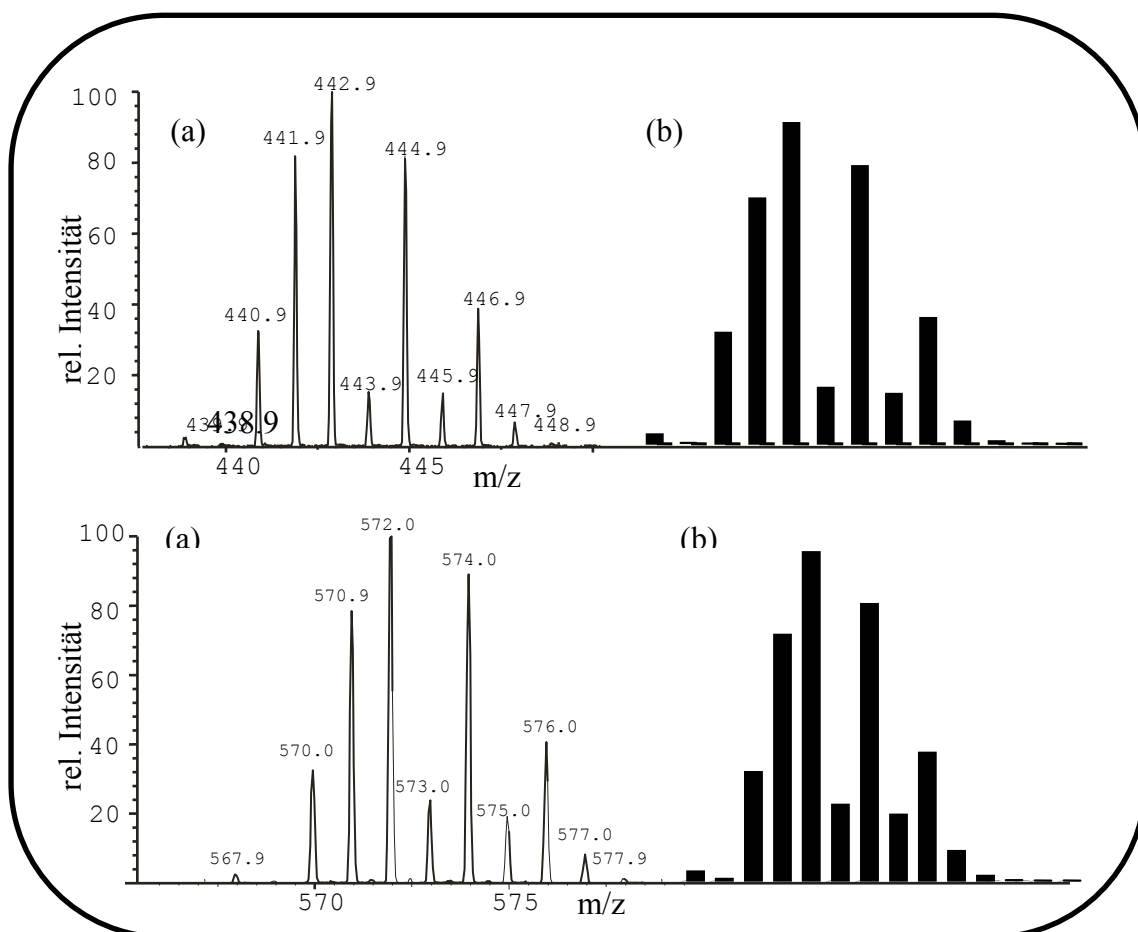


Abb. 69 : Ausschnitt aus den ESI-MS-Spektren von (a) Pd(GlyLysHis) (**22**) und (b) Pd(AspAlaHisLys) (**23**) im Bereich der Molekülmassenpeaks (a). Die berechneten Isotopenverhältnis des Palladiumkomplexes (b).

2.3.3. Zusammenfassung und Diskussion

Alle Untersuchungen sprechen dafür, daß die Oligopeptide GlyLysHis und AspAlaHisLys im Sauren mit dem Palladiumion ein vierzähniges Chelat bilden. Vier Koordinationsstellen werden vom Oligopeptid besetzt, welches über die α -Amino-, zwei Amid- und den N3-Stickstoff des Histidinrestes an das Metall unter Ausbildung von zwei fünf- sowie einen sechsgliedrigen Ring koordiniert ist. Dieses Koordinationsmuster des ATCUN *motif* ist durch Röntgenstrukturanalyse bei Cu(II)(GlyGlyHis) festgestellt worden [15(b)]. Unter Einbeziehung anderer Hinweise wie der pH-abhängigen $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchungen sowie der in Wasser aufgenommenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren lassen sich für Pd(GlyLysHis) (**22**) und Pd(AspAlaHisLys) (**23**) nachfolgender Strukturvorschlag und mögliche Protonierungs- und Deprotonierungsgleichgewichte ableiten (Abb. 70).

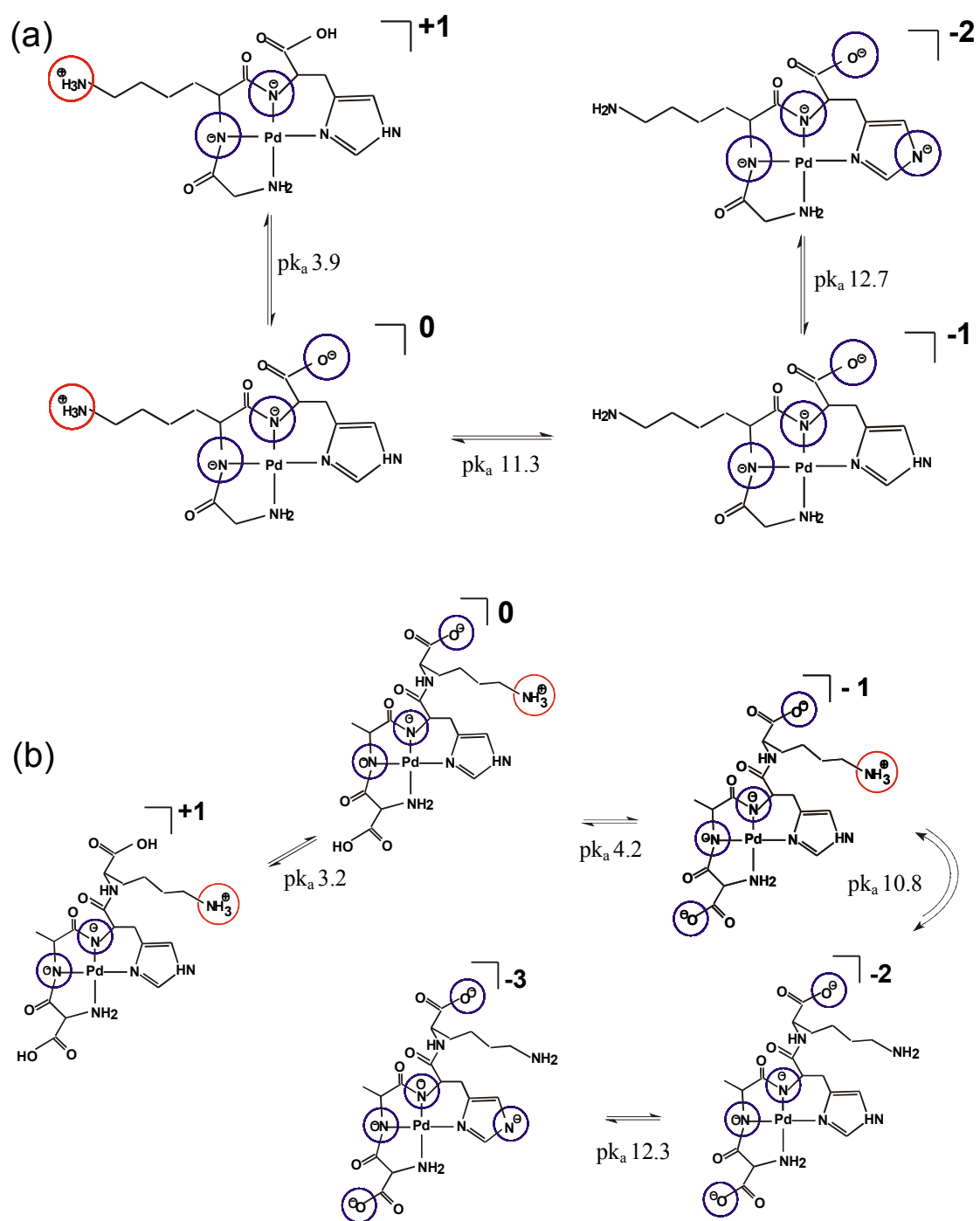


Abb. 70 : Strukturvorschlag und das mögliche Protonierungs-Deprotonierungsgleichgewicht von Komplex (a) Pd(GlyLysHis) (**22**) und Pd(AspAlaHisLys) (**23**).

