



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

Мр Марија Д. Живковић

**ХИДРОЛИЗА ПЕПТИДА КОЈИ САДРЖЕ L-МЕТИОНИН И
L-ХИСТИДИН ПОМОЋУ РАЗЛИЧИТИХ КОМПЛЕКСА
ПАЛАДИЈУМА(II) И ПЛАТИНЕ(II)**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2012.

Аутор

Име и презиме: Марија Д. Живковић
Датум и место рођења: 10. 04. 1979., Крагујевац
Садашње запослење: асистент
Наслов: Хидролиза пептида који садрже L-метионин и L-хистидин помоћу различитих комплекса паладијума(II) и платине(II)
Број старница: 126 (+35)
Број слика: 49
Број библиографских података: 136
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна област (УДК): Хемија(54) - Неорганска хемија(546)
Ментор: Проф. др Милош И. Ђуран

Оцена и одбрана

Датум и пријава теме: 30. 06. 2010. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 850/VI-1 од 22. 09. 2010.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:

1. Др Милош И. Ђуран, редовни професор Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна област: Неорганска хемија
2. Др Катарина Анђелковић, редовни професор Хемијски факултет, Београд
Научна област: Неорганска хемија
3. Др Снежана Рајковић, доцент Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна област: Неорганска хемија

Комисија за оцену докторске дисертације:

1. Др Милош И. Ђуран, редовни професор Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна област: Неорганска хемија
2. Др Живадин Д. Бугарчић, редовни професор Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна област: Неорганска хемија
3. Др Катарина Анђелковић, редовни професор Хемијски факултет, Београд
Научна област: Неорганска хемија
4. Др Снежана Рајковић, доцент Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна област: Неорганска хемија

Комисија за одбрану докторске дисертације:
Датум одбране дисертације: 2012.

Већ дужи низ година постоји интерес за изучавања у области координационе хемије платине(II) и паладијума(II). Ова истраживања добијају у својој актуелности, нарочито након открића антитуморске активности комплекса платине(II) и платине(IV). Комплекси паладијума(II) не показују антитуморску активност, али се користе као *модел-молекули* преко којих се може објаснити механизам антитуморског деловања одговарајућих комплекса платине. Откриће да комплекси паладијума(II) и платине(II) катализују селективну хидролизу пептидне везе у пептидима и протеинима, при врло благим експерименталним условима, отвара могућност да се ови комплекси у будућности користе као синтетичке металопептидазе. Због тога су, у току последње две деценије, реакције комплекса паладијума(II) и платине(II) са пептидима предмет интензивних изучавања у истраживачкој групи проф. Милоша Ђурана. Предмет ове докторске дисертације представља наставак ових истраживања и односи се на испитивање реакција комплекса платине(II) и паладијума(II) са пептидима који садрже аминокиселине L-метионин и L-хистидин. Ова истраживања су рађена у Институту за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу и део су програма пројекта (Пројекат: 172036), који финансира Министарство просвете и науке Републике Србије. Тему за докторску дисертацију предложио је др Милош И. Ђуран, редовни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, коме се захваљујем на разумевању, стрпљењу, подршци и помоћи током израде ове докторске дисертације.

Велику захвалност дугујем др Снежани Рајковић, доценту Природно-математичког факултета у Крагујевцу, на помоћи у току израде и писања ове дисертације. Посебну захвалност изражавам проф. др Уршули Рихлевској (Urszula Rychlewska) и њеним сарадницима са Универзитета Адам Мицкијевич у Познању

(Пољска) који су урадили рендгеноструктурну анализу комплекса паладијума(II) и значајно допринели интерпретацији резултата који се односе на структуру комплекса.

Захваљујем се професору др Живадину Д. Бугарчићу са Природно-математичког факултета у Крагујевцу и професору др Катарини Анђелковић са Хемијског факултета у Београду за корисне савете и сугестије у току писања дисертације, као и за учешће у комисији за оцену и одбрану докторске дисертације.

Захвалност дугујем проф. др В. Бал (Wojciech Bal) и његовим сарадницима из Института за биофизику и биохемију, Пољске академије наука у Варшави, који ми је омогућио да проведем веома корисних месец дана у његовој лабораторији на истраживањима која се односе на хидролозу протеина у присуству јона прелазних метала.

Искрену захвалност изражавам свим сарадницима из лабораторије професора М. Ђурана за корисне дискусије и пријатне часове дружења током израде ове докторске дисертације.

Највећу захвалност дугујем мојим родитељима, оцу Драгану и мајци Мирјани, сестри Ани и пријатељима на разумевању и стрпљењу које су ми пружали током израде ове докторске дисертације.

Крагујевац, 2012.

Списак радова и саопштења мр Марије Д. Живковић

1. Научни радови објављени у међународним научним часописима*

*Радови под бројем 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 и 1.7 су у оквиру теме за докторску дисертацију

- 1.1 M. D. Živković, S. Rajković, U. Rychlewska, B. Warżajtis and M. I. Djuran**
Study of the reactions of methionine- and histidine-containing peptides with palladium(II) complexes: Key role of steric crowding on palladium(II) in selective cleavage of the peptide bond
Polyhedron, **26** (2007) 1541-1549. **M21**
- 1.2 M. D. Živković, S. Rajković, M. I. Djuran**
Reaction of [Pt(Gly-Gly-*N,N',O*)I]⁻ with the N-acetylated dipeptide L-methionyl-L-histidine: Selective platination of the histidine side chain by intramolecular migration of the platinum(II) complex
Bioorganic Chemistry, **36(3)** (2008) 161-164. **M22**
- 1.3 S. Rajkovic, B. D. Glisic, M. D. Živković, M. I. Djuran,**
Hydrolysis of the amide bond in methionine-containing peptides catalyzed by various palladium(II) complexes: Dependence of the hydrolysis rate on the steric bulk of the catalyst
Bioorganic Chemistry, **37(5)** (2009) 173-179. **M22**
- 1.4 S. Rajković, M. D. Živković, C. Kállay, I. Sóvágó, M. I. Djuran,**
A study of the reactions of a methionine- and histidine-containing tetrapeptide with different Pd(II) and Pt(II) complexes: The selective cleavage of the amide bond by platination of the peptide and steric modification of the catalyst
Dalton Transactions, 2009, 8370-8377. **M21**
- 1.5 B. Đ. Glišić, S. Rajković, M. D. Živković, M. I. Djuran**
A comparative study of complex formation in the reactions of gold(III) with Gly-Gly, Gly-L-Ala and Gly-L-His dipeptides
Bioorganic Chemistry, **38** (2010) 144-148. **M23**
- 1.6 U. Rychlewska, B. Warżajtis, B. Đ. Glišić, M. D. Živković, S. Rajković, M. I. Djuran**
Monocationic gold(III) Gly-L-His and L-Ala-L-His dipeptide complexes: crystal structures arising from solvent free and solvent-containing crystal formation and structural modifications tuned by counter-anions
Dalton Transactions, **39** (2010) 8906-8913. **M21**

1.7 M. D. Živković, D. P. Ašanin, S. Rajković and M. I. Djuran

Hydrolysis of the amide bond in *N*-acetylated L-methionylglycine catalyzed by various platinum(II) complexes under physiologically relevant conditions

Polyhedron, **30(6)** (2011) 947-952.

M21

2. Саопштења на међународним научним конференцијама штампана у изводу

2.1 Marija D. Živkovic, Snežana Rajković, Miloš I. Djuran, Urszula Rychlewska

Studies of the interactions of palladium(II) complexes with histidine- and methionine-containing peptides: effects of the mode of coordination on hydrolytic reactions

5st International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Ohrid, Vol. 1, September 10-14, 2006, BCH51

2.2 Marija D. Živkovic, Snežana Rajković, Miloš I. Djuran

Reactions of platinum(II) complexes with sulfur- and nitrogen-containing biomolecules: selective intra- and intermolecular migration of *S*-bound platinum(II) complex to imidazole and guanine nitrogen atoms

13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Vienna, Austria, July 15-20, 2007, P041.

2.3 Snežana Rajković, Marija D. Živković, Imre Sóvágó, Miloš I. Djuran

Selective hydrolysis of the unactivated peptide bond in *N*-acetylated methionyl-glycyl-histidyl-glycineamide by promoted by various palladium(II) complexes

6st International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Sofia, September 10-14, 2008, 3-P36.

2.4 Marija D. Živković, Biljana Glišić, Snežana Rajković, Miloš I. Djuran

Gold(III) complexes with histidine- and methionine containing peptides: The reactions studies and complexes characterization

6st International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, Sofia, September 10-14, 2008, 3-P34.

2.5 S. Rajković, B. Đ. Glišić, M. D. Živković, M. I. Djuran

Hydrolysis of the amide bond in methionine-containing peptides catalyzed by various palladium(II) complexes: Dependence of the hydrolysis rate on the steric bulk of the catalyst

10th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, Debrecen, September 25-28, 2009, P41.

2.6 B. Đ. Glišić, **M. D. Živković**, S. Rajković, M. I. Djuran, B. Warżajtis, U. Rychlewska
Gold(III) complexes of the histidine-containing peptides: syntheses, spectroscopic and structural characterization

10th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, Debrecen, September 25-28, 2009, P42.

2.7 **M. D. Živković**, D. P. Ašanin, S. Rajković, M. I. Djuran

Selective hydrolysis of the amide bond in *N*-acetylated L-methionylglycine catalyzed by various platinum(II) complexes under physiological conditions

10th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Thessaloniki, Greece, June 22-26, 2010. PO 282

3. Саопштења на националним научним конференцијама штампана у изводу

3.1 B. Đ. Glišić, **M. D. Živković**, S. Rajković, M. I. Djuran

¹H NMR characterization of gold(III) and platinum(II) complexes with tripeptide glycyl-glycyl-L-methionine

XLVII savetovanje srpskog hemijskog društva, Beograd, 21. mart 2009. godine, NH-04.

3.2 **M. D. Živković**, B. Đ. Glišić, S. Rajković and M. I. Djuran

¹H NMR study of the reactions of a methionine-containing peptides with different Pd(II) complexes: the selective cleavage of the amide bond and steric effects on the catalyst

XLVII savetovanje srpskog hemijskog društva, Beograd, 21. mart 2009. godine, NH-09.

3.3 N. Drašković, D. Ašanin, **M. D. Živković**, S. Rajković

¹H NMR study of the reactions of a methionine- and histidine-containing peptides with different antitumor active platinum(II) complexes

Scientific conference with international participation. Preclinical testing of active substances and cancer research, Kragujevac, Serbia, March 16-19, 2011, P6

СКРАЋЕНИЦЕ

^{195}Pt NMR	платина-195 нуклеарна магнетна резонанца
Gly-Gly	глицил-глицин
Gly-Gly-Gly	глицил-глицил-глицин
Gly-L-Ala	глицил-L-аланин
L-Met	L-метионин
Gly-L-Met	глицил-L-метионин
L-Met-Gly	L-метионил-глицин
L-Met-Gly-Gly	L-метионил-глицил-глицин
Gly-Gly-L-Met	глицил-глицил-L-метионин
Gly-L-Met-Gly	глицил-L-метионил-глицин
Ala-L-Met	аланил-L-метионин
L-Val-L-Val	L-валинил-L-валин
L-Val-L-Leu	L-валинил-L-леуцин
L-Leu-L-Val	L-леуцил-L-валин
γ -Glu-Cys-Gly	γ -глутамил-цистеинил-глицин
5'-GMP	гуанозин-5'-монофосфат
^1H NMR	протонска нуклеарна магнетна резонанца
^{13}C NMR	угљеник-13 нуклеарна магнетна резонанца
^{15}N NMR	азот-15 нуклеарна магнетна резонанца
SGH	редуковани глутатион
<i>cis</i> -DDP	<i>cis</i> -диаминдихлороплатина(II)
^1D i ^2D NMR	једнодимензионална и дводимензионална NMR
L-Ala-L-Ala	L-аланил-L-аланин
L-Ala-D-Ala	L-аланил-D-аланин
L-Leu-L-Leu	L-леуцил-L-леуцин
L-Ala-L-Leu	L-аланил-L-леуцин
L-Ala-Ser	L-аланил-серин
L-Leu-L-Ala	L-леуцил-L-аланин
L-Leu-D-Ala	L-леуцил-D-аланин
Gly-L-His	глицил-L-хистидин
L-Ala-L-His	L-аланил-L-хистидин
L-Ala-D-His	L-аланил-D-хистидин
L-Met-L-His	L-метионил-L-хистидин
L-His-L-Met	L-хистидил-L-метионин
IR	инфра-црвени
CD	циркуларно-дихроични

MS	масена спектрометрија
HPLC	течна хроматографија под високим притисцима
CSD	Cambridge Structural Database
Å	ангстрем
Gly-L-Phe	глицил-L-фенилаланин
Phe-Ala-Gly	фенилаланил-аланил-глицин
L-Ala-L-Tyr	L-аланил-L-тирозин
D-Leu-Tyr	D-леуцил-тирозин
L-Tyr-Gly-Gly	L-тирозил-глицил-глицин
L-Cys-Gly	L-цистеинил-глицин
Gly-Gly-L-Cys	глицил-глицил-L-цистеин
UV	ултра-љубичаста спектроскопија
DMF	диметилформаид
DMSO	диметилсулфоксид
Gly-SMC	глицил-S-метил-цистеин
SMC-Gly	S-метил-цистеинил-глицин
SMC-SMC	S-метил-цистеинил-S-метил-цистеин
Gly-L-His-Gly	глицил-L-хистидил-глицин
Gly-L-His-Lys	глицил-L-хистидил-лизин
Gly-Gly-L-His	глицил-глицил-L-хистидин
Gly-L-Tyr	глицил-L-тирозин
CNBr	цијаноген-бромид
BNPS	3-бром-3-метил-2-(2'-нитрофенилсулфенил)-индолеин
try	2,2',2''-терпиридин
BSA	протеин серум албумин
HAS	хумани серум албумин
H2A	хистон
IgG ₁	хумани имуноглобулин
HEPES	N-(2-хидроксиетил)-пиперазин-N'-3-пропан-сулфонска киселина
edta	анјон етилендиаминтетрасирћетне киселина
en	етилендиамин
dtco	1,5-дитиоциклооктан
dtco-OH	1,5-дитиоциклооктан-3-ол
py	пиридин
bpy	2,2'-бипиридин
dien	Диетилентриамин
dach	1,2-диаминциклохексан
dth	2,5-дитиохексан
sol	солвент
MeCOMet-Gly	N-ацетилметионил-глицин

MeCOMet	<i>N</i> -ацетилметионин
MeCOGly	<i>N</i> -ацетилглицин
MeCOCys	<i>N</i> -ацетилцистеин
Leu-Gly	леуцил-глицин
Gly	глицин
Ala	аланин
Ser	серин
Val	валин
Leu	леуцин
Thr	треонин
Phe	фенилаланин
Tyr	тирозин
Lys	лизин
Cys	цистеин
Gln	глутамин
Glu	глутаминска киселина
Pro	пролин
Ile	изолеуцин
MeCOMeCys-Gly	<i>N</i> -ацетил- <i>S</i> -метил-цистеинил-глицин
MeCOMeCys-Sar	<i>N</i> -ацетил- <i>S</i> -метил-цистеинил-саркозин
Me ₄ en	<i>N,N,N',N'</i> -тетраметилетилендиамин
DNK	дезоксирибонуклеинска киселина
RNK	рибонуклеинска киселина
MeCOMet-Ala	<i>N</i> -ацетилметионил-аланин
MeCOMet-Pro	<i>N</i> -ацетилметионил-пролин
MeCOSer-Met	<i>N</i> -ацетилсерил-метионин
MeCOHis-Gly	<i>N</i> -ацетилхистидил-глицин
MeCOHis(N1-Me)-Gly	<i>N</i> 1-метил- <i>N</i> -ацетилхистидил-глицин
MeCOHis(N3-Me)-Gly	<i>N</i> 3-метил- <i>N</i> -ацетилхистидил-глицин
MeCOGly-His	<i>N</i> -ацетилглицил-хистидин
MeCOGly-His-Gly	<i>N</i> -ацетилглицил-хистидил-глицин
MeCOHis-Ser	<i>N</i> -ацетилхистидил-серин
MeCOHis-Thr	<i>N</i> -ацетилхистидил-треонин
MeCOHis	<i>N</i> -ацетилхистидин
MeCOHis(N1-Me)	<i>N</i> 1-метил- <i>N</i> -ацетилхистидин
MeCOHis(N3-Me)	<i>N</i> 3-метил- <i>N</i> -ацетилхистидин
MeCOGly-Gly-His-Gly	<i>N</i> -ацетилглицил-глицил-хистидил-глицин
MeCOTrp-Val	<i>N</i> -ацетилтриптофанил-валин
MeCOGly-Gly-His	<i>N</i> -ацетил-глицил-глицил-хистидин
TFE	трифлуороетанол
kDa	килодалтон
MeCOMeCys-His-Ala	<i>N</i> -ацетил- <i>S</i> -метил-цистеинил-хистидил-аланин