C. Experimenteller Teil

1. Meßgeräte und spektroskopische Aufnahmebedingungen

1.1 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden an Spektrometern der Fa. Bruker, Typ AC 200 (meßfrequenz 200,13 MHz), DRX 400 (Meßfrequenz 400,13 MHz) aufgenommen.

Für die ^1H -NMR-Spektren in D_2O bzw. 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O wurde TSP (Trimethylsilylpropansulfonat, $\delta = 0$) als interner Standard verwendet. Die Unterdrückung des verbleibenden Solvenssignals erfolgte durch Verwendung von Vorsättigung der Resonanzfrequenz. Die selektive Unterdrückung des Wassersignals im Falle von Lösung aus 90% H_2O und 10% D_2O erfolgte durch den Einsatz einer Gradientenpulsen, so genannte WATERGATE-Plussequenz [169].

Für die Aufnahme temperaturabhängiger Spektren wurden zunächst Standardproben von Methanol bzw. Ethylenglykol zur Überprüfung der Temperatur verwendet und die Kalibrierung erfolgte mit Eichkurven dieser Standardproben für den jeweiligen Probenkopf [84, 90].

2D- ^1H -DQF-COSY, NOESY, ROESY und TOCSY-Spektren wurden bei diversen Temperaturen durchgeführt. Die 2D-Spektren wurden mit je 256 bis 512 Experimenten (F1-Dimension) mit 2048 Datenpunkten (F2-Dimension) aufgenommen und mit der Software XWINNMR, Version 1.3 bzw. 2.1 (Fa. Bruker) nach vorheriger Multiplikation der FIDs mit einer quadrierten Cosinusfunktion und Durchführung von Zerofilling auf 1024 bzw. 2048 Datenpunkte in der F1-Dimension prozessiert. Die Auswertung der Spektren und Integration der ROESY Crosspeaks erfolgte mit dem Programm XEASY.

1.2. Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

ESI-MS-Spektren wurden an einem doppelt-fokussierenden Massenspektrometer, Typ MAT 90 der Firma Finnigan mit Harvard-Infusionspumpe, Fa. Harvard Apparatus aufgenommen. Die Proben wurden in H_2O bei einer Konzentration von 50 μM mit einer Flußrate von 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$. infundiert. Ein Fluß aus Isopropanol/ H_2O (3:1, Flußrate 1.0 $\mu\text{l}/\text{min}^{-1}$) diente der Stabilisierung des Sprays. Die Kollisionsspannung betrug -50 bis 70 V.

1.3. pH/pD-Wert-Bestimmungen

Die pH-Werte wässriger Lösungen wurden an einem pH-Meter Modell 635 der Fa. Metrohm mit einer Glas-Kombi-pH-Elektrode (Metrohm/Aldrich) bestimmt. Der pD-Wert von D₂O-Lösungen ergibt sich durch Addition von 0.4 Einheiten auf den gemessenen unkorrigierten pH-Wert (pH*). Die pK_a-Werte in Wasser wurde aus den pK_a*-Werten in D₂O gemäß $pK_a^* = 1.015 \cdot pK_a + 0.45$ berechnet. pK_a-Werte aus pH-Titrationsen in D₂O wurden graphisch durch Auftragung der beobachteten chemischen Verschiebungen gegen den unkorrigierten pH-Wert (pH*) anhand von publizierten Gleichungen bestimmt [170]. Bei der Verwendung von 90% H₂O/ 10% D₂O als Lösungsmittel wurde keine Korrektur des auftretenden Isotopeneffekts durchgeführt.

2. Ausgangsverbindungen und allgemeine Arbeitsvorschriften.

K₂PdCl₄ wurde von der Fa. Heraeus bezogen. Die Nucleotide stammten von der Fa. Sigma. Alle Peptide wurden von der Fa. Bachem bezogen. Deuterierte Lösungsmittel wurden von den Firmen Aldrich bzw. Deutero bezogen. Das verwendete Wasser wurde mit einem Mischbettvollentsalzer der Fa. Seradest deionisiert. Zur Herstellung der Pufferlösungen wurden 1.0 M Stammlösungen von Ammoniumacetat bzw. Natriumdihydrogenphosphat mit 1.0 M Essigsäure bzw. festem Natriumhydroxid auf pH 5.4 bis 7.0 eingestellt.

Alle übrigen Substanzen waren handelsübliche Produkte (Reinheitsgrad p.a.) und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die Lagerung der Salze NaClO₄ und Mg(ClO₄)₂ erfolgte bei einer Temperatur von 180°C im Trockenschrank. Alle Reaktionsprodukte wurden im analytischen Maßstab dargestellt und in Lösung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie und der ESI-Massenspektrometrie charakterisiert.

3. Präparative Vorschriften

3.1. Pd(TyrLys)Cl (1), Pd(GlyLys)Cl (3), Pd(LysGly)Cl (5)

Einer Lösung aus 0.10 mmol Dipeptidligand in 8 ml Wasser wird mit 0.10 mmol K_2PdCl_4 , gelöst in 2 ml Wasser, versetzt. Nach Einstellen des pH-Wertes mit 0.1 N KOH auf 5.4 wird die Reaktionsmischung 2 h gerührt, wobei der pH-Wert durch Zugabe KOH-Lösung zwischen 5.0 und 5.6 gehalten wird. Die Reaktionslösung wird durch 1H -NMR-Spektroskopie charakterisiert. Beim langsamen Eindunsten bei Raumtemperatur entstehen gelbe Kristalle.

3.2. Pd(TyrLys)(5'dGMP) (7), Pd(GlyLys)(5'dGMP) (10), Pd(LysGly)(5'dGMP) (13), Pd(TyrLys)(5'dCMP) (16), Pd(GlyLys)(5'dCMP) (18)

0.01 mmol binärer Komplex und 0.01 mmol Nucleotid werden mit einer Lösung von 100 mM $NaClO_4$, 10 mM $Mg(ClO_4)_2$ und 50 mM NaH_2PO_4 in 450 μ l D_2O gelöst, der pH-Wert mit 0.1 N DCl und 0.1 N NaOD-Lösung auf 5.4 eingestellt und anschliessend 1H -NMR-spektroskopisch untersucht.

3.4. Pd(ArgLysAsp) (21), Pd(GlyLysHis) (22), Pd(AspAlaHisLys) (23)

0.01 mmol Oligopeptid werden in 450 μ l D_2O bzw. 90 % H_2O / 10 % D_2O gelöst und das in 150 μ l D_2O bzw. 90 % H_2O / 10 % D_2O gelöste K_2PdCl_4 wird in kleinen Mengen zu dem gelösten Oligopeptid gegeben und die Reaktion mittels 1H -NMR-Spektroskopie verfolgt.

D. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und spektroskopische Charakterisierung von Modellverbindungen für ternäre Nucleotid-Metall-Dipeptid-Komplexe und binäre Metall-Oligopeptid-Komplexe. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie wurde dabei der Einfluß von Metallkoordination und insbesondere von Palladiumkoordination auf die Struktur koordinierter Liganden untersucht. Diese ternären Wechselwirkungen von Metallionen mit Proteinen und Nucleinsäuren erweisen sich verstärkt als biologisch relevant [24, 28]. Das systematische Studium dieser Komplexe liefert einen wichtigen Beitrag zur Frage, welche Rolle Metallionen bei der DNA-Protein-Assoziation spielen. Als Seitenketten der Peptide in Modellverbindungen erscheinen die Aminogruppe von Lysin, die Phenolatgruppe von Tyrosin, die Guanidinogruppe von Arginin, die Carboxylatgruppen von Asparaginsäure sowie der Imidazolrest von Histidin geeignet, da sie Wechselwirkungen mit Seitenketten der Peptide und Nucleotide oder zwischen Seitenketten von Oligopeptiden eingehen können [23-26, 42-50]. Besonders interessant ist die Aminosäure Lysin, da sie auf Grund ihrer positiv geladenen Seitenkette zusätzlich noch zum Ladungsgleich des Polyanions DNA beitragen kann.

Im ersten Teil der Arbeit wurden zunächst die binären Komplexe Pd(TyrLys)Cl, Pd(GlyLys)Cl und Pd(LysGly)Cl dargestellt und spektroskopisch charakterisiert. Die Ergebnisse der Analyse der ^1H -NMR-Spektren sprechen dafür, daß die Dipeptide im Sauren mit dem Palladiumion ein dreizähniges Chelat bilden. Drei der vier Koordinationsstellen werden von einem Dipeptid-Molekül besetzt, welches über α -Amino-, Amid- und Carboxylatgruppe dreizählig an das Metall koordiniert ist. Die vierte Koordinationsstelle wird von einem Chloroliganden besetzt. Diese Dipeptid-Komplexe zeigen somit das typische Koordinationsmuster eines Dipeptides auf, das aus Aminosäuren mit nicht-koordinierenden Seitenketten aufgebaut ist. Als Ausgangsverbindungen werden diese monofunktionellen binären Komplexe verwendet. Darüber hinaus ist die ϵ -Aminogruppe des Lysinrestes in wäßriger Lösung bereits bei schwach sauren Bedingungen an der Dimerbildung beteiligt. Wie im Fall anderer Metall-Peptid-Komplexe werden Änderungen der Seitenkettekonformationen zugunsten des h-Rotamers auch bei der Palladiumkoordination von diesen Dipeptiden beobachtet.

Somit liegen die Seitenketten der Dipeptide überwiegend oberhalb der Koordinationsebene des Chelatkomplexes. Dies ist vermutlich auf die nachgewiesenen schwachen Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten des koordinierten Dipeptides und dem Metallion zurückzuführen.

In Kapitel II wurden Reaktionen der binären Komplexen mit Desoxyribonucleotiden beschrieben. Hinsichtlich der Darstellung von Modellen für Metall-induzierten Nucleinsäure-Protein-Vernetzungen konnte eine Reihe von Verbindungen synthetisiert werden. Die Dipeptide sind als Liganden von besonderem Interesse, da sie möglicherweise nicht nur als Trägermolekül wirken, sondern auf Grund von Wechselwirkungen mit den Nucleobasen die Koordination der Metallverbindung an die DNA begünstigen. Zur Modellierung dieser Reaktionen standen in diesem Zusammenhang Ternärkomplexe mit 5'dGMP und 5'dCMP im Vordergrund der Untersuchungen. Bei der Bildung von ternären Komplexen mit Nucleotiden (5'dGMP und 5'dCMP) war vor allem ihre ¹H-NMR-spektroskopische Charakterisierung wichtig, da diese Methode den Nachweis der Wechselwirkung der beiden Liganden im D₂O ermöglichte. Binäre Komplexe mit 5'dGMP bilden unter Abspaltung des Chloroliganden den über die N7-Position der Guaninbase gebundenen ternären Peptid-Pd(II)-Nucleotid-Komplex. Mit den temperaturabhängigen ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Rotation um die Pd(II)-N7-Bindung gehindert ist. Bei der Umsetzung von Pd(II) mit 5'dGMP liegt eine Vielzahl komplexer, pH-abhängiger Gleichgewichte vor (Koordination über N1 und N7 sowie N1, N7-Verbrückung). Die Charakterisierung von Mehrfachkoordinationen monofunktionaler Palladiumverbindungen an das Nucleotid dient der Vervollständigung der Kenntnisse über potentielle Bindungsmuster. Mit Hilfe unterschiedlicher 2D-¹H-NMR-Techniken und unter Berücksichtigung dieser Spektren ist es möglich, alle Protonen in ternären Komplexen zu identifizieren. In den ternären Verbindungen der diversen Dipeptid-Komplexen lagen jeweils Wechselwirkungen der koordinierten Liganden vor. Die Wechselwirkungen von Peptid und Nucleotid konnten bei Pd(TyrLys)(5'dGMP) und Pd(TyrLys)(5'dCMP) mit Hilfe der ¹H-ROESY-Spektren identifiziert werden, welche die Crosspeaks zwischen koordinierten Liganden aufweisen. Anhand dieser Verbindungen konnte der Einfluß der Metallkoordination auf die Struktur koordinierter Liganden überprüft und mit freien Liganden und binären Komplexen verglichen werden. Dabei konnte eine intramolekulare Wechselwirkung bestätigt werden. Eine qualitative Konformationsanalyse mittels ¹H-NMR-, DQF-COSY- sowie ROESY-Spektroskopie läßt sich für 5'dGMP eine *anti*-Rotamerform zur Metallkoordinationsebene und *anti*-

Konformation in Bezug auf die glycosidische Bindung mit O4'-*endo*-ähnlicher Zuckerwellung ableiten. Der Zuckerrest des 5'dGMP liegt dabei auf derselben Seite der Koordinationsebene des Chelatkomplexes wie die Seitenkette des koordinierten Dipeptids und damit können sich intramolekulare Wechselwirkungen aufbauen. Durch Untersuchungen des Mononucleotids 5'dCMP kann bestätigt werden, daß die N3-Position der Cytosinbase einen bevorzugten Koordinationsort dieses Palladiumelektrophils darstellt. In ternären Komplexen mit 5'dCMP ist die Rotation um die Pd(II)-N3-Bindung gehindert. Die Hinderung einer Rotation um die Pd-N3-Bindung ist stärker als die um die Pd-N7-Bindung. Eine qualitative Konformationsanalyse des Zuckerrestes mittels ¹H-NMR- sowie ROESY-Spektroskopie zeigt gegenüber ternären Komplexen mit 5'dGMP eine *anti*-Konformation mit C2'-*endo*(S-Typ)-ähnlicher Zuckerwellung an.

In Kapitel III konnten Oligopeptide L-Arg-L-Lys-L-Asp, Gly-L-Lys-L-His und L-Asp-L-Ala-L-His-L-Lys in ihrem Koordinationsverhalten im biologisch relevanten Medium Wasser untersucht. Außerdem war die Frage zu klären, ob auch in diesen binären Verbindungen intramolekulare Wechselwirkungen zwischen Seitenketten der Oligopeptide zu beobachten sind. Diese Untersuchung sollte Ausgangspunkt für ternäre Metall-DNA-Protein-Komplexe sein. Besitzt eine Aminosäure in Oligopeptiden jedoch eine koordinierende Seitenkette, so erhöht sich die Zahl der möglichen Komplexe. In vielen Fällen wird der Carboxylatsauerstoff im Chelatkomplex durch bessere Donoratome ersetzt, falls diese sterisch verfügbar sind; z. B. kann Histidin den Imidazolstickstoff anbieten. Für Histidin sind Beispiele bekannt, in denen ein vierzähliger Chelatkomplex ausgebildet wird, wobei die Koordination über den Amino-, zwei Amid- und den Imidazolstickstoffs unter Ausbildung von zwei fünf- und einem sechsgliedrigen Ring erfolgt [15, 58, 61, 62, 73-75]. Wenn Histidin die erste, zweite sowie dritte Position des Aminoterminus ist, kann die nächste Amiddeprotonierung durch Koordination des Imidazolstickstoffs verhindert werden. Dies gilt auch für Asparaginsäure, wenn diese die zweite oder dritte Position des Aminoterminus ist. Die nächste Amiddeprotonierung kann auch durch Koordination der β -Carboxylatgruppe verhindert werden. Bei Pd(TP3) ist die β -Carboxylatgruppe des Asparaginsäurerestes an Pd(II) koordiniert, und bei Pd(GlyLysHis) und (AspAlaHisLys) ist der Iminazolstickstoff koordiniert. Durch Koordination an Pd(II) wird die Struktur von Oligopeptiden drastisch verändert. Trotz sterischer Hinderung nehmen gegenüber dem freien Liganden in binären Komplexen die Seitenketten *h*-Konformationen ein und liegen überwiegend oberhalb der Koordinationsebene des Palladiums. Nur für

hydrophobe oder aromatische Seitenketten sind ähnliche Änderungen der Seitenketten-Konformation koordinierter Peptidliganden beschrieben. Entsprechend treten Konformationsänderungen bei Seitenketten auf, die basische Funktionen enthalten.

E. Anhang

1. Literaturverzeichnis

1. W. Kaim und B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, Teubner Verlag, Stuttgart, **1991**.
2. S. J. Lippard und J. M. Berg, *Bioanorganische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1995**.
3. L. G. Marzilli, R. F. Dannals, H. D. Burns, *Inorganic Chemistry in Biology and Medicine*, *ACS Symposium Series*, **1980**, 140, 91.
4. B. Rosenberg, L. van Camp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature* **1965**, 205, 698, 5.
5. M. F. Perutz, *Scientific American* **1978**, 249, 68.
6. I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 7761.
7. A. G. Sykes, *Struct. and Bond.* **1991**, 75, 175.
8. W. Mertz, *Science* **1981**, 213, 1332.
9. J. P. Collman, *Acc. Chem. Res.* **1977**, 10, 265.
10. D. H. Brown, W. E. Smith, *Chem. Soc. Rev.* **1980**, 9, 217.
11. M. J. Cleare, *Coord. Chem. Rev.* **1974**, 12, 349.
12. D. R. Williams, *Chem. Rev.* **1972**, 72, 203.
13. P. B. Dervan, *Science* **1988**, 282, 111.
14. B. Sarkar, *Metal Ions Biol. Syst.* **1982**, 12, 233.
15. (a) C. Harford, B. Sarkar, *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 123.; J. –P. Laussac, B. Sarkar, *Biochemistry* **1984**, 23, 2832.
(b) N. Camerman, A. Camerman, B. Sarkar, *Can.J. Chem.* **1976**, 54, 1309.
(c) S. L. Best, T. K. Chattopadhyay, M. I. Djuran, R. A. Palmer, P. J. Sadler, I. Sóvágó, K. Varnagy, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 2587.
(d) M. R. McDonald, F. C. Fredericks, D. W. Margerum, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 3119.
(e) P. J. Sadler, A. Tucker, *Biochem. Soc. Trans.* **1990**, 18, 923.
(f) C. Harford, B. Sarkar, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 209, 877.
(g) M. Tabata, B. Sarkar, *J. Inorg. Biochem.* **1992**, 45, 93.
(h) J. –P. Laussac, B. Sarkar, *Biochemistry* **1984**, 23, 2832.
(i) K. C. Brown, S. –W. Yang, T. Kodadek, *Biochemistry* **1995**, 34, 4733.

- (j) D. P. Mack, P. B. Dervan, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9399.
- (k) J. G. Muller, R. P. Hickerson, R. J. Rerez, C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1501.
- (l) X. Chen, S. E. Rokita, C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5884.
- (m) C. Harford, S. Narindrasorasak, B. Sarkar, *Biochemistry* **1996**, *35*, 4271.
16. H. M. Brothers, H and N. M. Kostic, *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 1761.
17. G. L. Eichhorn, *Metal Ions Biol. Syst.* **1980**, *10*, 1.
18. T. V. O'Halloran, *Metal Ions Biol. Syst.* **1989**, *25*, 105 und die dort zitierte Literatur.
19. R. L. P. Adams, J. T. Knowler, D. P. Leader, *The Biochemistry of Nucleic Acids*, Chapman and Hall, London, **1986**.
20. C. Stefanelli, V. Ferrari, C. Rossoni, F. Flamingi, C. M. Caldareera, *Amino Acids* **1993**, *4*, 53.
21. R. Chandra, R. Beri, A. Sarkar, *J Inorg. Biochem.* **1992**, *48*, 1.
22. (a) V. Ramakrishnan, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1997**, *26*, 83.
(b) R. Sperling, E. J. Wachtel, *Adv. Protein Chem.* **1981**, *34*, 1.
23. H. Masuda, A. Odani, T. Yamazaki, T. Yajima, O. Yamauchi, *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 1111.
24. H. Berglund, H. Baumann, S. Knapp. R. Ladenstein, T. Hard, *J Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12883.
25. J. P. Sluka, S. J. Horvath, A. C. Glasgow, M. I. Simon, P. B. Dervan, *Biochemistry* **1990**, *29*, 6551.
26. M. Barcena, G. Colmenarejo, M. C. Gutierrezalonso, F. Montero, G. Orellana, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *214*, 718.
27. D. S. Sigman, A. Mazumder, D. M. Perrin, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2295.
28. Q. Liang, P. D. Eason, E. C. Long, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9625.
29. N. Y. Sardesai, K. Zimmermann, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7502.
30. D. L. Ollis, S. W. White, *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 981.
31. (a) J. E. Coleman, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 897.
(b) J. M. Berg, *Metal Ions Biol. Syst.* **1989**, *25*, 235 und die dort zitierte Literatur.
(c) J. M. Berg, *Prog. Inorg. Chem.* **1989**, *37*, 143.
(d) J. M. Berg, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 14.
32. E. S. Auld, J. F. Riordan, B. L. Valleie, *Metal Ions Biol. Syst.* **1989**, *25*, 359.
33. P. Reichard, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 1.

34. Q. M. Zhang, H. Sugiyama, I. Miyabe, S. Matsuda, I. Saito, S. Yonei, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3969.
35. L. Dzantiev, L. J. Romano, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5139.
36. G. P. Mullen, S. H. Wilson, *Biochemistry* **1997**, *36*, 4713.
37. S. E. Sherman, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1153.
38. P. M. Pil, S. J. Lippard, *Science* **1992**, *256*, 234.
39. R. B. Ciccarelli, M. J. Solomon, A. Varshavsky, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1985**, *24*, 7533.
40. P. M. Pil, S. J. Lippard, *Science* **1992**, *256*, 234.
41. (a) X. Q. Zhai, H. Beckmann, H. M. Jantzen, J. M. Essigmann, *Biochemistry* **1998**, *37*, 16307.
(b) P. Jordan, M. Carmo-Fonseca, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2831.
(c) E. E. Trimmer, D. B. Zamble, S. J. Lippard, J. M. Essigmann, *Biochemistry* **1998**, *37*, 352.
42. E. Frieden, *J. Chem. Edu.* **1975**, *52*, 754.
43. (a) Y. A. Shin, G. L. Eichhom, *Biopolymers* **1977**, *16*, 231.
(b) J. K. Tyler, K. E. Allen, R. D. Everett, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 270.
44. C. S. Sigman, *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 180.
45. (a) R. B. van Atta, J. Bemadou, B. Meunier, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4783.
(b) J. T. Groves, T. P. Farrell, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4998.
(c) B. Ward, A. Skorobogatz, J. C. Dabrowiak, *Biochemistry* **1986**, *25*, 6875.
46. (a) H. Sigel, *Metallons Biol. Syst.* **1973**, *2*, 63.
(b) H. Sigel, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 394.
(c) L. D. Pettit, R. J. W. Hefford, *Metallons Biol. Syst.* **1979**, *9*, 173.
47. T. D. Tullius, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Springer-Verlag, Berlin, **1989**, *3*, 1.
48. (a) J. -L. Dimicoli, C. Helene, *Biochemistry* **1974**, *13*, 724.
(b) E. J. Gabbay, K. Sanford, C. S. Baxter, L. Kapicak, *Biochemistry* **1973**, *12*, 4021.
49. (a) J. -J. Toulme, C. Helene, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 244.
(b) R. H. A. Polmer, M. Nilges, C. H. M. Papavoine, B. J. M. Harmsen, R. N. H. Konings, C. W. Hilbers, *Biochemistry* **1997**, *36*, 9120.
50. J. M. Turner, S. E. Swalley, E. E. Baird, R. B. Dervan, *J Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6219.