SDS-PAGE

Ser-His

MeCOAla-His

MeCOSer-His

H₂en²⁺

ppm

1,2-pn

ibn

Meen

Na-додецил-сулфат полиакриламид гел
електрофореза

серил-хистидин

N-ацетил-аланил-хистидин

N-ацетил-серил-хистидин

протоновани етилендиамин

делова на милион

1,2-пропилендиамин

изобутилендиамин

N-метилетилендиамин

САДРЖАЈ

ИЗВОД.....	I
SUMMARY.....	V
1. ОПШТИ ДЕО	1
1.1. ХИДРОЛИЗА ПЕПТИДА ПОМОЋУ КОМПЛЕКСА ПРЕЛАЗНИХ МЕТАЛА.....	3
1.1.1 ХИДРОЛИЗА ПЕПТИДА ПОМОЋУ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) И ПАЛАДИЈУМА(II).....	7
Хидролиза пептида који садрже аминокиселине L-метионин и L-цистеин помоћу комплекса платине(II) и паладијума(II).....	12
<i>Хидролиза пептида помоћу комплекса платине(II).....</i>	12
<i>Хидролиза пептида помоћу комплекса паладијума(II).....</i>	19
<i>Механизам хидролизе пептида који садрже аминокиселине L-метионин и L- цистеин помоћу комплекса платине(II) и паладијума(II).....</i>	21
Хидролиза пептида који садрже аминокиселину L-хистидин помоћу комплекса паладијума(II) и платине(II).....	27
<i>Циклус катализатора у реакцијама хидролизе пептида који садрже хистидин.....</i>	38
Реакције комплекса платине(II) са пептидима који садрже аминокиселине L-хистидин и L-метионин.....	39
<i>Реакције са $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ комплексом.....</i>	39
<i>Реакције $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ комплексом.....</i>	43
Хидролиза пептида који садрже аминокиселину L-триптофан помоћу комплекса паладијума(II) и платине(II).....	46
1.2 ХИДРОЛИЗА ПРОТЕИНА ПОМОЋУ КОМПЛЕКСА ПРЕЛАЗНИХ МЕТАЛА.....	48
2. ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА	54

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	56
3.1 Хемикалије и реагенси.....	56
3.2 Ацетиловање терминалне амино групе у пептидима.....	57
3.3 Добијање $[Pd(L)Cl_2]$ комплекса.....	57
3.4 Добијање $[Pd(L)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса.....	58
3.5 Добијање $[Pt(L)Cl_2]$ комплекса.....	58
3.6 Добијање $[Pt(L)(CBDSA-O,O')]$ комплекса.....	59
3.7 Добијање $[Pd(dpa)_2]Cl_2 \cdot 4H_2O$ комплекса.....	60
3.8 Добијање $[Pt(dien)Cl]Cl$ комплекса.....	61
3.9 Добијање $K[Pt(Gly-Gly-N,N',O)]$ комплекса.....	61
3.10 Мерење рН вредности.....	62
3.11 Микроанализе.....	62
3.12 NMR (1H и ^{13}C) мерења.....	62
3.13 Потенциометријска мерења.....	63
3.14 Рендгенска структурна анализа.....	64
4. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА	66
4.1 ХИДРОЛИЗА ПЕПТИДА КОЈИ САДРЖЕ L-МЕТИОНИН И L-ХИСТИДИН ПОМОЋУ РАЗЛИЧИТИХ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) И ПЛАТИНЕ(II).....	66
4.1.1 ИСПИТИВАЊЕ РЕАКЦИЈА КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) СА ПЕПТИДИМА.....	67
Испитивање реакција Met-Gly и His-Gly дипептида са $[Pd(dpa)Cl_2]$ и $[Pd(dpa)(H_2O)_2]^{2+}$ комплексима.....	69
Опис кристалне структуре $[Pd(dpa)_2]Cl_2 \cdot 4H_2O$ комплекса.....	72
Испитивање реакција хидролизе MeCOMet-Gly и MeCOHis-Gly дипептида у присуству $[Pd(dpa)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса.....	76
Хидролиза MeCOMet-Gly дипептида.....	76
Хидролиза MeCOHis-Gly дипептида.....	80
Хидролиза пептида који садрже L-метионин помоћу $[Pd(L)(H_2O)_2]^{2+}$ -типа комплекса.....	82
Хидролиза MeCOMet-Gly-Gly трипептида.....	83
Хидролиза MeCOGly-Met-Gly трипептида.....	85
Испитивање реакција MeCOMet-Gly-His-GlyNH ₂ тетрапептида са различитим Pd(II) и Pt(II) комплексима.....	89

<i>Потенциометријска испитивања реакција $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ са $MeCOMet-Gly-His-GlyNH_2$.....</i>	90
<i>Хидролиза N-ацетилованог тетрапептида $MeCOMet-Gly-His-GlyNH_2$ у присуству $[M(en)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса ($M = Pd(II)$ и $Pt(II)$).....</i>	92
<i>Хидролиза $[Pt(dien)(MeCOMet-Gly-His-GlyNH_2-S)]^{2+}$ у присуству $[Pd(L)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса.....</i>	97
4.1.2 ИСПИТИВАЊЕ РЕАКЦИЈА КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) СА ПЕПТИДИМА КОЈИ САДРЖЕ L-МЕТИОНИН И L-ХИСТИДИН.....	103
<i>Селективна интрамолекулска миграција комплекса платине(II) у реакцији између $[Pt(Gly-Gly-N,N',O)I]^-$ и $MeCOMet-His$.....</i>	104
<i>Испитивање реакција хидролизе пептидне везе у $MeCOMet-Gly$ помоћу различитих $[Pt(L)Cl_2]$ и $[Pt(L)(CBDSA-O,O')]$ комплекса.....</i>	110
4.2 ЗАКЉУЧАК.....	118
ЛИТЕРАТУРА	120
БИОГРАФИЈА	126

ИЗВОД

Испитивања реакција комплекса паладијума(II) и платине(II) са пептидима и протеинима су показала да ови комплекси представљају добре каталитичке реагенси за хидролитичко раскидање пептидних веза у овим молекулима. Ови комплекси се координују за хетероатом у бочном низу аминокиселине L-метионина или L-хистидина и катализују раскидање пептидне везе која садржи карбоксилну групу неке од наведених аминокиселина. Иако је ова област интензивно изучавана у току претходних неколико деценија, селективност и механизам раскидања пептидне везе у пептидима који садрже L-метионин и L-хистидин помоћу Pd(II) и Pt(II) комплекса још увек нису потпуно објашњени. У циљу њиховог дефинисања неопходно је детаљније изучавати каталитички утицај комплекса Pd(II) и Pt(II) на реакције хидролизе пептида који садрже L-метионин и L-хистидин. У овој дисертацији приказани су резултати спектроскопских испитивања хидролитичких реакција пептида који садрже L-метионин и L-хистидин у присуству различитих комплекса Pd(II) и Pt(II).

Применом ^1H NMR спектроскопије, изучаване су реакције $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса (dpa је бидентатно координован 2,2'-дипиридиламин) са пептидима L-метионил-глицином (Met-Gly), L-хистидил-глицином (His-Gly) и N-ацетилованим дериватима ових дипептида (MeCOMet-Gly и MeCOHis-Gly). Све реакције су испитиване у pH области од 2,0 до 2,5 и на температури од 25 и 60 °C. Нађено је да у реакцијама $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са Met-Gly и His-Gly дипептидима не долази до хидролизе пептидне везе. Крајњи производ ових реакција је $[\text{Pd}(\text{dpa})_2]^{2+}$ комплекс код кога су два dpa лиганда бидентатно

координована за Pd(II) јон. Квадратно-планарна структура овог комплекса је потврђена помоћу рендгеноструктурне анализе. Међутим, у реакцији $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са MeCOHis-Gly и MeCOMet-Gly, при истим експерименталним условима, долази до региоселективне хидролизе Met-Gly пептидне везе. Начин координације $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса у реакцији са неацетилованим пептидима, као и потпуна инхибиција реакције хидролизе MeCOHis-Gly дипептида у присуству $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса, могу се објаснити утицајем стерног ефекта Pd(II) комплекса. У наставку ових истраживања испитиване су реакције $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса (L је бидентатно координован 2,2'-дипиридиламин, dpa; 2-пиколиламин, pic; етилендиамин, en) са *N*-ацетилованим пептидима L-метионил-глицил-глицином (MeCOMet-Gly-Gly) и глицил-L-метионил-глицином (MeCOGly-Met-Gly). Ове реакције су испитиване у pH области од 2,0 до 2,5 и на температури од 60 °C. Нађено је да $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, $[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекси катализују селективну хидролизу Met-Gly пептидне везе у MeCOMet-Gly-Gly трипептиду. Међутим, хидролиза MeCOGly-Met-Gly трипептида помоћу поменутога три Pd(II) комплекса није селективна и хидролизују Met-Gly и MeCO-Gly пептидне везе. На основу UV-VIS спектрофотометријских мерења нађено је да је монодентатна координација атома сумпора метионинског остатка за одговарајући Pd(II) комплекс фаза која одређује брзину реакције хидролизе. Поред тога, брзина хидролизе пептидне везе зависи од природе бидентатно координованог диаминског лиганда (en > pic > dpa). Све реакције хидролизе MeCOMet-Gly-Gly трипептида који садржи *N*-терминални метионин помоћу $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса су региоселективне, док је хидролиза MeCOGly-Met-Gly трипептида неселективна и раскидају се две пептидне везе (Met-Gly и MeCO-Gly).

Такође, применом ^1H NMR спектроскопије, испитиване су реакције $[\text{M}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса (M = Pd(II) или Pt(II)) са *N*-ацетилованим тетрапептидом L-метионил-глицил-L-хистидил-глицинамидом (MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂), у pH области од 1,5 до 2,0 и на температури од 60 °C. У свим испитиваним реакцијама, након координације атома сумпора метионинског остатка за $[\text{M}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекс, долази до селективне хидролизе Met-Gly пептидне везе. Селективно раскидање ове пептидне везе може се објаснити великим афинитетом Pt(II) и Pd(II) јона према атому сумпора. Применом потенциометријских мерења и ^1H NMR спектроскопије испитиван је механизам каталитичког деловања, као и утицај стерног

ефекта различитих $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса, на реакцију хидролизе пептидне везе која садржи карбоксилну групу хистидина у тетрапептиду $\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2$. Све реакције су испитиване при претходно поменутиим експерименталним условима, тако што је у првој фази $\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2$ реаговао са еквимоларном количином $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ комплекса (*dien* је диетилентриамин), при чему настаје $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ комплекс. Нађено је да у реакцији $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ долази до хидролизе His-GlyNH_2 пептидне везе, као и да је брзина хидролизе $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ у реакцији са $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексом већа од брзине хидролизе овог супстрата у реакцији са $[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, док је у случају реакције $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ са $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексом његова хидролиза потпуно инхибирана.

У другом делу ове дисертације, применом ^1H NMR спектроскопије, испитиване су реакције монофункционалног $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-}N,N',O)\text{I}]^-$ комплекса, где је Gly-Gly глицил-глицин који је тридентатно координован за $\text{Pt}(\text{II})$ јон преко два атома азота и атома кисеоника карбоксилне групе, са *N*-ацетилованим дипептидом *L*-метионил-*L*-хистидином (MeCOMet-His). Све реакције су извођене у 50 mM фосфатном пуферу на $\text{pH} = 7,4$ и на 25 °C. У првој фази реакције долази до формирања кинетички фаворизованог $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-}N,N',O)(\text{MeCOMet-His-S})]^-$ комплекса са монодентатном координацијом MeCOMet-His дипептида, преко атома сумпора метионинског остатка, за $\text{Pt}(\text{II})$. Затим, у другој фази реакције долази до интрамолекуларске миграције $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-}N,N',O)]$ комплекса са атома сумпора на N3 атом азота имидазоловог прстена хистидина, при чему настаје $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-}N,N',O)(\text{MeCOMet-His-N3})]^-$ комплекс. У поређењу са претходно добијеним резултатима у реакцији $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ комплекса са различитим пептидима који садрже метионин и хистидин, у овом случају реакција миграције је знатно бржа и селективна, тако да $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-}N,N',O)]$ комплекс мигрира искључиво на N3 атом азота имидазоловог прстена хистидина.

На крају, примењујући физиолошке услове pH и температуре, испитиване су реакције хидролизе *N*-ацетилованог *L*-метионил-глицина (MeCOMet-Gly) у присуству различитих $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O,O}')]$ комплекса ($\text{L} =$ етилендиамин, *en*; (\pm)-*trans*-1,2-диаминоциклохексан, *dach*; (\pm)-1,2-пропилендиамин, 1,2-*pn*; CBDCA је анјон 1,1-циклобутандикарбоксилне киселине). Све реакције су испитиване помоћу ^1H NMR спектроскопије у 50 mM фосфатном пуферу на $\text{pH} = 7,4$

и на температури од 37 °C. При овим експерименталним условима долази до веома споре хидролизе Met–Gly пептидне везе након формирања хидролитички активног интермедијерног $[\text{Pt}(\text{L})(\text{MeCOMet-Gly-S})(\text{H}_2\text{O})]^+$ комплекса. На основу добијених резултата закључено је да је реакција хидролизе MeCOMet–Gly дипептида бржа у случају Pt(II) комплекса који садрже хлоридо лиганд у односу на одговарајуће Pt(II) комплексе са CBDSA лигандом. Такође, испитиван је стерни ефекат Pt(II) комплекса на хидролизу пептида, при чему је нађено да брзина хидролизе пептида опада са повећањем стерног ефекта Pt(II) комплекса и то у следећем низу en > 1,2-pn > dach.

SUMMARY

Studies of the palladium(II) and platinum(II) complexes have shown that they can be promising reagents for hydrolytic cleavage of peptides and proteins. These complexes bind to the heteroatom in the side chain of methionine or histidine and promote cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of this anchoring amino acid. The consistent regioselectivity in the cleavage of histidine- and methionine-containing peptides promoted by palladium(II) and platinum(II) complexes and the mechanism of these hydrolytic reactions are not completely understood yet. A better knowledge of the coordination chemistry of histidine- and methionine-containing peptides with palladium(II) and platinum(II) complexes is necessary for understanding the regioselectivity of peptide and protein cleavage promoted by such complexes.

In this thesis, the reactions of palladium(II) complexes, $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ and $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (dpa is 2,2'-dipyridylamine acting as a bidentate ligand) with the dipeptides methionylglycine (Met-Gly) and histidylglycine (His-Gly), and the *N*-acetylated derivatives of these dipeptides, MeCOMet-Gly and MeCOHis-Gly have been studied by ^1H NMR spectroscopy. All reactions were carried out in the pH range 2.0–2.5 with equimolar amounts of the palladium(II) complex and the peptide at two different temperatures, 25 and 60 °C. In the reactions of $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ and $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ with Met-Gly and His-Gly, no hydrolysis of the peptide bond was observed. The final product in these reactions was the $[\text{Pd}(\text{dpa})_2]^{2+}$ complex. The square-planar structure of this complex was confirmed by X-ray analysis. The reaction of the $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex with the MeCOHis-Gly and MeCOMet-Gly peptides under the previously mentioned experimental conditions was remarkably selective in the cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine in the side chain. The modes of coordination

of $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ and $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ in the reactions with the nonacetylated peptides and the total steric inhibition of the hydrolytic reaction between $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and MeCOHis-Gly can be attributed to the steric bulk of the palladium(II) complex.

Furthermore, the ^1H NMR spectroscopy was applied to study the reactions of $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complexes (L is en, pic and dpa) with the *N*-acetylated tripeptides L-methionylglycylglycine, MeCOMet-Gly-Gly, and glycyl-L-methionyl-glycine, MeCOGly-Met-Gly. All reactions were performed in the pH range 2.0–2.5 with equimolar amounts of the $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex and the tripeptide at 60 °C. The hydrolytic reactions of the $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, $[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complexes with MeCOMet-Gly-Gly were regioselective and only the amide bond involving the carboxylic group of methionine was cleaved. However, in the reactions of these three Pd(II) complexes with MeCOGly-Met-Gly, two amide bonds, Met-Gly and MeCO-Gly, were cleaved. From UV-Vis spectrophotometry studies, it was found that the rate-determining step of these hydrolytic reactions is the monodentate coordination of the corresponding Pd(II) complex to the sulfur atom of the methionine side chain. The rate of the cleavage of these amide bonds is dependent on the nature of the bidentate coordinated diamine ligand L (en > pic > dpa). The hydrolytic reaction of $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -type complexes with MeCOMet-Gly-Gly, containing the methionine side chain in the terminal position of the peptide, is regioselective while in the reaction of these Pd(II) complexes with MeCOGly-Met-Gly, none selective cleavage of the peptide occurs.

Also this work deals, with the proton NMR investigations of the reactions of $[\text{M}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complexes (M = Pd(II) and Pt(II)) with the *N*-acetylated methionylglycyl-histidyl-glycineamide, MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂. All reactions were performed in the pH range 1.5–2.0 with equimolar amounts of the $[\text{M}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex and the tetrapeptide at 60 °C. In all these reactions, a metal(II) complex bound to a methionine residue affects the regioselective cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine. The priority in the cleavage of the Met-Gly amide bond in relation to the other amide bonds in this peptide is due to the high affinity of Pt(II) and Pd(II) ions for the sulfur donor atom. The mechanism of these hydrolytic reactions is discussed and, for its clarification, the reaction of the $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex with MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ was additionally investigated by potentiometric titration. The steric effects of the various palladium(II) complexes of the type $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, in which L is a chelating diamine (ethylenediamine, en, 2-picolylamine, pic, or 2,2-dipyridylamine, dpa) on the hydrolytic cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of histidine in the

MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ tetrapeptide were also studied by ¹H NMR spectroscopy. All reactions were performed under the above-mentioned conditions and in the initial stage of these reactions, the MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ was reacted with an equimolar amount of the [Pt(dien)Cl]⁺ complex (dien is diethylenetriamine) and then the monoplated [Pt(dien)(MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂-S)]²⁺ complex was treated with an equimolar amount of [Pd(L)(H₂O)₂]²⁺. It was found that the rate of hydrolysis of the His-GlyNH₂ amide bond in [Pt(dien)(MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂-S)]²⁺ decreased from the en to the pic complex, with finally a total inhibition of this reaction with [Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺.