51. (a) S. Kasselouri, A. Garoufis, N. Hadjiliadis, *Inorg. Chim. Acta* **1987**, *135*, L3.
 (b) J. J. Toulme, *Bioinorg. Chem.* **1978**, *8*, 319.
52. A. Garoufis, J. Hatiris, N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.* **1991**, *41*, 195.
53. Y. Rhee, C. Wang, B. L. Gaffney, R. A. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8742.
54. N. Y. Sardesai, K. Zimmerman, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7502.
55. A. Bundi, K. Wuthrich, *Biopolymer* **1979**, *18*, 285; 299.
56. L. M. Volshtein, *Sov. J. Coord. Chem.* **1975**, *1*, 483.
57. K. Burger, *Bio-coordination Chemistry: coordination equilibria in Biologically active systems*, Ellis Horwood, **1990**.
58. (a) L. D. Pettit, M. Bezer, *Coord. Chem. Rev.* **1985**, *61*, 97.
 (b) A. Lakovidis, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.* **1994**, *135/136*, 17.
 (c) T. G. Appleton, *Coord. Chem. Rev.* **1997**, *166*, 313.
59. (a) A. Garoufis, R. Haran, M. Padeloup, J. P. Laussac, N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.* **1987**, *31*, 65.
 (b) E. W. Wilson Jr., R. B. Martin, *Inorg. Chem.* **1970**, *9*, 528.
 (c) E. W. Wilson Jr., R. B. Martin, *Inorg. Chem.* **1971**, *10*, 1197.
 (d) T. P. Pitner, E. W. Wilson Jr., R. B. Martin, *Inorg. Chem.* **1972**, *11*, 738.
 (e) P. I. Vestues, R. B. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7906.
 (f) L. E. Nance, A. F. Schreiner, H. G. Frye, *Bioinorg. Chem.* **1974**, *3*, 135.
60. (a) E. Gaggelli, N. D'Amelio, A. Maccotta, G. Valensin, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *262*, 268.
 (b) P. J. Morris, R. B. Martin, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1971**, *33*, 2913.
61. (a) I. Sovago, E. Farkas, C. Bertalan, A. Lebkiri, T. Kowalikjankowska, H. Kozlowski, *J. Inorg. Biochem.* **1993**, *51*, 715.
 (b) P. J. Morris, R. B. Martin, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1971**, *33*, 2913.
62. M. Wienken, B. Lippert, E. Zangrando, L. Randaccio, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 1983.
63. H. Kozlowski, E. Matczak-Jon, *Inorg. Chim. Acta* **1979**, *32*, 143.
64. H. Sigel, R. B. Martin, *Chem. Rev.* **1982**, *82*, 385.
65. H. C. Freeman, *Adv. Protein Chem.* **1967**, *22*, 257.
66. R. B. Martin, *Metallons Biol. Syst.* **1979**, *9*, 1.
67. C. Rachez, P. Sautiere, P. Formstecher, P. Lefebvre, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 17996.
68. A. Gergely, E. Farkas, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1982**, 381.

69. A. S. Mildvan, *Acc. Chem. Res.* **1977**, *10*, 246.
70. I. Bertini, A. Rosato, P. Turano, *Pure. Appl. Chem.* **1999**, *71*, 1717.
71. M. Rico, J. Santoro, C. Gonzalez, M. Bruix, J. L. Neira, J. L. Nieto, J. Herranz, *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 283.
72. D. L. Rubenstein, A. A. Isab, M. M. Shoukry, *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 3234.
73. (a) D. H. Shi, T. W. Hambley, H. C. Freeman, *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *73*, 173.
(b) P. Tsivriotis, N. Hadjiliadis, G. Stavropoulos, *Inorg. Chim. Acta* **1997**, *83*, 261.
74. G. Pneumatikakis, C. Chassapis, A. Rontoyianni, *J. Inorg. Biochem.* **1993**, *49*, 83.
75. T. G. Appleton, F. J. Pesch, M. Wienken, S. Menzer, B. Lippert, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 4410.
76. R. Rusnak, L. A. Yu, P. Mertz, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, *1*, 388.
77. S. C. Scrofani, J. Chung, J. J. Huntley, S. J. Benkovi, E. Wright, H. J. Dyson, *Biochemistry* **1999**, *38*, 14507.
78. V. Raghunathan, M. H. Chau, B. D. Ray, B. D. Rao, *Biochemistry* **1999**, *38*, 15597.
79. (a) H. P. Mo, T. C. Pochapsky, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1997**, *30*, 1.
(b) A. R. Waldeck, P. W. Kuchel, A. J. Lennon, B. E. Chapman, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1997**, *39*, 1.
(c) W. S. Price, F. Tsuchiya, C. Suzuki, Y. Arata, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 113.
80. (a) I. D. Gridnev, O. L. Tok, N. A. Gridneva, Y. N. Bubnov, P. R. Schreiner, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1034.
(b) M. Gueron, J. L. Leroy, *Methods Enzymol.* **1995**, *261*, 383.
81. (a) N. H. Andersen, J. W. Neidigh, S. M. Harris, G. M. Lee, Z. H. Liu, H. Tong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8547.
(b) A. M. Mandel, M. Akke, A. G. Palmer, *Biochemistry* **1996**, *35*, 16009.
82. R. C. Fay, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *154*, 99.
83. *Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Applications for Chemists and Biochemists*, Eds. W. R. Croasmun, R. M. K. Carlson, 2. Aufl., VCH, Weinheim, **1994**.
84. H. Gunther, *NMR spectroscopy: basic principles, concepts, and applications in chemistry*, 2. Aufl., Wiley, Chichester, **1995**.
85. K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley & Sons, New York, **1986**.
86. D. Neuhaus, M. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect: in Structural and Conformational Analysis*, VCH, Weinheim, **1989**.
87. H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, VCH, Weinheim, **1988**.