In the second part of this work, the reaction of the monofunctional [Pt(Gly-Gly-*N,N',O*)I]⁻ complex, in which Gly-Gly is the dipeptide glycyl-glycine coordinated through two nitrogen and oxygen atoms, with the *N*-acetylated dipeptide L-methionyl-L-histidine (MeCOMet-His) studied by ¹H NMR spectroscopy. All reactions were carried out in 50 mM phosphate buffer at pD 7.4 and at 25 °C. In the initial stage of the reaction, the platinum(II) complex forms the kinetically favored [Pt(Gly-Gly-*N,N',O*)(MeCOMet-His-S)]⁻ complex, with unidentate coordination of the MeCOMet-His dipeptide through the sulfur atom of the methionine residue. In the second stage of the reaction, complete intramolecular migration of the [Pt(Gly-Gly-*N,N',O*)] unit from the sulfur to the N3 nitrogen atom of imidazole was observed and a new platinum(II)-peptide complex, [Pt(Gly-Gly-*N,N',O*)(MeCOMet-His-N3)]⁻ was formed. In comparison with previous results obtained for the reaction of [Pt(dien)Cl]⁺ with different methionine- and histidine-containing peptides, this migration reaction was sufficiently fast and strongly selective to the N3 atom of the imidazole ring of the histidine side chain.

Finally, the hydrolytic reactions between various Pt(II) complexes of the type [Pt(L)Cl₂] and [Pt(L)(CBDCA-*O,O'*)] (L is ethylenediamine, en; (±)-*trans*-1,2-diaminocyclohexane, dach; (±)-1,2-propylenediamine, 1,2-pn and CBDCA is the 1,1-cyclobutanedicarboxylic anion) and the *N*-acetylated L-methionylglycine dipeptide (MeCOMet-Gly) were studied by ¹H NMR spectroscopy. All reactions were realized at 37 °C with equimolar amounts of the Pt(II) complex and the dipeptide at pH 7.40 in 50 mM phosphate buffer in D₂O. Under these experimental conditions, a very slow cleavage of the Met-Gly amide bond was observed and this hydrolytic reaction proceeds through the intermediate [Pt(L)(MeCOMet-Gly-S)(H₂O)]⁺ complex. In general, it can be concluded that faster hydrolytic cleavage of the MeCOMet-Gly dipeptide was observed in the reaction with the chloride complex than with corresponding CBDCA Pt(II) complexes. The steric effects of the Pt(II) complex on the hydrolytic cleavage of the amide bond in the

MeCOMet–Gly dipeptide were also investigated by ^1H NMR spectroscopy. It was found that the rate of hydrolysis decreases as the steric bulk of the $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-}O,O')]$ and $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ complexes increase ($\text{en} > 1,2\text{-pn} > \text{dach}$).

1. ОПШТИ ДЕО

Комплекси паладијума(II) и платине(II), као и њихова друга једињења, имају велику примену у медицини и индустрији, због чега се ова једињења интензивно изучавају већ дужи низ година. Ови метали су у комплексним једињењима најчешће у 2+ оксидационом стању што одговара d^8 електронској конфигурацији њихових јона. Комплекси Pt(II) и Pd(II) су квадратно-планарни и дијамагнетични. Комплекси Pt(II) су инертни и механизам супституционих реакција ових комплекса је детаљно испитиван [1]. Насупрот овоме, комплекси Pd(II) су знатно реактивнији у лиганд-супституционим реакцијама. Брзина реакција у којима долази до супституције лиганда у комплексима Pd(II) је око 10^4 - 10^5 пута већа у односу на одговарајуће реакције комплекса Pt(II) [2]. Оба јона метала су меке Луисове (Lewis) киселине и показују афинитет за лиганде као што су CN^- , или лиганде који садрже сумпор-донорске атоме који припадају групи меких Луисових (Lewis) база.

Изучавања интеракција комплекса платине(II) и паладијума(II) са биомолекулима, као што су пептиди и протеини, имају велики значај због тога јер се комплекси платине(II) последњих 40 година интензивно користе у медицини као антиканцерогени и антитуморски агенси. Проблем њихове примене у медицини је њихово токсично деловање, због чега се данас интензивно ради на изналажењу нових комплекса Pt(II) и Pt(IV) који ће имати мање токсично, а веће антитуморско дејство [2,3]. Изучавања реакција комплекса платине(II) и паладијума(II) су показала да ови комплекси интерреагују са пептидном везом у пептидима и протеинима, као и да граде стабилне комплексе координовањем за неку од аминокиселина (L-

метионин, L-цистеин, L-хистидин) које се налазе у бочном низу ових биомолекула [2,4-6]. Резултати ових испитивања показују да се ови комплекси координују на различите начине за пептиде и протеине, али оно што је вредно пажње јесте да у испитиваним реакцијама није нађено раскидање пептидних веза у овим молекулима.

У многим биолошким процесима долази до хидролизе пептидне везе у пептидима и протеинима. Полувреме хидролизе неактивираних пептидних веза у неутралној средини је око 500 година [7]. Са хемијске тачке гледишта екстремна инертност чини ову везу веома интересантном. За раскидање пептидних веза коришћени су различити протеолитички ензими, али је њихова примена ограничена с обзиром на стриктне услове температуре и рН вредности средине [8].

Селективна хидролиза пептида и протеина је врло значајан поступак за одређивање секвенце протеина, као и за друге биолошке трансформације ових сложених једињења [8]. Најједноставнији реагенси који су коришћени за хидролизу пептидних веза су цијаноген-бромид (CNBr), 3-бром-3-метил-2-(2'-нитрофенилсулфенил)-индолеин (BNPS-скатол), *N*-бромсукцинимид и многи други [9]. Ендопептидазе показују добро каталитичко дејство и селективност, али места на којима се пептиди и протеини цепају су многобројна, а добијени фрагменти су често веома сложени. Овако добијени фрагменти протеина могу бити различите дужине и често су непогодни за даље секвенционисање. Употребом CNBr може се заобићи тај проблем, али овај реагенс је веома непостојан и токсичан. Због напред наведених чињеница неопходно је било наћи нове реагенсе који ће имати већу селективност и јаче изражена каталитичка дејства.

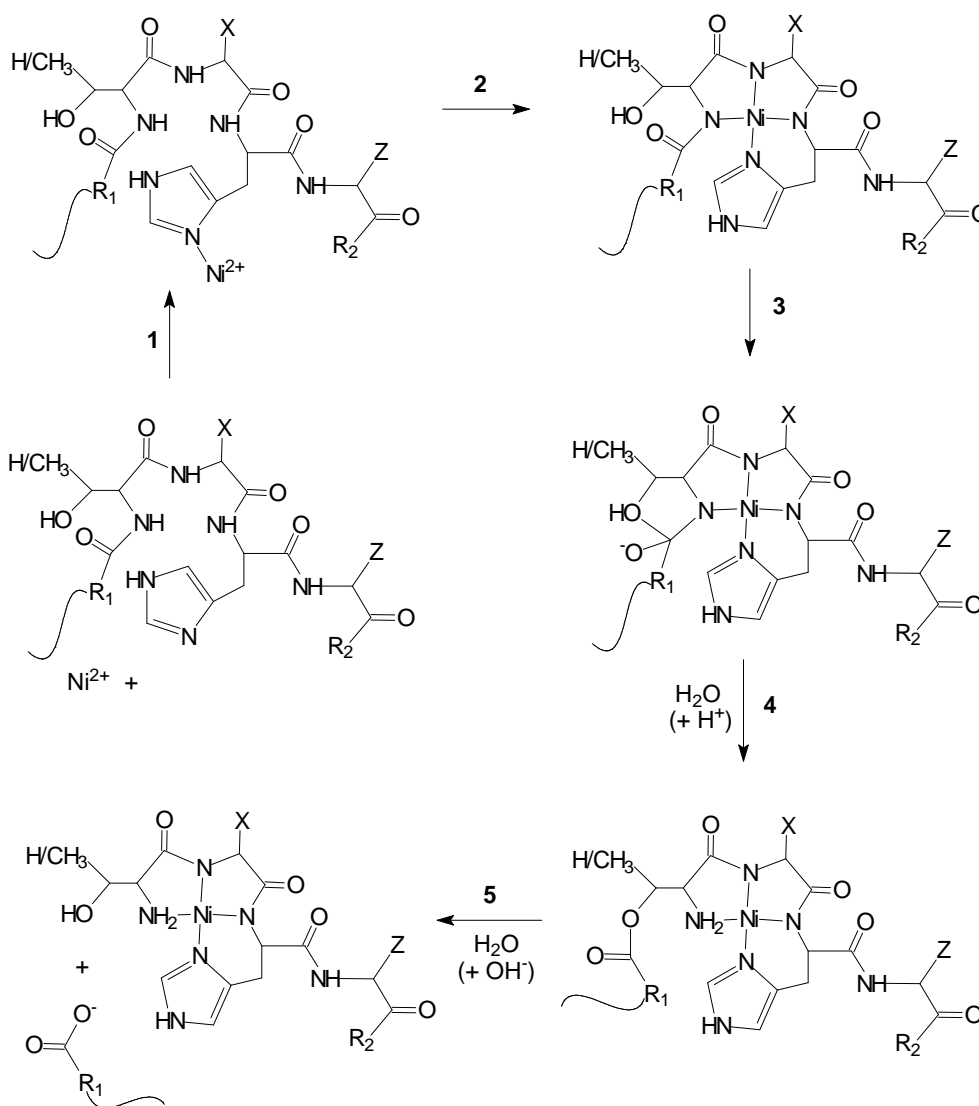
У току последње три деценије, као нови реагенси за хидролизу пептидних веза често се користе комплекси јона прелазних метала [10-12]. Ови комплекси могу селективно хидролизовати пептидне везе у пептидима и протеинима. Осим тога што се користе за одређивање секвенце протеина, комплекси метала су нашли примену код синтеза различитих протеина. Поред тога, ови реагенси се могу користити и за изучавање конформација и других особина протеина. Такође, изучавањем механизма по којем јони прелазних метала катализују селективну хидролизу пептидних веза може се разјаснити улога јона метала у активним центрима природних протеаза.

1.1. ХИДРОЛИЗА ПЕПТИДА ПОМОЋУ КОМПЛЕКСА ПРЕЛАЗНИХ МЕТАЛА

Многи јони метала и њихови комплекси катализују хидролизу пептидних веза у кратким пептидима [13-15]. У принципу, они катализују хидролизу X-Ser пептидне везе (X је било која аминокиселина). Механизам селективног раскидања пептидне везе помоћу јона метала шематски је приказан на слици 1. Као што се на овој слици види, у првој фази пептид се координује за јон метала преко хетероатома бочног низа аминокиселине, а затим за депротоноване атоме азота пептидне везе. Након координовања пептида за јон метала, долази до интеракције карбонилне групе са ОН групом серина и грађења цикличног естра, након чега долази до раскидања амидне C-N везе. Молекул воде који потиче из растварача врши нуклеофилни напад на С атом естарске везе, при чему естарска веза хидролизује [16,17]. Међутим, у овим реакцијама не долази до раскидања пептидних веза у чију структуру улази карбоксилна група серина у дужим пептидима или протеинима. Нађено је да јони Cu(II) катализују региоселективну хидролизу Lys226-Thr227 пептидне везе у имуноглобулину IgG₁ који је изолован из хуманог серума [18]. Даља истраживања су показала да Cu(II) хидролизује X-Ser и X-Thr пептидне везе у пептидима и протеинима који садрже -X-Ser-His-, односно -X-Thr-His- секвенце на повишеној температури и вишим рН вредностима [19-21]. Такође, нађено је да комплекси паладијума(II), као на пример $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ (en је бидентатно координован етилендиамин), хидролизују пептидне везе у пептидима који садрже аминокиселине метионин или хистидин. Пептид се координује за Pd(II) јон преко атома сумпора из бочног низа метионина или цистеина, односно преко атома азота из имидазола хистидинског остатка. Ове интеракције доводе до раскидања друге по реду пептидне везе која се налази лево од метионина, цистеина или хистидина (у већини случајева ради се о L-аминокиселинама) [22,23].

Платина(II) јон и његови комплекси, као на пример $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$, при ниским рН вредностима (рН око 2), катализују селективно раскидање пептидне везе у чију структуру улази карбоксилна група цистеина или метионина, након што се пептид координује за Pt(II) преко атома сумпора из цистеина или метионина [24,25]. Њихова селективност је ограничена на секвенце са Cys/Met/His остатком. За разлику од поменутих Pt(II) комплекса, *cis*- $[PtCl_2(NH_3)_2]$ комплекс има сличну реактивност као и Pd(II) комплекси у широј рН области [26]. Нађено је и да атом азота из Trp

може бити место координовања одговарајућих хидролитички активних Pd(II) и Pt(II) комплекса [27,28]. Пептидне везе X-Ser/Thr у –X-Ser/Thr-His/Met секвенци у хуманом серум албумину (HSA), хидролизују у присуству Pd(II) комплекса [29].

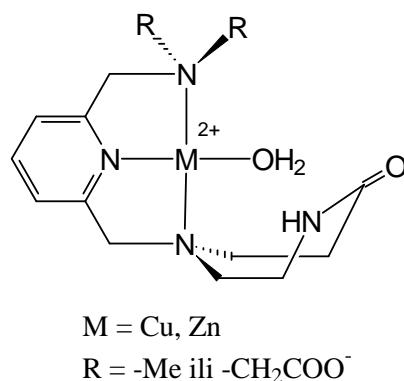


Слика 1. Шематски приказ селективног раскидања X-Ser пептидне везе у присуству Ni(II) јона [30]

Пептидне везе Gln91-Ser92 и Ala94-Thr95 у протеину миоглобину хидролизују у присуству различитих Cu(II) комплекса [31]. У реакцији Cu(II) комплекса са бовин серум албумином (BSA) долази до фрагментације протеина на више места, тако да не долази до региоселективне хидролизе одређене пептидне везе [32,33].

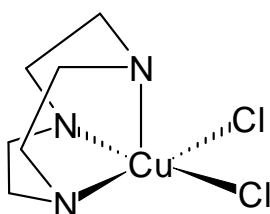
В. Бал (W. Bal) и сарадници су испитивали реакције хидролизе хексапептида MeCOThr-Glu-Ser-His-His-Lys-NH₂ у присуству Ni(II) јона. Нађено је да Glu-Ser пептидна веза хидролизује у присуству јона Ni(II) у фосфатном пуферу на pH = 7,4 и на температури од 37 °C [34]. Главни производ ове реакције, у приносу од 3 – 9%, је комплекс код кога је пептид Ser-His-His-Lys-NH₂ тетраденатно координован за Ni(II) јон. Даља истраживања су показала да пептид са 34 аминокиселинска остатака, као и хистон H2A (оба садрже поменућу секвенцу) у присуству Ni(II) јона, при сличним условима, хидролизују исту пептидну везу, али око 7 пута брже [35]. У истој реакцији Cu(II) јон хидролизује овај пептид (са 34 аминокиселине у низу) на исти начин као и Ni(II) јон, али 3 пута спорије, док су Co(II) и Zn(II) у овом случају хидролитички неактивни. Истраживања са аналогним пептидом, код кога је хистидин супституисан остатком аланина, показала су да је -Ser-His- секвенца неопходна да би дошло до реакције хидролизе [36]. Реактивност Ni(II) јона при pH = 7,0 је повећана ако се серин супституише треонином, док је реакција хидролизе најбржа при pH = 9,0 – 10,0 [37]. Испитивања ових реакција показују да у базној средини, у пептидима са секвенцом -Y-(Ser/Thr)-X-His-Z- где је Y = Glu или Ala, X = Ala или His и Z = Lys, долази до региоселективне хидролизе Y-(Ser/Thr) пептидне везе у присуству Ni(II) јона. На основу тога је претпостављено да супституција неких аминокиселина у положају X и Z може убрзати реакцију хидролизе. Јон Ni(II) се у оваквом систему понаша као вештачка ендопептидаза са селективношћу која се може упоредити са ензимима који се користе у биотехнолошкој пракси.

Гровс и Чемберс (Groves и Chambers) [38] су показали да Cu(II) и Zn(II) јони ефикасно хидролизују неактивирану амидну везу онда када се метал координује за неки од донорских атома који се налазе у ближој околини амидне везе, при чему је каталитички активна врста метал-аква комплекс (Слика 2). Двовалентни јони прелазних метала су коришћени за хидролизу различитих пиколинамида [39,40]. Резултати ових испитивања указују на каталитичку активност метал-аква комплекса [39]. Такође, ови резултати су показали да је брзина хидролизе амидне везе много већа ако не долази до депротонације амидног (NH) азота [40]. За хидролизу амидне везе у DMF (диметилформаид) коришћен је нестабилни бакар(II)-бипиридински комплекс, [41] док је стабилни монофункционални [Cu(tpy)]²⁺ (tpy = 2,2',2''-терпиридин) комплекс хидролитички неактиван.