88. (a) J. K. M. Sanders, B. K. Hunter, *Modern NMR Spectroscopy*, 2. Aufl., Oxford University Press, Oxford, **1993**.
(b) A. E. Derome, *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Pergamon Press, Oxford, England, **1987**.
89. U. Weber, H. Thiele, *NMR Spectroscopy: Modern Spectral Analysis*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
90. H. Atta-ur Rahman, *One and Two Dimensional NMR Spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam, **1989**.
91. E. Ämmälähti, M. Bardet, D. Molko, J. Cadet, *J. Magn. Reson., Series A* **1996**, *122*, 230.
92. (a) D. L. Turner, *J. Magn. Reson. A* **1994**, *107*, 239.
(b) C. Greiesinger, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1987**, *75*, 261.
93. (a) A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **1985**, *63*, 207.
(b) A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1988**, *77*, 134.
(c) R. Bazzo, C. J. Edge, M. R. Wormald, T. W. Rademacher, R. A. Dwek, *J. Chem. Phys.* **1990**, *174*, 313.
94. (a) V. F. Bystrov, *Prog. in NMR Spectroscopy* **1976**, *10*, 41.
(b) J. M. Schmidt, *J. Magn. Reson.* **1997**, *214*, 310.
(c) D. A. Case, H. J. Dyson, P. E. Wright, *Methods Enzymol.* **1994**, *239*, 392.
95. (a) G. M. Clore, A. Bax, A. M. Gronenborn, *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 13.
(b) S. Grzesiek, M. Ikura, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1992**, *96*, 215.
(c) U. Eggenberger, Y. Karimi-Nejad, H. Thüning, H. Rütenjans, C. Griesinger, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 583.
96. G. Wagner, W. Braun, T. F. Havel, T. Schaumann, N. Go, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1987**, *196*, 611.
97. (a) Z. Dzakula, A. Edison, W. M. Westler, J. Markley, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6200.
(b) Z. Dzakula, W. M. Westler, A. Edison, J. Markley, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6195.
98. (a) Y. Kim, J. H. Prestegard, *J. Magn. Reson.* **1989**, *84*, 9.
(b) J. J. Titman, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 640.
(c) M. Woodley, R. Freeman, *J. Magn. Reson., Series A* **1996**, *118*, 39.
99. M. Gochin, T. L. Kames, *Biochemistry* **1990**, *29*, 11172.
100. H. Widmer, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **1987**, *74*, 316.
101. T. L. Sayer, D. L. Rabenstein, *Can. J. Chem.* **1976**, *54*, 3392.

102. D. L. Rabenstein, T. L. Sayer, *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 1141.
103. K. G. R. Pachler, *Spectrochim. Acta*, **1964**, *20*, 581.
104. J. Feeney, *J. Magn. Reson.* **1976**, *21*, 473.
105. (a) B. Noszal, P. Sandor, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 2631.
(b) H. Kessler, C. Griesinger, K. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6927.
(c) Y. Karimi-Nejad, J. M. Schmidt, H. Rillterjans, H. Schwalbe, C. Griesinger, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5481.
(d) M. J. Crossley, L. G. Mackay, A. C. Try, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1925.
106. H. Kozłowski, G. Formicka-Kozłowska, B. Jezowska-Trzebiatowska, *Org. Magn. Reson.* **1977**, *10*, 146.
107. A. Odani, S. Deguchi, O. Yamauchi, *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 62.
108. (a) L. E. Erickson, J. E. Sarneski, C. N. Reilley, *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 1701.
(b) S. Kasselouri, J.-P. Laussac, N. Hadjiiladis, *Inorg. Chim. Acta* **1989**, *166*, 239.
(c) H. Kozłowski, E. Matczak-Jon, *Inorg. Chim. Acta* **1979**, *32*, 143.
109. (a) O. Yamauchi, A. Odani, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 391.
(b) A. Odani, O. Yanauchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1981**, *54*, 3773.
(c) A. Odani, O. Yanauchi, *Inorg. Chim. Acta* **1980**, *46*, L63.
110. C. Beeson, T. A. Dix, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1991**, 1913.
111. H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512.
112. K. Kislow, M. Raban, *Top. Stereochem.* **1967**, *1*, 1.
113. M. Kaionsho, K. Ajisaka, M. Kamisaku, A. Murai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *64*, 425.
114. J. I. Brauman, L. K. Blair, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5986.
115. (a) A. Jeltsch, M. Roth, T. Friedrich, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 1121.
(b) M. H. Werner, G. M. Clore, C. L. Fisher, R. J. Fisher, L. Trinh, J. Shiloach, A. M. Gronenbom, *J. Biomol. NMR* **1997**, *10*, 317.
(c) H. Pues, N. Bleimling, B. Holz, J. Wolcke, E. Weinhold, *Biochemistry* **1999**, *38*, 1426.
116. (a) R. Mayer, F. Toulme, T. Monteray-Garestier, C. Helene, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 75.
(b) H. Chem, M. F. Maestre, R. H. Fish, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3631.
117. T. T. Tominaga, H. Inasato, O. R. Nascimento, M. Tabak, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *315*, 217.

118. (a) F. Zhang, T. Yajima, A. Odani, O. Yammauchi, *Inorg. Chim. Acta* **1998**, 278, 136.
 (b) T. Kiss, Z. Sziics, *J Chem. Soc., Dalton Trans.* **1986**, 2443.
119. (a) O. Yamauchi, A. Odani, *Pure. Appl. Chem.* **1996**, 68, 469.
 (b) W. J. Puspita, A. Odani, O. Yamauchi, *J Inorg. Biochem.* **1999**, 73, 203.
 (c) I. Sovago, A. Kiss, B. Lippert, *J Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, 489.
120. (a) O. Yamauchi, K. Tsujide, A. Odani, *J Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 659.
 (b) A. Gamier-Suillerot, J. -P. Albertini, A. Collet, L. Faury, J. -M. Pastor, L. Tosi, *J Chem. Soc., Dalton Trans.* **1981**, 2544.
121. A. Gamier, L. Tosi, *J. Inorg. Biochem.* **1979**, 10, 147.
122. G. Fusch, E. C. Hillgeris, B. Lippert, *Inorg. Chim. Acta* **1994**, 217, 33.
123. Q. Y. He, A. B. Mason, R. C. Woodworth, B. M. Tam, R. T. A. MacGillivray, J. K. Grady, N. D. Chasteen, *Biochemistry* **1997**, 36, 14853.
124. (a) M. M. Whittaker, D. P. Ballou, J. W. Whittaker, *Biochemisry* **1998**, 37, 8426.
 (b) S. Ito, S. Nishino, H. Itoh, S. Ohba, Y. Nishida, *Polyhedron* **1998**, 17, 1637.
 (c) D. Zurita, C. Scheer, J. L. Pierre, E. SaintAman, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1996**, 4331.
125. (a) R. J. W. Hefford, L. D. Pettit, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1981**, 1331.
 (b) R. K. Bogess, R. B. Martin, *J Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 3076.
 (c) J. M. Pastor, A. Gamier, L. Tosi, *Inorg. Chim. Acta* **1979**, 37, L549.
126. (a) G. V. Gazakerley, P. W. Linder, R. G. Torrington, M. R. W. Wright, *J Chem. Soc., Dalton Trans.* **1979**, 1872.
 (b) T. Kiss, A. Gergely, *J Chem. Soc., Dalton Trans.* **1984**, 1951.
127. (a) H. Kozłowski, B. Jezowska-Trzebiatowska, *Chem. Phys. Lett.* **1976**, 42, 246.
 (b) H. Kozłowski, M. Jezowska, H. Szyszuk, *J. Mol. Struct.* **1978**, 50, 73.
128. E. W. Wilson Jr., R. B. Martin, *Inorg. Chem.* **1970**, 9, 528.
129. a) T. Sugimori, K. Shibakawa, H. Masuda, A. Odani, O. Yamauchi, *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 3848.
 (b) B. Radomska, T. Glowiak, M. Kubiak, *J Mol. Struct.* **1994**, 323, 169.
 (c) T. Sugimori, K. Shibakawa, H. Masuda, A. Odani, O. Yamauchi, *Inorg. Chem.* **1993**, 32, 4951.
130. (a) B. Radomska, M. Kubiak, T. Glowiak, H. Kozłowski, T. Kiss, *Inorg. Chim. Acta* **1989**, 159, 111.
 (b) B. Radomska, I. S6vag6, T. Kiss, *J Chem. Soc., Dalton Trans.* **1990**, 289.

131. W. L. Jolly, *Modern Inorganic Chemistry*, 2. Aufl., McGraw-Hill, New York, **1991**.
132. (a) M. Sabat, M. Jezowska, H. Kozlowski, *Inorg. Chim. Acta* **1979**, 37, L511.
(b) Y. G. Zhang, J. M. Li, *Cryst. Res. Technology* **1993**, 28, 1135.
133. O. Yamauchi, A. Odani, H. Masuda, *Inorg. Chim. Acta* **1992** 198-200, 749.
134. S. H. Kim, R. B. Martin, *J Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 1707.
135. I. Bertini, *Bioinorganic chemistry*, Mill Valley, California, **1994**.
136. A. Lihninger, *Principles of Biochemistry*, 2. Aufl., Worth Publishers, **1998**.
137. W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, 2. Aufl., Springer-Verlag, New York, **1988**.
138. (a) *Cisplatin-Chemistry and Biochemistry of Leading Anticancer Drug*, Eds. B. Lippert, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
(b) E. Zangrando, R. Pichierri, L. Randaccio, B. Lippert, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, 156, 275.
139. R. B. Martin, *Acc. Chem. Res.* **1985**, 18, 32.
140. (a) H. Sigel, A. Sigel, *Metal Ions BioI. Syst.* **1979**, 8; **1996**, 32, 33.
(b) K. Aoki, *Metallons Bioi. Syst.* **1996**, 32, 91.
(c) E. Sletten, N. A. Frøystein, *Metallons Bioi. Syst.* **1996**, 32, 397.
(d) H. Sigel, *NATOASISer., Ser. C* **1995**, 155.
141. (a) K. H. Scheeller, V. Scheller-Krattiger, R. B. Martin, *J Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 6833.
(b) J. Arpalahti, *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 104.
(c) J. Arpalahti, P. Lehtikoinen, *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 2564.
142. (a) D. Freifelder, *The DNA Molecule; Structure and Properties*, W. H. Freeman, San Fransisco, **1978**.
(b) C. R. Guest, R. A. Hochstrasser, L. C. Sowers, D. P. Millar, *Biochemistry* **1991**, 30, 3271.
143. M. J. Murray, C. P. Flessel, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, 435, 256.
144. C. Cheong, B. P. Moore, *Biochemistry* **1992**, 31, 8406.
145. E. H. Blackburn, *J Bioi. Chem.* **1990**, 265, 5919.
146. B. Lippert, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 182, 263.
147. S. E. Sherman, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1987**, 87, 1153.
148. Z. M. Banjar, L. S. Hnilica, R. C. Briggs, J. Stein, G. Stein, *Biochemistry* **1984**, 23, 1921.
149. (a) L. I. Elding, L. -F. Olsson, *Inorg. Chim. Acta* **1986**, 117, 9.

- (b) J. J. Pienaar, M. Kotowski, R. van Eldik, *Inorg. Chem.* **1989**, 28, 373.
- (c) M. C. Lim, R. B. Martin, *J Inorg. Nucl. Chem.* **1976**, 38, 1915.
150. (a) M. Wienken, A. Kiss, I. Sovago, E. C. Fusch, B. Lippert, *J Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 563.
- (b) M. Wienken, E. Zangrando, L. Randaccio, S. Menzer, B. Lippert, *J. Chem. Soc., Dalton trans.* **1993**, 3349.
- (c) B. Song, J. Zhao, R. Griesser, C. Meiser, H. Sigel, B. Lippert, *Chem. Eur. J.*, **1999**, 5, 2374.
- (d) F. Schwarz, B. Lippert, A. Iakovidis, N. Hadjiliadis, *Inorg. Chim. Acta* **1990**, 168, 275.
151. (a) M. Krumm, I. Mutikainen, B. Lippert, *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 884.
- (b) R. Menard, M. T. Phan Viet, M. Zador, *Inorg. Chim. Acta* **1987**, 136, 25.
- (c) M. Krumm, I. Mutikainen, B. Lippert, *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 884.
- (d) D. Holthenrich, E. Zangrando, E. Chiarparin, B. Lippert, L. Randaccio, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 4407.
- (e) R. Faggiani, B. Lippert, C. J. L. Lock, R. A. Speranzini, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 1111.
- (f) H. Schollhom, R. Beyerle-Pfnür, U. Thewalt, B. Lippert, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 3680.
- (g) B. Lippert, H. Schollhom, U. Thewalt, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6616.
- (h) F. Pichierri, D. Holthenrich, E. Zangrando, B. Lippert, L. Randaccio, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, 1, 439.
- (i) E. C. Fusch, B. Lippert, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7204.
- (j) J. Muller, E. Zangrando, N. Pahlke, E. Freisinger, L. Randaccio, B. Lippert, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 397.
152. (a) R. Fujii, I. Itaya, C. C. Wu, F. Tanaka, *Tetrahedron* **1971**, 27, 2415.
- (b) A. Iakovidis, N. Hadjiliadis, F. Dahan, J. P. Laussac, B. Lippert, *Inorg. Chim. Acta* **1990**, 175, 57.
- (c) A. Terzis, *Inorg. Chem.* **1976**, 15, 793.
- (d) B. Lippert, H. Schollhoren, U. Thewalt, *Inorg. Chim. Acta* **1992**, 198, 723.
- (e) J. D. Orbell, S. Solorzane, L. G. Marzilli, T. J. Kistenmacher, *Inorg. Chem.* **1982**, 21, 2630.
- (f) G. Schroder, J. Kozelka, M. Sabat, M. -H. Fouchet, R. Beyerle-Pfnür, B. Lippert, *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 1647.
153. (a) R. W. Gellert, R. Bau, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 7379.
- (b) R. E. Cramer, P. L. Dahlstrom, *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 3420.

- (c) J. Pandit, T. P. Seshadri, M. A. Viswamitra, *Acta Crystallogr. , Sect. C* **1983**, 39, 342.
- (d) S. Kasselouri, A. Garoufis, N. Hadjiliadis, *Inorg. Chim. Acta* **1987**, 135, L23.
- (e) S. V. Deshpande, R. K. Sharma, T. S. Srivastava, *Inorg. Chim. Acta* **1983**, 78, 13.
- (f) S. Kasselouri, A. Garoufis, N. Hadjiliadis, *Inorg. Chim. Acta* **1987**, 135, L23.
154. M. Sabat, K. A. Satyshur, M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 976.
155. (a) B. T. Khan, K. Najmuddin, S. Shamsuddin, S. M. Zakeeruddin *Inorg. Chim. Acta* **1990**, 170, 129.
- (b) J. Arpalahti, K. D. Klika, R. Sillanpaa, R. Kivekas, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, 1397.
156. (a) K. J. Barnham, C. J. Bauer, M. I. Cjuran, M. A. Mazid, R. Rau, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 2826.
- (b) P. I. Vestues, R. B. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 806.
- (c) I. Rombeck, B. Lippert, *Inorg. Chim. Acta* **1998**, 273, 31.
- (d) B. Song, G. Oswald, J. Zhao, B. Lippert, H. Sigel, *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 4857.
- (e) S. J. Bemers-Price, U. Prey, J. D. Ranford, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8649.
- (f) H. Sigel, B. Song, G. Oswald, B. Lippert, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1053.
- (g) M. Vicens, J. J. Fiol, A. Terron, V. Moreno, D. M. L. Goodgame, *Inorg. Chim. Acta* **1989**, 165, 131.
- (h) B. Song, G. Oswald, J. Zhao, B. Lippert, R. Sigel, *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 4857.
157. (a) R. Sigel, *Coord. Chem. Rev.* **1990**, 100, 453.
- (b) B. Lippert, *Gazz. Chim. Ital.* **1988**, 118, 153.
- (c) G. Oswald, I. Rombeck, B. Song, H. Sigel, B. Lippert, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, 3, 236.
- (d) L. Y. Kuo, M. G. Kanatzidis, M. Sabat, A. L. Tipton, T. J. Marks, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9027 .
- (e) L. Y. Kuo, M. G. Kanatzidis, T. J. Marks, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 7207.
- (f) U. K. Häring, R. B. Martin, *Inorg. Chim. Acta* **1983**, 78, 259.
- (g) M. A. Viswamitra, B. S. Reddy, G. H. -Y Lin, M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 4565.
158. (a) M. D. Reily, L. G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6785.
- (b) P. I. Vestues, R. B. Martin, *Inorg. Chim. Acta* **1981**, 55, 99.;