Слика 2. Структурна формула комплекса метала који показује способност раскидања амидне везе

Резултати испитивања су показали да се синтетичка нуклеаза [Cu([9]aneN₃)Cl₂] (Слика 3) може користити као пептидаза [32]. У реакцији неактивираниог дипептида Gly-Gly са [Cu([9]aneN₃)Cl₂], хидролизује Gly-Gly пептидна веза, а једини производ ове реакције је глицин. Иако је реакција била спора [Cu([9]aneN₃)Cl₂], комплекс је имао улогу катализатора. Такође, протеин серум албумин (BSA), изолован из говеђег серума је хидролизовао у присуству [Cu([9]aneN₃)Cl₂] комплекса [32]. Поред тога, испитивања су показала да када се реакције хидролизе врше у одговарајућим пуферима у присуству [Cu([9]aneN₃)Cl₂] комплекса, долази до хидролизе BSA протеина само на једном месту. Обе наведене реакције показују значајан утицај пуфера, при чему Gly-Gly пептид и BSA протеин хидролизују брже у натријум-бикарбонатном пуферу него у HEPES пуферу. На основу тога закључено је да употребљени пуфери учествују у реакцијама раскидања одговарајућих пептидних веза.



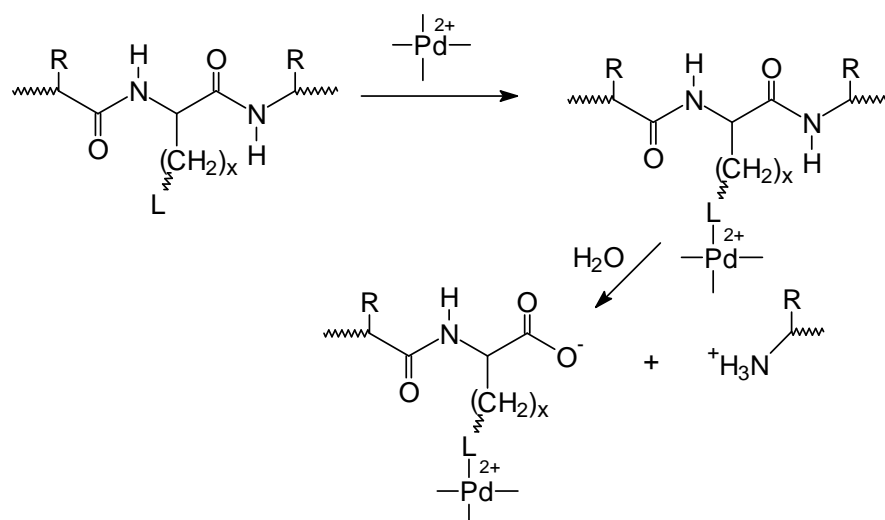
Слика 3. Структурна формула дихлоридо-1,4,7-триазациклононанбакар(II) комплекса [Cu([9]aneN₃)Cl₂]

Различити комплекси кобалта(III) се такође, могу координовати за пептиде и катализовати хидролизу пептидне везе. Међутим, резултати испитивања су показали да у овом случају долази до хидролизе само пептидне везе у чију структуру улази карбоксилна група *N*-терминалне аминокиселине [12]. Поред комплекса кобалта(III), за хидролизу пептидне везе коришћени су и неки комплекси гвожђа(II) са edta (етилендиаминтетрасирћетна киселина) лигандима. Испитивања су показала да се edta-Fe(II) комплекси у првој фази ковалентно везују за бочни низ аминокиселина, а затим долази до хидролитичког раскидања пептидне везе. Међутим, ови резултати нису нашли практичну примену у аналитичкој биохемији [42-51]. Такође, неки циклодекстрински комплекси церијума(IV) су показали завидну каталитичку активност хидролизе различитих ди- и трипептида [52].

1.1.1 ХИДРОЛИЗА ПЕПТИДА ПОМОЋУ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) И ПАЛАДИЈУМА(II)

Истраживања у овој области су показала да координовање комплекса паладијума(II) и платине(II) за бочни низ неких аминокиселина (L-хистидина, L-метионина и L-триптофана) доводи до хидролизе пептидне везе која садржи карбоксилну групу координоване аминокиселине [28,53,54]. Шема реакције хидролизе пептидне везе која садржи карбоксилну групу координоване аминокиселине приказана је на слици 4. Примена комплекса платине(II) и паладијума(II) у наведеним хидролитичким реакцијама представља нову методу за селективну хидролизу пептидне везе у пептидима и протеинима. Детаљно је изучаван механизам ових хидролитичких реакција тестирајући различите комплексе паладијума(II) и платине(II) који у будућности могу наћи практичну примену.

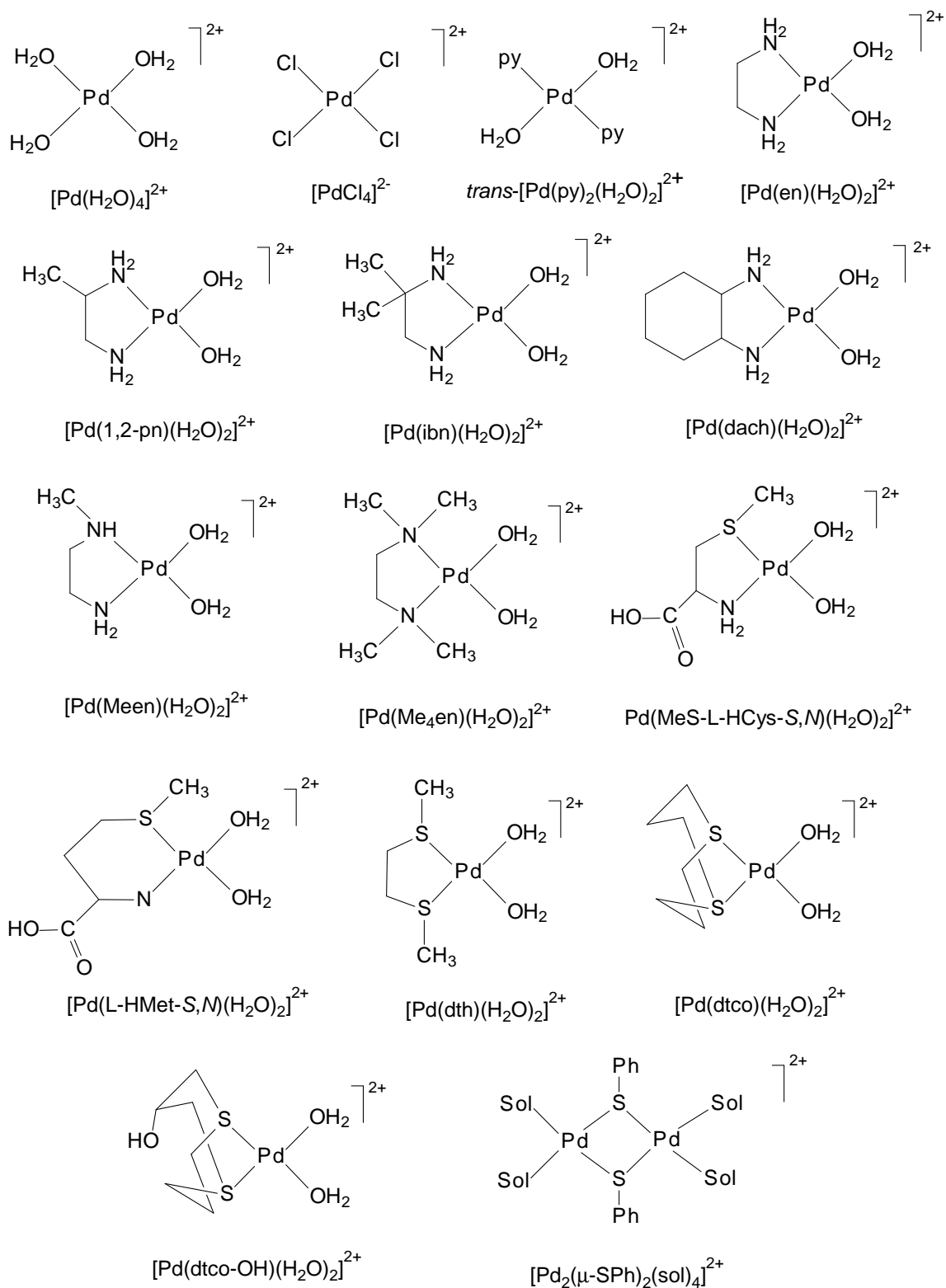
Прва изучавања хидролитичких реакција пептида и протеина вршена су са комплексима платине(II), али се убрзо прешло на мање стабилне комплексе паладијума(II). Утврђено је да хидролитички активни комплекси паладијума(II) и платине(II) морају имати, од укупно четири, најмање два координациона места слободна (једно за координовање за бочни низ аминокиселине, а друго за интеракцију са најближом пептидном везом која се раскида). Према томе, потребно је да комплекс садржи најмање два слабо везана лиганда (лабилни лиганди), као што је молекула воде, тако да се брзо могу супституисати у реакцији са пептидима.



Слика 4. Општа шема хидролизе пептидне везе у пептидима и протеинима помоћу комплекса паладијума(II)

Преостала два координациона места заузима неки бидентатни лиганд, који остаје координован за јон метала у току хидролитичких реакција. Испитивани су комплекси са различитим бидентатним лигандима, који имају различите стерне и кинетичке ефекте. Пошто су ови комплекси углавном позитивно наелектрисани, као контра јони најчешће су се употребљавали ClO_4^- или BF_4^- анјони. Ови анјони немају могућност координавања за $Pd(II)$ јон.

На слици 5 приказани су комплекси паладијума(II) који су показали хидролитичку активност у реакцијама са пептидима. Приказани аква комплекси добијени су од одговарајућих хлоридо комплекса таложењем Cl^- јона са Ag^+ јонима [55]. Сви комплекси, приказани на слици 5, коришћени су као катализатори за хидролизу пептидне везе. Када се као катализатор употреби $[Pd(H_2O)_4]^{2+}$ комплекс, хидролиза пептидне везе је веома брза, али на $pH > 2,0$ преко хидроксилне групе долази до полимеризације овог паладијум(II) комплекса. Полимеризација комплекса је спречена додатком раствора $HClO_4$ која спречава ову реакцију. Иако је $[Pd(H_2O)_4]^{2+}$ комплекс стабилан за време од 7 дана, за хидролитичке реакције пожељно је користити свеже припремљен раствор. Остали комплекси приказани на слици 5 су значајно стабилнији при овако ниским pH вредностима. Ако се аква лиганд у комплексима приказаним на слици 5 супституише са неким анјонским лигандом, каталитичка способност $Pd(II)$ комплекса се знатно смањује.



Слика 5. Структурне формуле неких комплекса паладијума(II) који су употребљени као катализатори за хидролизу пептида и протеина

Тако на пример, $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ комплекс има знатно мању каталитичку активност у односу на $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ комплекс.

Имајући у виду да у многим ензимима активни центар садржи динуклеарни комплекс, за испитивање хидролитичких реакција са пептидима и протеинима коришћени су различити динуклеарни комплекси паладијума(II) и платине(II). Ови комплекси најчешће у мосту садрже сумпор-донорске атоме и добро су познати у координационој хемији [56].

С обзиром да су комплекси паладијума(II) и платине(II) дијамагнетични њихове реакције са пептидима се могу пратити помоћу ^1H и ^{13}C NMR спектроскопије. Пошто ^{195}Pt језгро има нуклеарни спин $\frac{1}{2}$ потребне информације о структури Pt(II) комплекса могу се такође, добити из ^{195}Pt NMR спектра. NMR спектри различитих комплекса платине(II) и паладијума(II) са аминокиселинама и пептидима су детаљно описани у литератури [57].

Хемијска померања сигнала која потичу од метил-протона $\text{CH}_3\text{-S}$ групе у пептидима који садрже L-метионин и S-метил-L-цистеин са успехом су коришћена за праћење реакција хидролизе ових пептида. Хидролитичке реакције пептида који садрже L-хистидин у присуству комплекса Pd(II) и Pt(II) могу се пратити на основу хемијских померања која потичу од C2H и C5H протона из имидазоловог прстена. Хемијска померања ових протона зависе од тога да ли је неки од азотових атома из имидазоловог прстена протонован или координован за јон метала. На основу хемијских померања ових протона добијене су информације о структури пептида који садрже L-хистидин, као и структури насталих метал(II)-пептид комплекса. Квантитативне информације о испитиваним реакцијама добијене су помоћу вредности интеграла ових сигнала [6,58,59]. Такође, хемијско померање $\alpha\text{-CH}$ протона из L-хистидина често може указати да долази до координације пептида за одговарајући каталитички комплекс Pt(II) и Pd(II). Пептидна NH група се детектује у неводеним растворима, а опадање интензитета резонанце која потиче од овог протона је добор индикатор за његову супституцију са Pd(II) или Pt(II) јоном. NMR спектроскопија се такође, може са успехом применити за кинетичка испитивања реакција хидролизе пептидне везе у присуству Pd(II) и Pt(II) комплекса. Ова мерења су прилично прецизна (опсег грешке је од 5 - 10%) тако да се са успехом могу применити за одређивање константе брзине реакције хидролизе пептидне везе. На основу мерења разлика у површини интеграла резонанци које одговарају полазном

пептиду (интензитет ових сигнала се смањује у току реакције) и површине интеграла резонанци које одговарају реакционим производима (интензитет ових сигнала се најчешће повећава) може се одредити проценат хидролизованог пептида.

Координација јона метала за пептидну везу ($-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$) је веома сложен процес. У суштини постоји могућност да се Pd(II) или Pt(II) јон координује за атом азота или карбонилни кисеоников атом пептидне везе. Координација ова два јона за атом азота захтева његову депротонацију, због чега је веза која при томе настаје веома стабилна, док се у случају њихове координације за карбонилни кисеоников атом формира веома нестабилна Pd(II)-O или Pt(II)-O веза. Због тога, често долази до миграције координованог Pd(II) или Pt(II) јона са карбонилног кисеониковог атома на атом азота пептидне везе.

Код пептида који не садрже хетероатом у бочном низу, да би дошло до координације Pd(II) и Pt(II) за неки од атома из пептидне везе неопходно је да се ови јони метала претходно монодентатно координују за атом азота из *N*-терминалне амино групе. У следећој фази ови јони метала се координују за атом азота из пептидне везе, што захтева његову депротонацију. На овај начин може доћи до потпуног координовања јона метала за пептид при чему настају квадратно-планарни комплекси који садрже три хелатна петочлана прстена [4]. За разлику од Pt(II), Pd(II) јон депротонује пептидни азот при веома ниским рН вредностима [60]. Тако на пример, нађено је да су рКа вредности депротонације пептидног азота у трипептиду Gly-Gly-Gly у реакцији са Pd(II) јоном приближно 2 за прву и 4 за другу пептидну везу [60].

Бочни низ пептида који чине аминокиселине L-цистеин, L-метионин и L-хистидин се много лакше координује за Pd(II) и Pt(II) јоне у односу на азотов атом из *N*-терминалне амино групе. Ови јони метала се координују за бочни низ преко тиолног атома сумпора из цистеина, тиоетарског атома сумпора из метионина и два имидазолова атома азота из хистидина. Након координације за неки од наведених атома из бочног низа, монодентатно координовани Pd(II) јон веома лако, при рН < 2,0, депротонује пептидни азот суседне пептидне везе и гради стабилан хелатни комплекс. Овако настали хелат стерно успорава хидролизу одговарајуће пептидне везе. Насупрот овоме, координација Pd(II) јона за карбонилни кисеоников атом пептидне везе повећава парцијално позитивно наелектрисање на атому угљеника што доприноси бржој хидролизи пептидне везе [60]. Хелатни паладијум-пептидни

комплекс, настао координовањем одговарајућег комплекса Pd(II) преко неког од донорских атома из бочног низа и депротонваног атома азота најближе пептидне везе која се налази на *N*-терминалној страни пептида, представља веома крут систем који онемогућава интеракцију Pd(II) јона са суседном пептидном везом на карбоксилној страни пептида, а самим тим и њену хидролизу.

Хидролиза пептида који садрже аминокиселине L-метионин и L-цистеин помоћу комплекса платине(II) и паладијума(II)

Јони Pt(II) и Pd(II) су "меке" Луисове (Lewis) киселине и лако се координују за тиолну групу из L-цистеина и тиоетарску групу из L-метионина и *S*-метил-L-цистеина. Монодентатно координовани јони ових метала се могу хелатно координовати за депротонвани пептидни азот суседне пептидне везе. Брзина настајања бидентатног метал-пептид комплекса директно зависи од рН вредности раствора. Поред тога, бидентатна координација јона метала (тзв. *S,N*-координација) фаворизирана је формирањем петочланог (код цистеина) или шесточланог (код метионина) хелатног прстена (тзв. *хелатни ефекат*) [2,4,5].

Хидролиза пептида помоћу комплекса платине(II)

Прва испитивања су показала да координовањем Pt(II) за бочни низ аминокиселина метионина, цистеина и *S*-метил-цистеина у пептидима доводи до хидролизе пептидне везе у коју улази карбоксилна група координоване аминокиселине [58]. Ова хидролиза пептидне везе у присуству Pt(II) комплекса се одиграва у киселој средини. Резултати испитивања су показали да се хидролиза одговарајуће пептидне везе не дешава због киселе средине раствора, него под утицајем одговарајућег комплекса платине(II).

Хидролиза супстрата, као што су MeCOMet-Gly, Leu-Gly, MeCOMet, редуковани глутатион и *S*-метил-глутатион, је испитивана у рН области од 0,8 до 7,0. Комплекси платине(II) који су коришћени за реакције хидролизе ових супстрата представљају структурне аналоге комплекса паладијума(II) (види Слику 5). Поред комплекса чије су структурне формуле приказане на слици 5, испитивани су и други комплекси платине(II) који садрже хелатно координоване 2,2'-бипиридин (bpy), диетилентриамин (dien) и 2,2',6,6'-терпиридин (tpy) лиганде. За карактерисање

комплекса који настају у реакцији Pt(II) са *S*-донорским лигандима, као и за одређивање вредности константе брзине хидролизе, коришћена је ^{195}Pt , ^{13}C и ^1H NMR спектроскопија.

Резултати испитивања показују да у случају када аминокиселина у бочном низу пептида не садржи донорски атом погодан за координовање Pt(II) јона, као на пример Leu-Gly, не долази до хидролизе пептидне везе. Према томе, хидролиза пептида катализована јонима метала могућа је само у случају координовања Pt(II) за неки од хетероатома у бочном низу. Кинетичка испитивања су показала да су реакције хидролизе пептидне везе првог реда у односу на комплекс платина-пептид, а вредност константе брзине хидролизе се смањују са повећањем рН вредности раствора. Такође, хлоридни јони координовани за Pt(II) инхибирају реакцију хидролизе пептида. Нађено је да код хлоридо комплекса прво мора доћи до хидролизе одговарајућег хлоридо лиганда, тј. његове супституције са аква лигандом, да би у наредној фази настали аква комплекс катализовао хидролизу пептидне везе. На овај начин потврђен је велики значај координованог аква лиганда у механизму хидролизе пептидне везе.

Каталитичка способност Pt(II) комплекса зависи од врсте полидентатног лиганда координованог за овај јон метала. Тако, Pt(II) комплекси са тридентатним лигандима, као што су *trp* или *dien*, координују се за бочни низ у пептиду, али не могу хидролизовати пептидну везу. Из овога се може закључити да су најмање два слободна координациона места у квадратно-планарном комплексу Pt(II) неопходна да би овај комплекс показао каталитичку способност. Под слободним координационим местом се подразумева да је за Pt(II) јон координован неки монодентатни лиганд који је слабом везом повезан са јоном метала (на пример аква лиганд). Од два слободна координациона места у комплексу Pt(II), једно је неопходно за координацију за хетероатом у бочном низу пептида (прва фаза), док се преко другог координационог места одвија интеракција јона метала са одговарајућом пептидном везом која хидролизује (друга фаза). Нађено је да стерни ефекат бидентатно координованог лиганда има утицај на хидролизу пептидне везе. Тако на пример, волуминозни бидентатни лиганд, као што је *bpy*, у потпуности инхибира хидролитичке реакције. Са мање волуминозним лигандима, као што је етилендиамин, полувреме хидролизе се мери данима. Међутим, када се као катализатор користи $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ полувреме хидролизе је свега неколико часова. На

основу ових испитивања утврђено је да до хидролизе пептидне везе долази само онда ако је Pt(II) јон довољно близу пептидне везе.

Шелдрик (Sheldrick) и сарадници су испитивали реакције антитуморски активних *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] и [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ комплекса са пептидима који садрже метионин. Реакције су испитиване у рН области 2,5 - 11,0 на 40 °С, применом течне хроматографије под високим притисцима (HPLC), масене спектрометрије (MS) и ¹H и ¹⁹⁵Pt NMR спектроскопије.

Реакције [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ комплекса са ди- и трипептидима који садрже L-метионин, Met-Gly, Met-Gly-Gly, Gly-Met, Gly-Gly-Met и Gly-Met-Gly, испитиване су у рН области 2,5 - 11,0 [61]. Нађено је да у реакцијама [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ са пептидима код којих је метионин *N*-терминална аминокиселина, у зависности од рН вредности раствора, настају [Pt(en)(peptid-*N,S*)]²⁺ и [Pt(en)(peptid-*N,N'*)]⁺ комплекси. При рН < 8,7 доминантан је [Pt(en)(peptid-*N,S*)]²⁺ комплекс, код кога је пептид бидентатно координован за Pt(II) преко атома сумпора метионина и атома азота терминалне амино групе. Међутим, на вишим рН вредностима (рН > 8,7) доминантан је [Pt(en)(peptid-*N,N'*)]⁺ комплекс, у коме је пептид координован за Pt(II) преко атома азота терминалне амино групе и депротонованог атома азота пептидне везе. Насупрот томе, у реакцијама између пептида код којих метионин није *N*-терминална аминокиселина (Gly-Met, Gly-Gly-Met и Gly-Met-Gly) и [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ комплекса, у киселој средини, у првој фази настаје [Pt(en)(peptid-*N,S*)]⁺ комплексна врста, након чега долази до отварања етилендиаминског прстена и тридентатне координације Gly-Met, односно Gly-Met-Gly, пептида за платину(II). Међутим, при вишим рН вредностима у реакција овог комплекса са пептидима код којих метионин није *N*-терминална аминокиселина (Gly-Met и Gly-Met-Gly, рН > 7,4) и пептидима који садрже *N*-терминални метионин (Met-Gly и Met-Gly-Gly, рН > 8,7) доминантну врсту у раствору представља [Pt(en)(peptid-*N,N'*)]⁺ комплекс. Насупрот овоме, у реакцији [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ комплекса са Gly-Gly-Met трипептидом при рН < 10,6 у раствору постоји само [Pt(en)(Gly-Gly-Met-*N,S*)]⁺ комплексна врста. Нађено је да у свим претходно испитиваним реакцијама не долази до хидролизе пептидних веза, јер настају [Pt(en)]²⁺-пептид комплекси који су хидролитички неактивни.

Испитиване су реакције *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] комплекса са пептидима који садрже метионин, Gly-Met и Gly-Gly-Met, као и *N*-ацетилваних пептида MeCOSer-Met, MeCOMet-Gly, MeCOMet-Pro, MeCOGly-Met-Gly, MeCOMet-Pro-Gly-Gly и

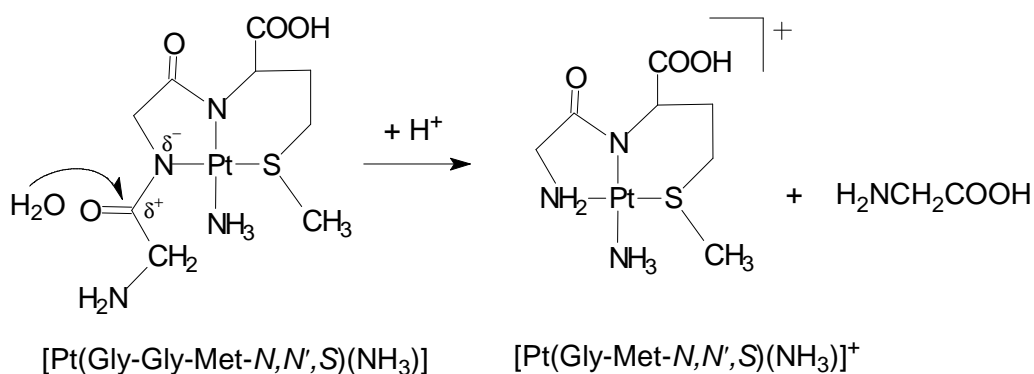
MeCOGly-Met-Pro-Gly-Gly [62-64]. Нађено је да одмах након мешања у свим реакцијама долази до монодентатног координовања пептида преко атома сумпора метионинског остатка за Pt(II) јон. Након монодентатне координације пептида, долази до брзе интрамолекуларске супституције другог хлоридо лиганда у Pt(II) комплексу, при чему настаје релативно стабилни Pt(II)-пептид комплекс у коме је пептид бидентатно, преко атома сумпора метионинског остатка и депротонваног атома азота пептидне везе, координован за платину(II).

У реакцији *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] комплекса и Gly-Met у рН области 2,5 - 10,0 не долази до хидролизе пептидне везе, јер се дипептид тридентатно координује за Pt(II) при чему настаје стабилан [Pt(Gly-Met-*N,N',S*)(NH₃)]⁺ комплекс [62].

Нађено је да селективна хидролиза пептидне везе у присуству *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] комплекса искључиво зависи од положаја метионинског остатка у пептидима. Када се метионин налази на *N*-терминалном крају, који је заштићен, долази до селективне хидролизе Met-Z пептидне везе (пептиди типа MeCOMet-Z-). Међутим, у случају пептида који имају -X-Y-Met-Z секвенцу долази до хидролизе X-Y пептидне везе. Ако су X, Y и Z аминокиселине које у бочном низу немају хетероатом који се може координовати за Pt(II), хидролиза се одвија при рН < 6,0 [62,65].

У реакцији *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] са Gly-Gly-Met (2,5 < рН < 10,0) долази до формирања [Pt(Gly-Gly-Met-*N,N',S*)(NH₃)] комплекса са тридентатно координованим пептидом. Када се ове реакције изводе при рН < 5,0 долази до хидролизе Gly-Gly пептидне везе (Слика 6). Интеракција јона метала са депротонваним атомом азота Gly-Gly пептидне везе, који се налази у *trans*-положају у односу на координовани атом сумпора у овом комплексу, поларизује C-N пептидну везу. Карбонилни атом угљеника постаје парцијално позитиван и погодан за нуклеофилни напад молекула воде услед чега Gly-Gly пептидна веза хидролизује. У неутралној и базној средини (рН < 10,0) не долази до хидролизе Gly-Gly пептидне везе у Gly-Gly-Met трипептиду. При овим експерименталним условима настаје стабилни [Pt(Gly-Gly-Met-*N,N',N'',S*)] комплекс са тетрадентатно координованим пептидом [62].

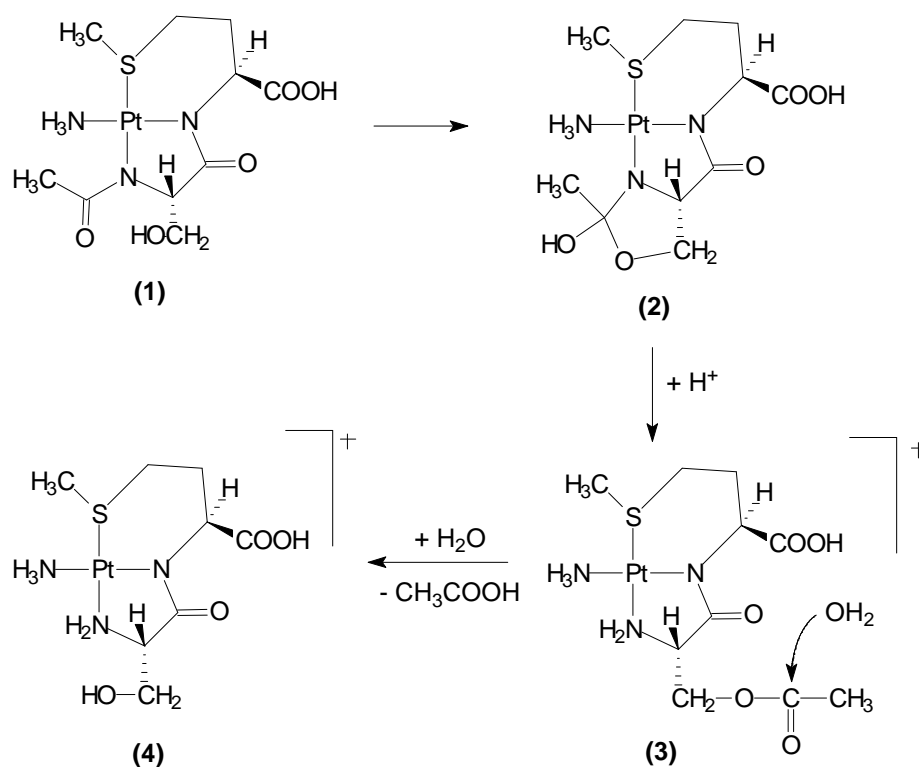
Комплекс *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] катализује селективну хидролизу MeCO-Gly везе у MeCOGly-Met-Gly трипептиду при рН < 6,0. Трипептид се тридентатно координује за Pt(II) при чему настаје [Pt(MeCOGly-Met-Gly-*S,N,N'*)(NH₃)] комплекс. У раствору



Слика 6. Реакција хидролизе Gly-Gly пептидне везе у Gly-Gly-Met пептиду помоћу *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] комплекса

је након 10 сати, применом HPLC хроматографије и ¹H NMR спектроскопије, детектован [Pt(Gly-Met-Gly-*S,N,N'*)(NH₃)] комплекс, као и слободна сирћетна киселина. У неутралној и слабо базној средини (pH > 6,0) не долази до хидролизе пептида и у раствору је присутан само [Pt(MeCOGly-Met-Gly-*S,N,N'*)(NH₃)] комплекс. У реакцији цисплатине и MeCOGly-Met-Gly, у 1 : 2 молском односу, не долази до хидролизе пептида и главни производ реакције је [Pt(MeCOGly-Met-Gly-*S,N,N'*)(MeCOGly-Met-Gly-*S*)] комплекс [63].

При pH > 4,0 *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] комплекс катализује хидролизу MeCO-Ser amidне везе у MeCOSer-Met дипептиду. На pH = 4,4 концентрација производа хидролизе је минимална, међутим током времена и са повећањем pH вредности раствора концентрација производа хидролизе расте, да би у pH области од 7,0 до 9,5 концентрација слободне сирћетне киселине била највећа. Шема хидролитичке реакције приказана је на слици 7. Након тридентатног координовања дипептида (комплекс **1**), долази до интеракције карбонилне групе са OH групом серина и грађења цикличног естра (**2**), након чега долази до раскидања amidне C-N veze. Молекул воде који потиче из растварача врши нуклеофилни напад на угљеников атом естарске везе у комплексу (**3**), при чему естарска веза хидролизује. У раствору је детектована слободна сирћетна киселина и комплекс (**4**) у коме је Ser-Met остатак тридентатно координован за Pt(II) [63].



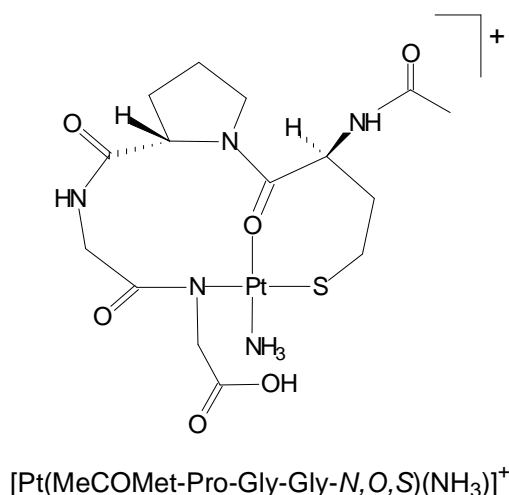
Слика 7. Шематски приказ механизма хидролизе пептидне везе у реакцији између *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] комплекса и MeCOSer-Met дипептида при pH > 4,0

У рН области од 2,8 до 10,0 *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] катализује селективну хидролизу пептидне везе која садржи карбоксилну групу D-метионина у MeCOMet-Gly и MeCOMet-Pro дипептидима. Применом HPLC хроматографије у реакцији Pt(II) комплекса и MeCOMet-Gly при pH < 5,0 утврђено је да је доминантан [Pt(MeCOMet-*N,S*)(Gly-*N*)(NH₃)]⁺ комплекс, међутим након 100 сати реакционог времена овај комплекс прелази у термодинамички стабилнији [Pt(MeCOMet-*S*)(Gly-*N,O*)(NH₃)]⁺ комплекс. У базној средини хидролиза је знатно спорија, тако да су након 100 сати реакционог времена у раствору доминантне [Pt(MeCOMet-Gly-*N,S*)(NH₃)₂]⁺ и [Pt(MeCOMet-Gly-*N,O,S*)(NH₃)] комплексне врсте. Међутим, у случају MeCOMet-Pro дипептида у киселој средини, након хидролизе Met-Pro пептидне везе, слободни пролин се не координује за Pt(II) јон. Нађено је да у слабо базној средини (pH < 9,0) настаје [Pt(MeCOMet-*S*)(Pro-*N,O*)(NH₃)] комплекс [64].

За разлику од MeCOMet-Pro, у неутралној и слабо базној средини, Met-Pro пептидна веза у MeCOMet-Pro-Gly-Gly не хидролизује [64]. Формирање [Pt(MeCOMet-Pro-Gly-Gly-*N,O,S*)(NH₃)₂]⁺ макрохелатног комплекса (Слика 8), у коме је тетрапептид тридентатно координован преко атома сумпора метионина,

карбонилног атома кисеоника пептидне везе у којој учествује карбоксилна група метионина и депротонованог атом азота пептидне везе С-терминалног глицина, инхибира хидролизу Met-Pro везе. Карбонилни атом кисеоника X-Pro пептидне везе је најнуклеофилнији амидни кисеоник у полипептидима. С обзиром на његову нуклеофилност он веома лако супституише монодентатне лиганде (H_2O , NH_3 , Cl^-) и директно се координује за платину(II), као у претходно описаном макрохелатном $[\text{Pt}(\text{MeCOMet-Pro-Gly-Gly-}N,O,S)(\text{NH}_3)]^+$ комплексу [66].