- (c) M. Vicens, J. J. Fiol, A. Terron, V. Moreno, D. M. L. Goodgame *Inorg. Chim. Acta* **1989**, 157, 127.
- (d) A. M. Calafat, J. J. Fiol, A. Terron, V. Moreno, D. M. L. Goodgame, I. Hussain, *Inorg. Chim. Acta* **1990**, 169, 133.
- (e) H. Sigel, C. F. Naumann, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 730.
- (g) H. Kozlowski, S. Wolowiek, B. Jezowska-Trzebiatowska, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, 562, 1.
159. (a) P. M. Takahara, C. A. Frederick, S. J. Lippard, *J Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 12309.
- (b) D. Yang, S. S. G. E. van Boom, J. Reedijk, J. H. van Boom, A. H. -J. Wang, *Biochemistry* **1995**, 34, 12912.
- (c) A. Gelasco, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1998**, 37, 9230.
- (d) S. U. Dunham, C. J. Turner, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 5395.
- (e) S. F. Bellon, J. H. Coleman, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1991**, 30, 8026.
- (f) P. M. Takahara, A. C. Rosenzweig, C. A. Rrederick, S. J. Lippard, *Nature* **1995**, 377, 649.
160. V. Scheller-Krattiger, K. H. Scheller, R. B. Martin, *Inorg. Chim. Acta* **1982**, 59, 281.
161. (a) M. J. J. Blommers, F. J. M. van de Ven, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, C. W. Hilbers, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 201, 33.
- (b) N. L. Fregeau, Y. Wang, R. T. Pon, W. A. Wylie, J. W. Lown, *J Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8917.
- (c) S. J. Sucheck, J. F. Ellena, S. M. Hecht, *J Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7450.
162. J. van Wijk, B. D. Huckriede, J. H. Ippel, C. Altona, *Methods Enzymol.* **1992**, 211, 286.
163. S. G. Kim, L. J. Lin, B. R. Reid, *Biochemistry* **1992**, 31, 3564.
164. (a) M. D. Reily, L. G. Marzilli, *J Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 8299.
- (b) G. I. Schweitzer, T. Mikita, G. W. Kellogg, K. H. Gardner, G. P. Beardsley, *Biochemistry* **1994**, 33, 11460.
- (c) R. V. Hosur, M. Ravikumar, K. V. R. Chary, A. Sheth, G. Govil, T. Zu-Kun, H. T. Miles, *FEBS Lett.* **1986**, 205, 71.
165. A. Majumdar, R. V. Hosur, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1992**, 24, 109.
166. (a) J. -P. Girault, G. Chottard, J. -Y. Lallemand, J. -C. Chottard, *Biochemistry* **1982**, 21, 1352.
- (b) J. H. J. den Hartog, C. Altona, J. -C. Chotard, J. -P. Girault, J. -Y. Lallemand, F. A. A. M. de Leeuw, A. T. M. Marcelis, J. Reedijk, *NucleicAcids Res.* **1982**, 10, 4715.

- (c) T. P. Kline, L. G. Marzilli, D. Live, G. Zon, *J Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7057.
- (d) K. Knagaki, H. Nakahara, M. Alink, Y. Kidani, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 4496.
- (e) J. H. J. den Hartog, C. Altona, J. H. van Boom, G. A. van der Marel, C. A. G. Haasnott, J. Reedijk, *J Biomol. Struct. Dynamics* **1985**, *2*, 1137.
- (f) F. Herman, J. Kozelka, V. Stoven, E. Guittet, J. -P. Girault, T. Huynh-Dinh, J. Igolen, J. -Y. Lallemand, J. -C. Chottard, *Eur. J Biochem.* **1990**, *194*, 119.
- (g) A. Gelasco, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1998**, *37*, 9230.
167. (a) T. Audhya, G. Goldstein, *Method. Enzymol.* **1985**, *116*, 279.
- (b) T. Audhya, D. H. Schlesinger, G. Goldstein, *Biochemistry* **1981**, *20*, 6195.
168. (a) L. Denes, B. Szende, G. Hajos, L. Szporny, K. Lapis, *Drugs Exp. Clin. Res.* **1987**, *13*, 279.
- (b) N. R. Krishna, D. -H. Huang, D. M. Chen, G. Goldstein, *Biochemistry* **1980**, *19*, 5557.
- (c) D. Tourwe, J. L. Decoen, K. Hallenga, G. Vanbinst, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1984**, *23*, 84.; B. Noszal, R. Kassaitanczos, J. Nyiri, O. Nyeki, I. Schon, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1991**, *38*, 139.
- (d) I. Sovago, C. Bertalan, L. Gobl, I. Schon, O. Nyeki, *J. Inorg. Biochem.* **1994**, *55*, 67.
- (e) B. Decocklereverend, L. Andrianarijaona, C. Livera, L. D. Pettit, I. Steel, H. Kozlowski, *J. Chem. Soc., Dalton trans.* **1986**, 2221.
- (f) I. Sovago, T. Kiss, A. Gergely, *Inorg. Chim. Acta* **1984**, *93*, L53.
- (g) I. Sovago, B. Radomska, I. Schon, O. Nyeki, *Polyhedron* **1990**, *9*, 825.
- (h) M. Veber, I. Horvath, K. Burger, *Inorg. Chim. Acta* **1985**, *108*, L21.
- (i) J. B. Vaughn Jr., R. L. Stephens, R. E. Lenkinski, N. R. Krishna, G. A. Heavner, G. Goldstein, *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *671*, 50.
169. (a) M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661.
- (b) V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik, V. Saudek, *J. Magn. Reson., Series A* **1993**, *102*, 241.
170. R. B. Martin, *Science* **1963**, *139*, 1198.

2. Übersicht über die beschriebenen Verbindungen

1	Pd(TyrLys)Cl
2	Pd(TyrLys)Pd(TyrLys)
3	Pd(GlyLys)Cl
4	Pd(GlyLys)Pd(GlyLys)Cl
5	Pd(LysGly)Cl
6	Pd(LysGly)Pd(LysGly)Cl
7	Pd(L-Tyr-L-Lys)(5' dGMP-N7)
8	[Pd(L-Tyr-L-Lys)] ₂ (5' dGMP-N1/N7)
9	Pd(L-Tyr-L-Lys)(5' dGMP-N1)
10	Pd(Gly-L-Lys)(5' dGMP-N7)
11	[Pd(Gly-L-Lys)] ₂ (5' dGMP-N1/N7)
12	Pd(Gly-L-Lys)(5' dGMP-N1)
13	Pd(L-LysGly)(5' dGMP-N7)
14	[Pd(L-LysGly)] ₂ (5' dGMP-N1/N7)
15	Pd(L-LysGly)(5' dGMP-N1)
16	Pd(L-Tyr-L-Lys)(5' dCMP-N3)
17	[Pd(L-Tyr-L-Lys)] ₂ (5' dCMP-N3/N4)
18	Pd(Gly-L-Lys)(5' dCMP-N3)
19	[Pd(Gly-L-Lys)] ₂ (5' dCMP-N3/N4)
20	[Pd(Gly-L-Lys)] ₂ (5' dCMP-N4)
21	Pd(ArgLysAsp)
22	Pd(GlyLysHis)
23	Pd(AspAlaHisLys)