Израчунато је да је $[\text{Pt}(\text{MeCOMet-Pro-Gly-Gly-}N,O,S)(\text{NH}_3)]^+$ комплекс за 3,0 kcal/mol стабилнији од алтернативног $[\text{Pt}(\text{MeCOMet-Pro-Gly-Gly-}N,N',S)(\text{NH}_3)]$ макрохелата. Ови резултати су у супротности са раније добијеним резултатима за пептиде који садрже L-хистидин [67]. Након формирања макрохелатног комплекса (Слика 8), при $\text{pH} < 5,0$, углавном долази до хидролизе Met-Pro пептидне везе, док у малом проценту хидролизује и MeCO-Met веза [64].



Слика 8. Шематски приказ структурне формуле макрохелатног комплекса који настаје у реакцији између MeCOMet-Pro-Gly-Gly тетрапептида и *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ комплекса

У реакцији MeCOGly-Met-Pro-Gly-Gly и *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ комплекса, при $\text{pH} \leq 4,5$, нађено је да хидролизују Met-Pro и MeCO-Gly пептидне везе [64]. Такође, хидролиза X-Y и Met-Pro пептидних веза потврђена је код свих пептида који садрже -X-Y-Met-Pro- секвенцу. Међутим, код пептида који не садрже пролин у својој секвенци, као што је MeCOGly-Gly-Met-Gly-Gly, хидролизује само Gly-Gly, односно X-Y пептидна веза у -X-Y-Met- секвенци [67].

Хидролиза пептида помоћу комплекса паладијума(II)

Први резултати испитивања реакција хидролизе пептида у присуству комплекса паладијума(II), као што су $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ и $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ (Слика 5), су показали да су ови комплекси много ефикаснији у односу на аналогне комплексе платине(II). Тако на пример, у реакцији комплекса Pd(II) са MeCOMet-Gly полувреме реакције хидролизе овог пептида је мање од 30 минута [68]. Нађено је да вредности константе брзине хидролизе расту са повећањем киселости и јонске јачине раствора. Еквимоларна количина Cl⁻ јона додата у реакциону смешу одговарајућег комплекса паладијума(II) и пептида успорава хидролизу, док додатак тиоурее потпуно инхибира ову реакцију. Ова испитивања показују да пептиди који као *N*-терминалну аминокиселину садрже метионин не могу хидролизовати у присуству Pd(II) комплекса, јер се овај комплекс углавном бидентатно координује за пептид преко тиоетарског атома сумпора и азота из *N*-терминалне амино групе. На овај начин гради се нерастворан Pd(II)-пептид комплекс, који даље не подлеже хидролитичким реакцијама. Међутим, ацетиловањем *N*-терминалне групе метионина одговарајући пептид подлеже хидролитичким реакцијама.

Резултати који су добијени на основу детаљних кинетичких испитивања серије дипептида MeCOMet-X, где X представља Gly, Ala, Ser, Val, Leu и Ala-Ser, дали су велики допринос изучавању механизма хидролитичких реакција пептида које су катализоване комплексима паладијума(II) [69]. Као катализатори коришћени су $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pd}(\text{dtco})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекси (где је dtco 1,5-дитиоциклооктан), док су реакције хидролизе изучаване на температури од 40 °C до 50 °C и при интервалу $1,0 \leq \text{pH} \leq 2,0$. У свим случајевима реакција хидролизе пептида била је региоселективна, при чему хидролизује само пептидна веза која садржи карбоксилну групу метионина. У случају MeCOMet-Ala-Ser пептида нађено је да у присуству комплекса паладијума(II) хидролизује само Met-Ala пептидна веза. Наведени пептиди се разликују у *C*-терминалној аминокиселини (стерно су различите). Испитивања показују да стерни ефекат ових аминокиселина значајно утиче на вредности константе брзине хидролизе (k_{obsd}), тако да волуминозније *C*-терминалне аминокиселине смањују њену вредност. Ова зависност је праћена на различитим температурама. Волуминознија *C*-терминална аминокиселина више заклања одговарајућу пептидну везу од утицаја паладијум(II) јона и његовог аква лиганда. Нађено је да супституенти на α -C и β -C угљениковим атомима смањују

вредности константе брзине реакција, односно успоравају реакцију хидролизе. Резултати испитивања показују да је утицај супституента на γ -C угљениковом атому приближно 100 пута мањи, док супституент на δ -C атому нема ефекат на брзину хидролизе пептидне везе [69].

Утицај стерног ефекта на брзину хидролизе може се употребити за постизање селективности у секвенционисању пептида и протеина. Резултати показују да је вредност константе брзине хидролизе код пептида код којих је одлазећа група Ala-Ser за половину мања у односу на ову константу када је одлазећа група само Ala. На основу тога је закључено да реакције са дугим супституентима морају бити спорије у односу на реакције са краћим ланцима, иако долази до раскидања исте пептидне везе у оба случаја.

Реакција хидролизе пептидне везе може се успорити додатком сумпор-везивних једињења у реакциону смешу, али и сами производи хидролизе могу бити инхибитори реакције. Еквимоларна количина тиетра MeCOMet или тиола MeCOCys успорава хидролизу, а инхибиција се повећава са порастом концентрације инхибитора.

Нађено је да брзина и механизам хидролизе Met-Gly пептидне везе у MeCOMet-Gly пептиду строго зависи од природе бидентатно координованог лиганда L у паладијум(II) комплексима типа $[Pd(L)(H_2O)_2]^{2+}$, где је L етилендиамин (en), 1,2-пропилендиамин (1,2-pn), изобутилендиамин (ibn), 1,2-диаминоциклохексан (dach), N-метилетилендиамин (Meen), N,N,N',N'-тертраметилетилендиамин (Me₄en), S-метил-L-цистеин (MeS-L-Cys), L-метионин (L-Met) и 2,5-дитиохексан (dth) [70]. Резултати испитивања показују да су комплекси са бидентатно координованим диаминским лигандима ефикаснији катализатори хидролизе пептидне везе у односу на комплексе са бидентатно координованим S-метил-L-цистеином, L-метионином и 2,5-дитиохексаном.

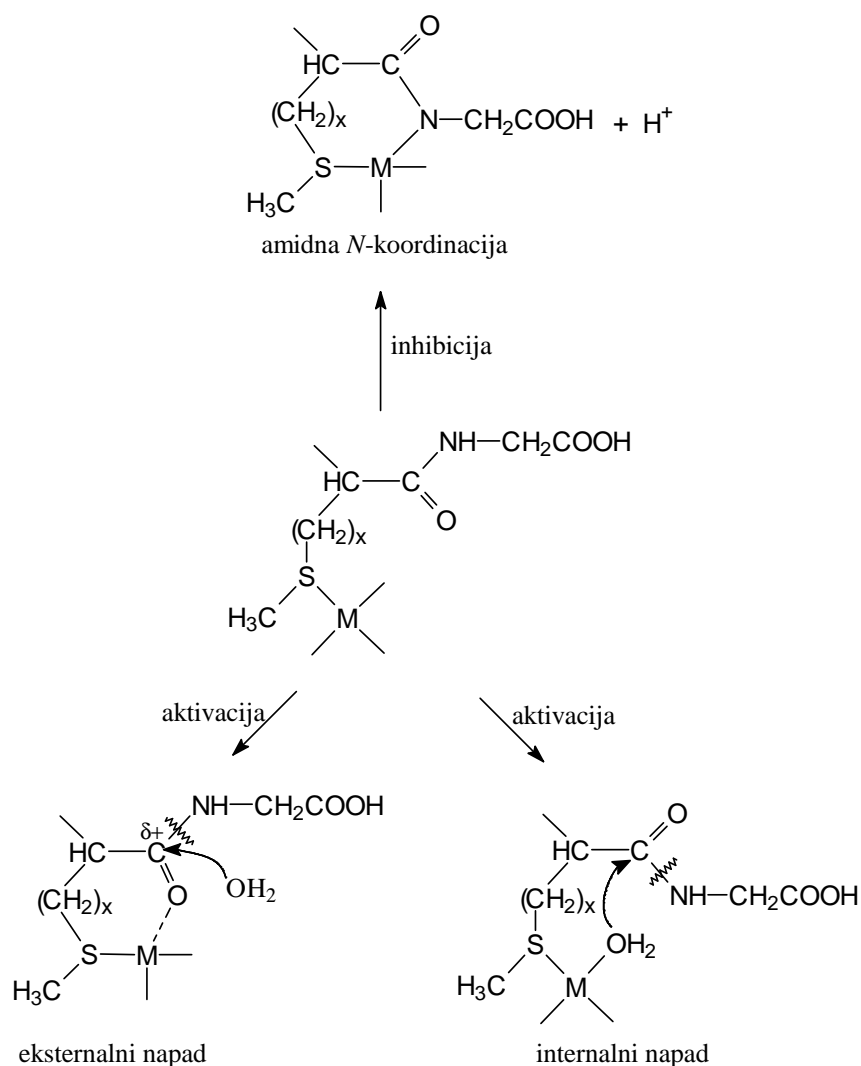
У присуству протеолитичких ензима X-Pro пептидна веза у пептидима који садрже -X-Pro-Met- и -X-Pro-His- фрагменте је веома резистентна на хидролизу. Када се као катализатор употреби $[Pd(H_2O)_4]^{2+}$ комплекс, X-Pro пептидна веза хидролизује у слабо киселој и неутралној средини. Селективно раскидање ове везе у пептидима са -X-Pro-Met- и -X-Pro-His- секвенцом, у неутралној средини, постигнуто је и применом $[Pd(CH_3SCH_2CH_2CH_2SCH_3)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса [23, 71].

Нађено је да место раскидања пептидне везе у пептидима који садрже метионин, зависи од употребљеног катализатора. За хидролизу MeCOAla-Lys-Tyr-Gly-Gly-Met-Ala-Ala-Arg-Ala употребљени су $[Pt(en)(H_2O)_2]^{2+}$ и $[Pd(H_2O)_4]^{2+}$ комплекси. Платина(II) комплекс у киселој средини (pH = 2,0) на 60 °C катализује региоселективну хидролизу Met-Ala пептидне везе. Ако се као катализатор употреби паладијум(II) комплекс хидролизује Gly-Gly пептидна веза [24].

Механизам хидролизе пептида који садрже аминокиселине L-метионин и L-цистеин помоћу комплекса платине(II) и паладијума(II)

Механизам реакције хидролизе пептида у присуству комплекса платине(II) и паладијума(II) као катализатора је веома сложен. Хидролиза пептида са комплексима ова два јона метала детаљно је изучавана и познате су кинетичке вредности многих реакција. Као што је познато, Pd(II) и Pt(II) јони имају велики афинитет за сумпор-везивне лиганде и брзо се координују за бочни низ L-цистеина, S-метил-L-цистеина и L-метионина. Уопштено се може рећи да се реакције хидролизе пептидне везе могу одвијати на два начина (Слика 9). Прва фаза у овим реакцијама је монодентатна координација Pt(II) и Pd(II) јона за бочни низ пептида. Ако се овако везан комплекс паладијума даље координује за депротоновани пептидни азот, при чему настаје стабилан хелатни комплекс, не долази до хидролизе пептидне везе. Међутим, ако комплекс метала интерреагује са карбонилним атомом кисеоника из пептидне везе, хидролиза је могућа. Интеракција јона метала са кисеониковим атомом условљава поларизацију карбонилне групе, па карбонилни атом угљеника постаје парцијално позитиван и погодан за нуклеофилни напад молекула воде. Молекул воде у овом случају потиче из растварача, па се овај механизам назива *екстернални начин* раскидања пептидне везе. Друга могућност је да молекул воде координован за јон метала врши нуклеофилни напад на угљеник карбонилне групе из одговарајуће пептидне везе. Молекул воде неопходан за хидролизу у овом случају потиче из комплекса метала, па се овај начин назива *интернални механизам* раскидања пептидне везе. Као што се види, разлика између ова два механизма је у пореклу молекула воде. Такође, могуће је да се ова реакција одвија комбинацијом ова два механизма. Оба механизма имају исти кинетички пут. Екстернални напад је доминантан када је фаворизовано формирање прстена, као на пример код хидролизе S-метил-глутатиона, где настаје шесточлани хелатни прстен. Интернални механизам

је фаворизован у случају када дужина бочног низа омогућава интеракцију молекула воде из комплекса са пептидном везом која се раскида, док је тада екстернални механизам немогућ јер захтева настајање већих прстенова (већих од шесточланог прстена) који су веома нестабилни. Према томе, у конкретном случају хидролиза MeCOMet-Gly пептида мора се одвијати по интерналном механизму, јер би за екстернални механизам било неопходно грађење седмочланог хелатног прстена.



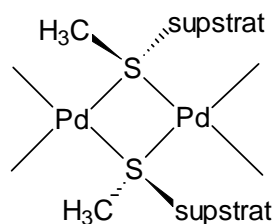
Слика 9. Шематски приказ интерналног и екстерналног начина хидролизе пептидне везе у присуству Pt(II) и Pd(II) комплекса

У циљу бољег разумевања механизма каталитичког деловања комплекса Pd(II) на хидролизу пептидне везе испитиване су реакције хидролизе MeCOMeCys-Gly и MeCOMeCys-Sar пептида [72]. У првом пептиду амино група глицина и

карбоксилна група цистеина граде класичну пептидну (-NH-C(O)-) везу, тако да се координација Pd(II) јона може одвијати било преко атома азота или кисеоника. У другом пептиду пептидни азот је метилован, тако да се Pd(II) јон једино може координовати преко карбонилног кисеониковог атома, при чему настаје шесточлани хелатни прстен.

Координовањем депротонованог пептидног азота пептидна веза се стабилизује, док координовањем карбонилног кисеоника за Pd(II) јон она слаби. Због тога што се Pd(II) јон у MeCOMeCys-Sar не може хелатно координовати за пептидни азот, константа хидролизе је 300 пута већа у овом пептиду у односу на MeCOMeCys-Gly. Код пептида код којих се у бочном низу налази метионин, Pd(II) јон при координацији за кисеоников атом пептидне везе затвара седмочлани хелатни прстен. Код пептида типа MeCOMet-Sar са *N*-метилованим азотовим атомом пептидне везе, хидролиза је око четири пута бржа у односу на пептид типа MeCOMet-Gly који садржи класичну пептидну везу. На основу овога може се закључити да код пептида који садрже *S*-метиловани цистеин Pd(II) јон са карбонилним кисеониковим атомом пептидне везе затвара шесточлани хелатни прстен, па је хидролиза овог пептида знатно бржа у односу на пептиде који у бочном низу садрже метионин, код којих Pd(II) јон и кисеоников атом пептидне везе граде седмочлани прстен.

На основу NMR спектроскопских података закључено је да различити хидролитички активни комплекси дају различите производе хидролизе. Када се у раствор пептида дода $[PdCl_4]^{2-}$ каталитички активна форма је мононуклеарни паладијум(II)-пептид комплекс. Међутим, када се пептид помеша са $[Pd(H_2O)_4]^{2+}$ настаје динуклеарни комплекс у коме су терминални лиганди молекули воде (Слика 10). Сви аква лиганди у овом комплексу су у *trans*-положају у односу на тиоетарски лиганд због чега су врло лабилни (*trans*-ефект). Насупрот овоме молекули воде су у приказаном комплексу у *cis*-положају у односу на супстрат због чега је могућа његова хидролиза. На основу кинетичких и стереохемијских ефеката може се закључити да су динуклеарни комплекси каталитички много ефикаснији у односу на одговарајуће мононуклеарне комплексе. У случају $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$, $[Pd(Me_4en)(H_2O)_2]^{2+}$ и *trans*- $[Pd(py)_2(H_2O)_2]^{2+}$ азот-донорски лиганди се супституишу са молекулима воде, при чему настаје динуклеарани паладијум(II)-пептид комплекс идентичан ономе који настаје у реакцији са $[Pd(H_2O)_4]^{2+}$ (Слика 10) [70,73].



Слика 10. Структурна формула каталитички активног динуклеарног Pd(II)-пептид комплекса који настаје у реакцији пептида који садрже тиоетарски атом сумпора у бочном ланцу са $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ комплексом

Монодентатни пиридински лиганд у $\text{trans-}[\text{Pd}(\text{py})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексу се много лакше супституише у односу на бидентатни етилендиамински, или N,N,N',N' -тетраметилетилендиамински лиганд, због чега се комплекс са пиридином много брже трансформише у одговарајући тетрааква комплекс. Вредности за константе брзине хидролизе за реакцију MeCOMet-Gly са различитим Pt(II) и Pd(II) комплексима дате су у табели 1.

Табела 1. Вредности за константе хидролизе пептидне везе у реакцијама MeCOMet-Gly пептида са различитим Pt(II) и Pd(II) комплексима^a

Катализатор	pH ^b	$10^3 k_{\text{obsd}}, \text{min}^{-1}$		Реф.
		40 °C	50 °C	
$[\text{PtCl}_4]^{2-}$	1,09	1,5		68
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	0,94	0,5		68
$[\text{PdCl}_4]^{2-}$	1,14	0,5		68
$[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$	1,07	26,0		68
$\text{trans-}[\text{Pd}(\text{py})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	1,05	33,0		73
$[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	1,00	14,0	57,0	69
$[\text{Pd}(\text{dtco})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+ \text{ c}}$	1,09	11,0		69
$[\text{Pd}(\text{en})(\text{CH}_3\text{OH})_2]^{2+}$	1,05	41 ^d		72
$[\text{Pd}_2(\mu\text{-SPh})_2(\text{sol})_4]^{2+}$	e	43		75

^aВодени раствор;

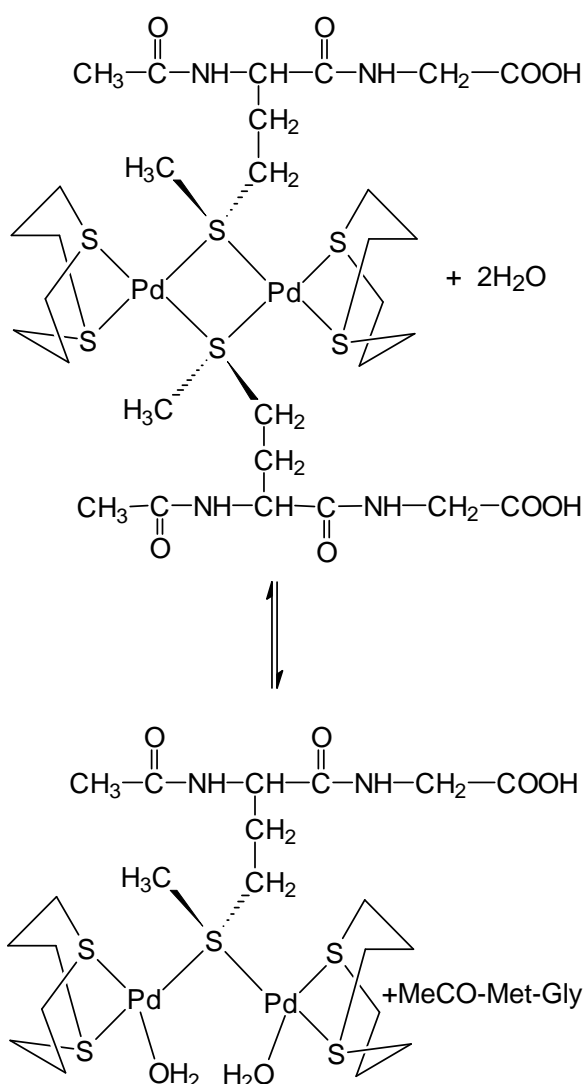
^bНије извршена корекција на изотопски ефекат;

^cКонцентрација катализатора је два пута већа у односу на супстрат;

^dВредност константе обухвата хидролизу и метанолизу

^eРастварач је 100 mM раствор HClO_4 у ацетону.

У случају испитивања реакција $[\text{Pd}(\text{dtco})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са пептидима који у бочном низу садрже тиоетарски атом сумпора кинетички и NMR подаци указују на постојање динуклеарног хидролитички активног комплекса који има два бидентатна 1,5-дитиоциклооктанска (dtco) лиганда (Слика 11). Као што се види, овај динуклеарни комплекс нема аква лиганде, али је ипак хидролитички активан. Каталитички активна форма палладијум(II)-пептид комплекса настаје дисоцијацијом једног од пептидних лиганда из динуклеарног комплекса. Присуство слободног пептида у равнотежној реакцији, приказаној на слици 11, потврђено је помоћу NMR спектроскопије. На овај начин формира се једномостни комплекс који има два аква лиганда у положају који је неопходан за хидролизу пептидне везе (Слика 11).



Слика 11. Структурна формула динуклеарног хидролитички активног комплекса који настаје у реакцији пептида који садрже L-метионин или S-метил-L-цистеин са $[\text{Pd}(\text{dtco})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$

Количина хидролизованог пептида директно зависи од молског односа супстрата и паладијум(II) комплекса. У случају молског односа 2 : 1, константа брзине је $k = 11,0 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, док је за 1 : 1 молски однос ова константа $k = 3,1 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Тиоуреа и тиоетри додати у реакциону смешу инхибирају ову реакцију јер се понашају као мостни лиганди, а вода неопходна за хидролизу не постоји.

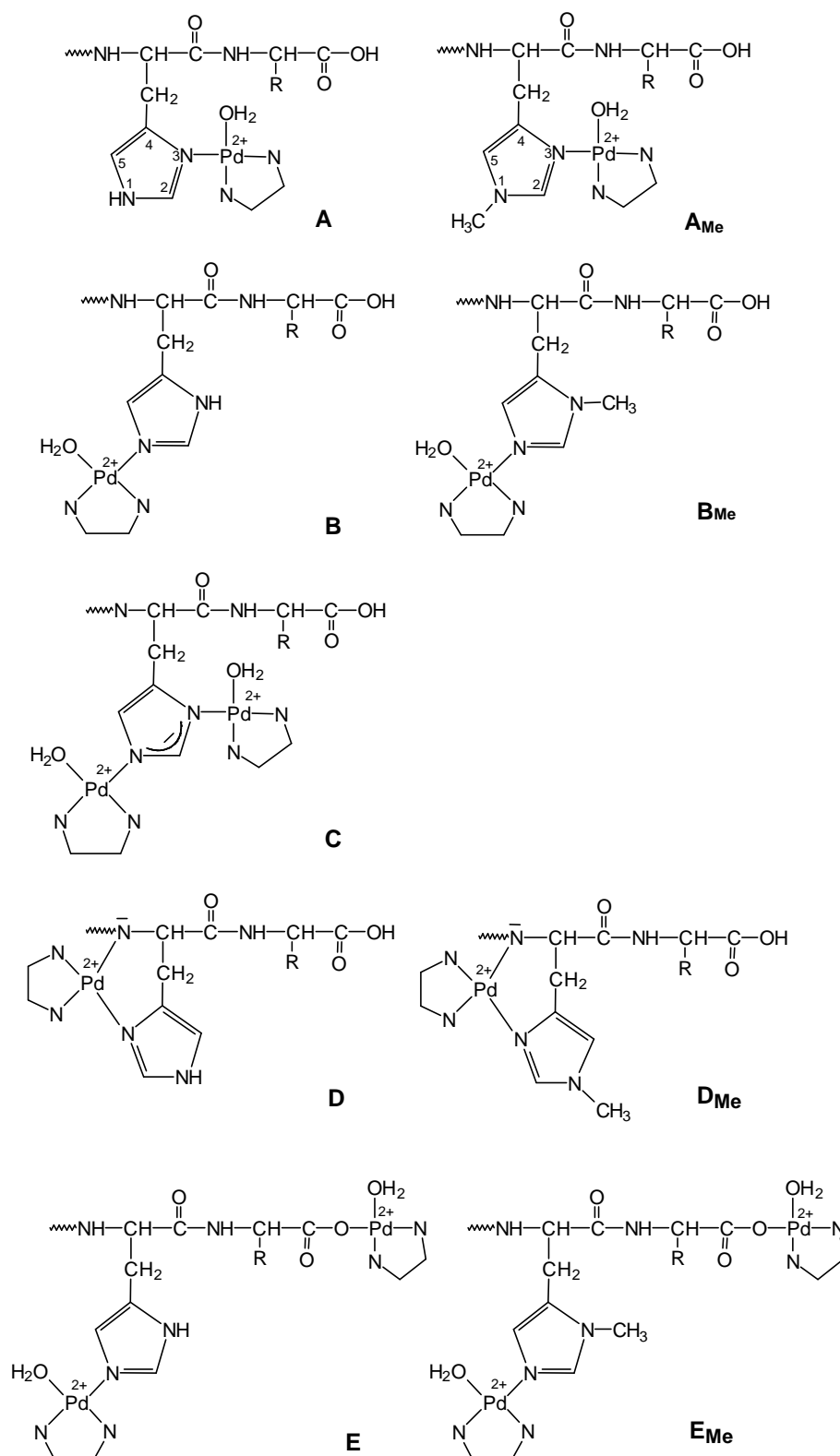
На основу NMR и кинетичких изучавања реакција инхибиције процеса хидролизе пептидне везе потврђено је да динуклеарни комплекс представља каталитички активну форму. У овим комплексима постоји могућност за интеракцију два јона метала. Ова кооперативност јона метала, такође је запажена и код динуклеарних комплекса који хидролизују фосфордиестарске везе у DNK и RNK [74].

Неке металохидролазе, као што су леуцин-аминопептидаза и метионин-аминопептидаза, такође имају динуклеарни активни центар са два јона метала који учествују у хидролизи. Један се координује за терминалну аминокиселинску групу и активира нуклеофил стабилизујући прелазно стање, док други поларизује карбонилну групу и стабилизује тетраедарски интермедијер. Ови резултати сугеришу да динуклеарни и полинуклеарни комплекси Pd(II) могу бити ефикаснији катализатори за хидролизу у односу на мононуклеарне комплексе. Динуклеарни $[\text{Pd}_2(\mu\text{-SPh})_2(\text{sol})_4]^{2+}$ комплекс (Слика 5) коришћен је као катализатор за хидролизу пептидне везе [75]. У овом комплексу мостни тиолатни лиганд се не може супституисати са доносним групама из пептида. На слабо и реверзибилно координовање метионина из пептида за Pd(II) утиче *trans*-ефекат тиолатних атома сумпора који се налазе у комплексу. Ова комбинација стабилних мостних лиганда и лабилног терминалног лиганда је врло добра за реакције хидролизе.

На основу испитивања реакција хидролизе дипептида типа MeCOMet-X који имају различиту C-терминалну аминокиселину (X), закључено је да волуминозност ове аминокиселине значајно утиче на брзину хидролизе. Користећи динуклеарне комплексе као катализаторе знатно се смањује полувреме хидролизе. Полувреме хидролизе MeCO-Met-Ala је 35 минута на собној температури, а само 5 минута на 50 °C. Према томе, $[\text{Pd}_2(\mu\text{-SPh})_2(\text{sol})_4]^{2+}$ је веома реактиван неензимски катализатор хидролизе пептидне везе.

Хидролиза пептида који садрже аминокиселину L-хистидин помоћу комплекса паладијума(II) и платине(II)

Азотови атоми имидазола из аминокиселине хистидина имају изражен афинитет за координовање са Pd(II) и Pt(II) јонима. У пептидима након координовања јона метала за N3 атом азота имидазоловог прстена долази до хелатног везивања јона метала за један, два или три пептидна атома азота при чему се формирају хелатни комплекси. Хелатни комплекс који при томе настаје садржи један шесточлани прстен који је настао координовањем N3 атома азота из имидазола и пептидног азота. Поред тога, настали метал-пептид комплекс може имати још један, односно максимално два петочлана хелатна прстена који садрже координоване пептидне атоме азота. Као што је раније поменуто Pd(II) јон је веома ефикасан у депротонавању пептидног азота, ако је претходно координован за атом азота имидазоловог прстена [60,76-81]. У пептидима код којих је хистидин N-терминална аминокиселина настаје веома стабилан Pd(II)-пептид комплекс у коме је Pd(II) координован преко N3 атома имидазоловог прстена и азота терминалне амино групе [82]. На овај начин настаје хидролитички неактиван Pd(II) комплекс у коме је Pd(II) јон удаљен од пептидне везе која садржи карбоксилну групу хистидина, тако да не долази до њене хидролизе. Ацетиловањем N-терминалног краја у пептидима који садрже N-терминални хистидин спречава се бидентатна координација пептида за катализатор, што има за последицу настајање хидролитички активног комплекса који доводи до хидролизе пептидне везе. Применом ^1H NMR спектроскопије испитиване су реакције Pd(II) комплекса са MeCOHis-Gly пептидом [54,83]. У реакционој смеси овог дипептида и $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса у молском односу 1 : 1 и рН око 2,0 на основу резултата ^1H NMR спектра потврђено је постојање пет паладијум(II)-пептид комплекса, означених у овом раду као **A**, **B**, **C**, **D** и **E** (Слика 12). Етилендиамински лиганд остаје координован за Pd(II) у току реакције са MeCOHis-Gly пептидом јер азотови атоми имидазола имају слаб *trans*-ефекат, за разлику од атома сумпора из метионина, који због јаког *trans*-ефекта доводи до елиминације етилендиаминског лиганда из $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса. Пет паладијум(II)-пептид комплекса који настају у реакцији $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ са MeCOHis-Gly идентификовани су на основу разлика у хемијским померањима за C2H и C5H протоне имидазоловог прстена.



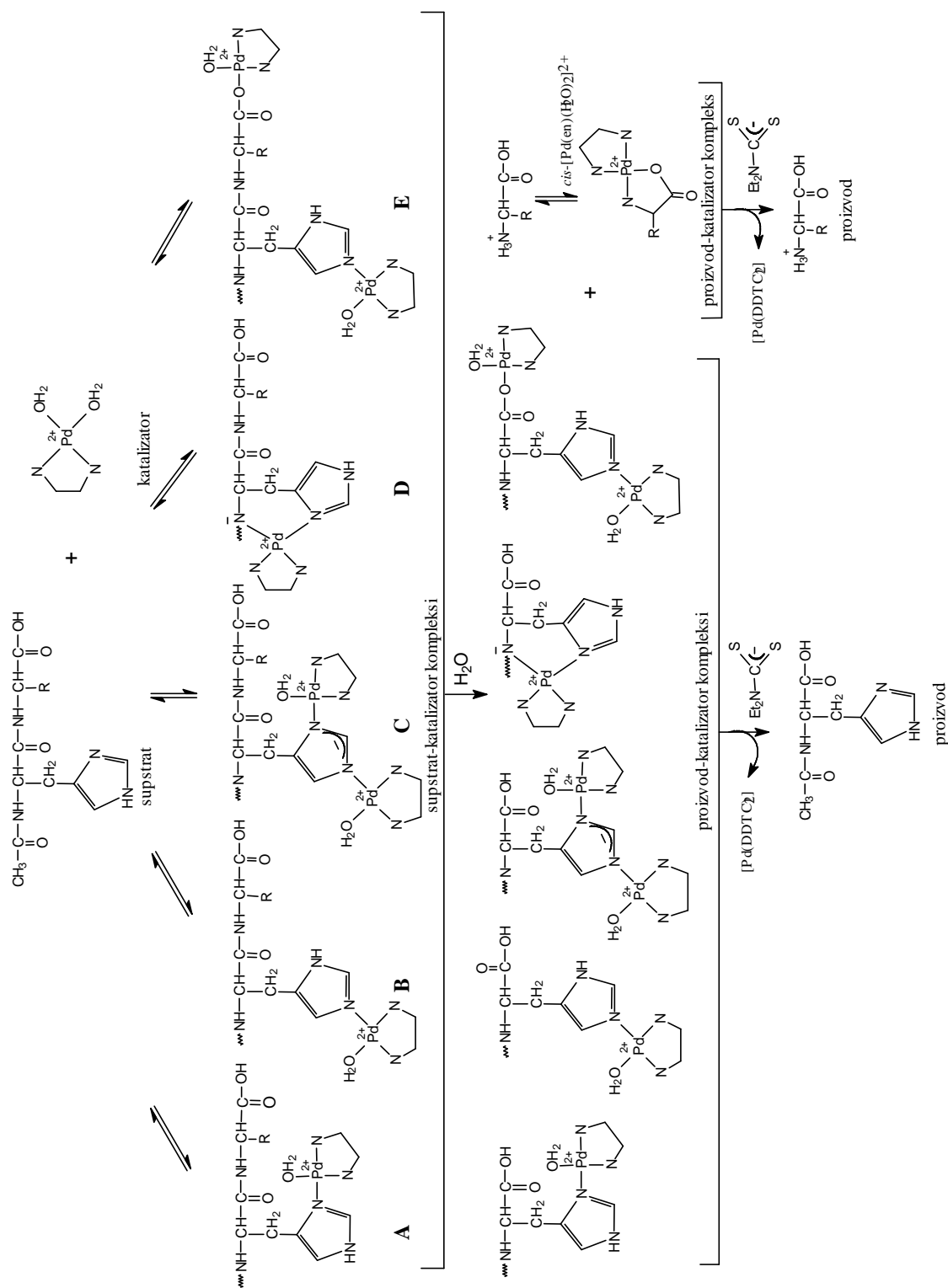
Слика 12. Шематски приказ структурних формула паладијим(II)-пептид комплекса који су окарактерисани на основу ^1H NMR спектроскопије у реакцији дипептида MeCOHis-Gly и његових *N*-метиллованих деривата са $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексом [84]

Добијене вредности хемијских померања су у сагласности са публикованим резултатима за реакцију $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са MeCOHis-Gly пептидом и његовим дериватима [6,58,59]. У комплексима **A** и **B** паладијум(II) јон је координован преко N3, односно N1 атома азота из имидазолског прстена. У комплексу **C** оба азотова атома имидазолског прстена су координована за Pd(II), тако да овај прстен представља мост између два паладијум(II) јона. Комплекс **D** настаје из комплекса **A** након депротонавања пептидног азота и његовог координовања за Pd(II). Резултати показују да је рКа вредност депротонавања пептидног азота око 2, или мања уколико је Pd(II) јон координован за бочни низ аминокиселине [4]. Комплекс **E** садржи Pd(II) координован за N1 атом азота имидазолског прстена и депротонван карбоксилни кисеоник C-терминалне аминокиселине. Постојање комплекса који садржи два молекула пептида координована за Pd(II) јон није потврђено.

Ови начини координовања потврђени су на основу реакција $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ са MeCOHis-Gly у коме је селективно метилован N1 или N3 атом азота [84]. Дериват код кога је метилован N1 атом азота имидазолског прстена ($\text{MeCOHis}(\text{N1-Me})\text{-Gly}$) даје паладијум(II)-пептид комплексе који су означени као **A_{Me}** и **D_{Me}**, док N3 метиловани дериват ($\text{MeCOHis}(\text{N3-Me})\text{-Gly}$) даје **B_{Me}** и **E_{Me}** комплексе (Слика 12).

Полувреме хидролизе пептидне везе у MeCOHis-Gly дипептиду при рD 1,36 и температури од 60 °C је око 50 дана. Међутим, у присуству еквимоларне количине $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса пептидна веза хидролизује много брже и хидролиза је комплетна за мање од 2 дана. Реакција хидролизе шематски је представљена на слици 13.

На основу кинетичких испитивања реакција са пептидима који садрже метионин закључено је да су реакције хидролизе првог реда. Нађено је да је за хидролизу неопходно координовање пептида за Pd(II) и да је хидролитичка реакција интрамолекуларског типа, као и то да се одвија преко пептид-Pd(II) комплекса. Присуство слободног глицина и одсуство слободне сирћетне киселине у реакционој смеси након завршене реакције доказује да хидролизује само пептидна веза која садржи карбоксилну групу хистидина. При упоредним експериментима са MeCOGly-His пептидом нађено је да ниједна пептидна веза не хидролизује. Према томе, резултати показују да у реакцијама са Pd(II) комплексима и пептидима који садрже слободну карбоксилну групу хистидина не долази до хидролизе пептидне



Слика 13. Шематски приказ реакције хидролизе MeCONHis-X дипептида помоћу $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса (X је нека од аминокиселина која не садржи хетереоатом у бочниом низу) [54]

везе. Тако у трипептиду MeCOGly-His-Gly само His-Gly пептидна везе хидролизује, док преостале две пептидне веза MeCO-Gly и Gly-His не хидролизују.

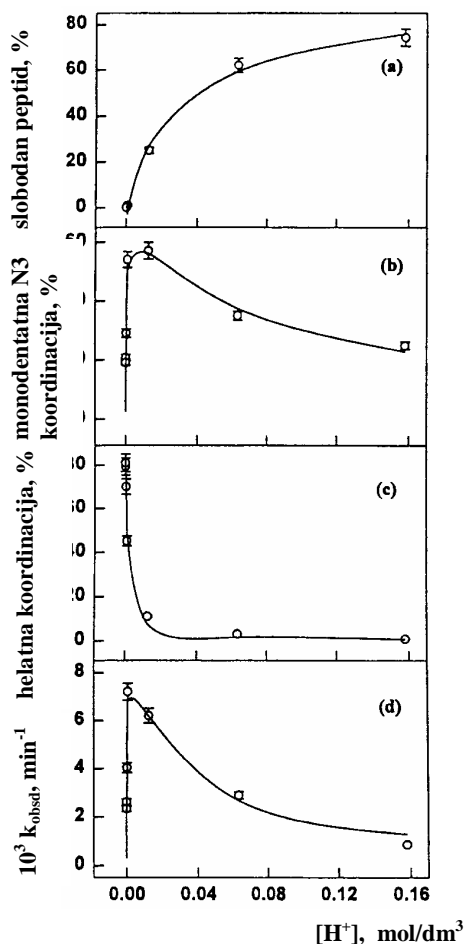
Прва испитивања реакција хидролизе вршена су при $1,46 < \text{pH} < 2,61$ [54]. Утврђено је да су концентрације комплекса **A** и **B** у овој pH области константне, док се концентрације комплекса **C**, **D** и **E** смањују са смањењем pH вредности. Утицај pH на концентрацију различитих паладијум(II)-пептид комплекса је у сагласности са начином координовања пептида за Pd(II) јон. Са смањењем pH вредности константа брзине хидролизе се повећава, упркос чињеници што се тада количина координованог дипептида за Pd(II) јон смањује. Ово је логично с обзиром на чињеницу да сви начини координовања пептида нису погодни за хидролизу. У раствору постоји равнотежа између пет паладијум(II)-пептид комплекса, слободног пептида и катализатора (Слика 13). Резултати показују да се при смањењу pH вредности смањује концентрација комплекса **C**, **D** и **E** који су каталитички неактивни.

Каталитички активни комплекс идентификован је у експериментима са *N*-метилованим дериватима MeCOHis-Gly дипептида. Нађено је да у реакцији MeCOHis(N3-Me)-Gly са $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ настају само **B_{Me}** и **E_{Me}** комплекси, а да не долази до хидролизе пептидне везе (Слика 12). Ово се може објаснити тако што је паладијум(II) јон координован за N1 атом азота у ова два Pd(II)-пептид комплекса вероватно далеко од His-Gly пептидне везе, па због тога не може да интерреагује са њом и утиче на њену хидролизу. У реакцији MeCOHis(N1-Me)-Gly и $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ у раствору настају **A_{Me}** и **D_{Me}** комплекси, а пептидна His-Gly веза веома брзо хидролизује. На основу ових испитивања закључено је да су оба, или евентуално само један од ових комплекса, каталитички активни. У реакцији $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ са неацетилованим His(N1-Me)-Gly дипептидом у приносу од 95% настаје комплекс који је идентичан комплексу **D**, док се преосталих 5% односи на комплекс типа **A**. Након два дана реакције само је 10% His-Gly пептидне везе хидролизовало. На основу ових испитивања закључено је да је комплекс типа **D** каталитички неактиван. У овом пептид-Pd(II) комплексу јон метала не садржи аква лиганде и на супротној је страни од His-Gly пептидне везе. На основу тога закључено је да је каталитички активно једињење комплекс типа **A_{Me}**. У **A_{Me}** типу комплекса Pd(II) јон може да интерреагује са His-Gly пептидном везом и да на тај начин катализује њену хидролизу. Хидролиза се може вршити по интерналном или екстерналном

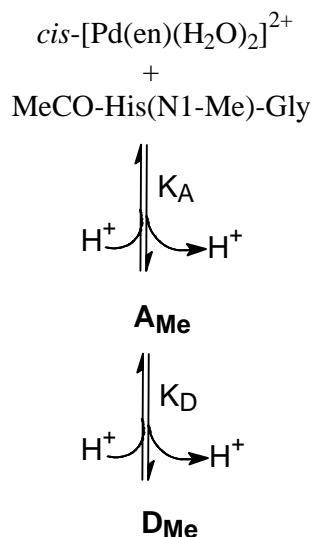
механизму, што зависи од порекла молекула воде, а такође могућа је и комбинација ова два механизма.

Испитиван је ефекат киселости раствора на вредност константе брзине хидролизе His-Gly пептидне везе у MeCOHis(N1-Me)-Gly пептиду. У зависности од рН вредности у реакционој смеши коју чине овај пептид и Pd(II) комплекс постоји равнотежа између A_{Me} и D_{Me} комплекса. Када се реакције хидролизе изводе у рН области $0,8 < \text{pH} < 5,0$ (концентрација H_3O^+ јона се мења од $1,6 \cdot 10^{-1}$ М до $1,0 \cdot 10^{-5}$ М) постоји конкуренција између H_3O^+ и Pd(II) јона за донорске атоме у пептиду. Као резултат тога евидентно је да се количина некординованог пептида смањује са повећањем концентрације H_3O^+ јона (Слика 14а). Такође, резултати испитивања показују да се концентрација комплекса A_{Me} повећава са смањењем киселости раствора све док концентрација H_3O^+ јона не достигне приближно вредност од $1,0 \cdot 10^{-2}$ М. Даљим смањењем концентрације H_3O^+ јона нагло опада концентрација A_{Me} комплекса, док се насупротив овој концентрација комплекса D_{Me} повећава (Слика 14b и Слика 14c). Конверзија A_{Me} у D_{Me} је могућа јер при овој рН вредности Pd(II) јон веома ефикасно депротонује пептидни азот и хелатно се координује за пептид. Ова равнотежна реакција је приказана на слици 15. Константе равнотеже за наведену реакцију су $K_A = 3,4$ и $K_D = 5,0 \cdot 10^{-3}$. Последњој вредности за константу равнотеже одговара $\text{p}K_D = 2,3$ што је приближно једнако $\text{p}K = 2,0$ када Pd(II) депротонује пептидни азот [58].

Графици који приказују зависности концентрације A_{Me} комплекса од киселости раствора (Слика 14b) и зависности константе хидролизе од киселости раствора (Слика 14d) су веома слични. Сличност ова два графика је у складу са чињеницом да хидролитички активно једињење одговара A_{Me} комплексу и да киселост раствора утиче на вредност константе хидролизе као регулатор концентрације каталитички активног комплекса. Разлика између графика на слици 14c и 14d потврђује да је комплекс D_{Me} каталитички неактиван.

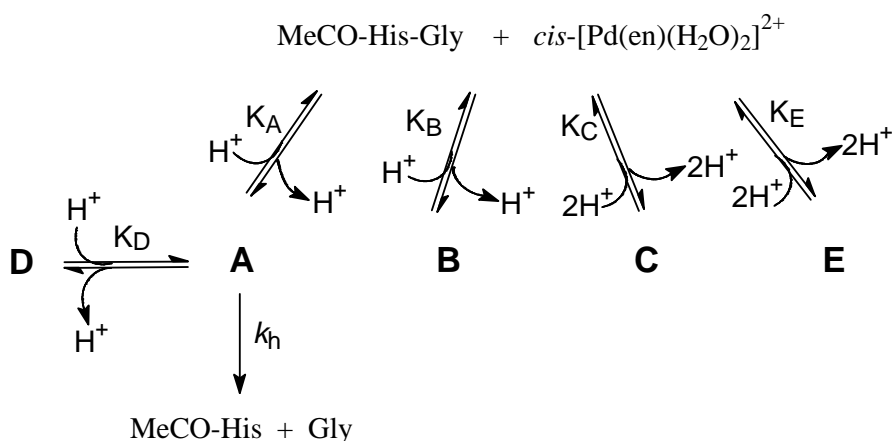


Слика 14. Ефекат киселости раствора на равнотежу еквимоларне смеше дипептида и $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ у D_2O на $60\text{ }^\circ\text{C}$: а) Зависност концентрације координованог пептида за $\text{Pd}(\text{II})$ јон; б) Зависност концентрације $\text{Pd}(\text{II})$ -пептид комплекса у којем је пептид монодентатно преко N3 атома азота координован за $\text{Pd}(\text{II})$ јон; в) Зависност концентрације $\text{Pd}(\text{II})$ -пептид комплекса у којем је пептид бидентатно преко N3 атома азота из имидазоловог прстена и депротонованог пептидног азота хелатно везан за $\text{Pd}(\text{II})$ јон; и д) Зависност вредности константе хидролизе His-Gly пептидне везе [87]



Слика 15. Шематски приказ равнотежне реакције између $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса и MeCOHis(N1-Me)-Gly пептида

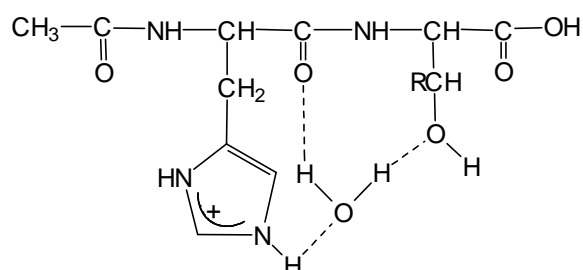
Као што се из слике 16 види, само је комплекс типа **A** каталитички активан. Други начини координовања пептида за катализатор дају каталитички неактивне паладијум(II)-пептид комплексе. Међутим, све реакције у раствору су реверзибилне и инактивни паладијум(II)-пептид комплекси могу прећи у активни комплекс типа **A**, тако да пептидна веза на крају комплетно хидролизује.



Слика 16. Механизам хидролизе His-Gly пептидне везе у MeCOHis-Gly пептиду у присуству $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса [54]

Ефекат одлазеће групе на брзину хидролизе испитиван је на серији дипептида MeCOHis-X типа, у којима C-терминална аминокиселина X је Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Phe, или Tyr. Пошто је природа пептидне везе у наведеним пептидима идентична, брзине њене хидролизе једино зависи од природе бочног низа C-терминалних аминокиселина. За пет од седам испитиваних пептида вредности константе брзине хидролизе линеарно опадају са повећањем стерног ефекта C-терминалне аминокиселине. На основу вредности константе брзине хидролизе His-X пептидних веза може се закључити да брзина хидролизе зависи од могућности интеракције Pd(II) јона са пептидном везом која хидролизује. Вредности константе брзине хидролизе пептидне везе за MeCOHis-Ser и MeCOHis-Thr пептиде одступају од линеарности. Ако се узме у обзир стерни ефекат одлазеће аминокиселине (Ser и Thr) у ова два пептида хидролиза пептидне везе је много спорија. Ово се може објаснити на основу резултата NMR спектроскопије и молекулског моделирања. Хидроксилна група из бочног низа Ser и Thr гради водоничну везу, као што је приказано на слици 17.

Као што је раније речено, координовањем Pd(II) јона за N3 атом имидазоловог прстена настаје хидролитички активан Pd(II)-пептид комплекс. Као што се на слици 17 види, водонична веза се успоставља преко N1 атома имидазоловог прстена, молекула воде из растварача, карбонилног атома кисеоника и хидроксилне групе у бочном низу Ser или Thr. Формирање ове везе успорава ротацију имидазоловог прстена, а самим тим и интеракцију Pd(II) са His-X пептидном везом. Последица тога је спорија хидролиза His-Ser и His-Thr пептидних веза. Аминокиселина тирозин има хидроксилну групу у бочном ланцу, али се у MeCOHis-Tyr пептиду не може успоставити водонична веза због стерног ефекта ароматичног прстена који је у овом случају доминантан.



Слика 17. Шематски приказ водоничног везивања у MeCOHis-Ser и MeCOHis-Thr пептидима

У реакцијама између паладијум(II) комплекса типа $[Pd(L)(H_2O)_2]^{2+}$ у којима је L хелатно координовани диамински лиганд (етилендиамин, en; 1,2-пропилендиамин, 1,2-pp; *N*-метилетилендиамин, Meen; изобутилендиамин, ibn; и *N,N,N',N'*-тетраметилетилендиамин, Me₄en) или S,*N*-координована аминокиселина (*S*-метил-L-цистеин, MeS-L-HCys и L-метионин, L-HMet) и MeCOHis-Gly пептида у рН области од 2,0 до 2,5 на 60 °C одвија се селективна хидролиза His-Gly пептидне везе [85]. Брзина хидролизе пептидне везе опада са повећањем стерног ефекта комплекса (en > 1,2-pp > Meen > MeS-L-HCys > ibn > L-HMet > Me₄en) што се доводи у везу са стерним ефектима катализатора.

Хидролиза пептидне везе у MeCOHis-Gly, MeCOHis и њиховим N1 и N3 метилованим дериватима испитивана је у присуству $[PdCl_4]^{2-}$ и $[Pd(H_2O)_4]^{2+}$ комплекса [86]. У реакцији $[PdCl_4]^{2-}$ са MeCOHis-Gly и његовим N1 и N3 метилованим дериватима настају комплекси типа А-Е. У свим реакцијама само је пептидна веза која садржи карбоксилну групу хистидина хидролизовала, док веза која садржи амино групу хистидина није хидролизовала (*селективна хидролиза*). Укупан број циклуса за хидролизу наведене пептидне везе био је пет. Резултати испитивања показују да је $[Pd(H_2O)_4]^{2+}$ хидролитички активнији у односу на $[PdCl_4]^{2-}$ комплекс и да овај комплекс катализује хидролизу како пептидне везе која садржи карбоксилну групу хистидина, тако и пептидне везе у чију структуру улази амино група хистидина (*неселективна хидролиза*). У реакцији $[Pd(H_2O)_4]^{2+}$ са MeCOHis-Gly и MeCOHis и његовим N1 и N3 метилованим дериватима Pd(II)-пептид комплекси типа А или В (А, А_{Me}, В, В_{Me}) катализују хидролизу пептидних веза. Нађено је да обе пептидне везе у наведеним пептидима хидролизују приближно истом брзином, а производи су сирћетна киселина, глицин, хистидин или његов *N*-метиловани дериват. Из података у табели 2 види се да пептидна веза која садржи карбоксилну групу хистидина хидролизује 1,7 до 4,5 пута брже у односу на пептидну везу која садржи амино групу хистидина.

Механизам хидролизе пептидних веза у MeCOHis-Gly, MeCOHis и њиховим N1 и N3 метилованим дериватима помоћу одговарајућих комплекса паладијума(II) је дискутован на основу молекулско-динамичких симулација. Закључено је да у случају када се паладијум(II) координује за N3 атом азота имидазолског прстена настали паладијум(II)-пептид комплекс се налази у повољној конформацији која омогућава хидролизу обе пептидне везе. Хидролиза се може одвијати по

интерналном или екстерналном механизму, или комбинацијом ова два механизма. Координовањем Pd(II) за N1 атом настаје паладијум(II)-пептид комплекс који има погодну конформацију за хидролизу обе пептидне везе, али само по интерналном механизму.

У реакцији $[\text{Pd}(\text{L-Ala-N},\text{O})\text{Cl}_2]^-$ и $[\text{Pd}(\text{L-Ala-N},\text{O})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ комплекса са MeCOHis-Gly за мање од 24 сата на рН од 1,5 до 2,5 одвија се комплетна хидролиза His-Gly пептидне везе. Хидролиза овог пептида је селективна. У реакцијама између ова два паладијум(II) комплекса и MeCOGly-His и MeCOGly-Gly-His пептида, код којих је карбоксилна група хистидина слободна, хидролизују MeCO-Gly и Gly-Gly пептидне везе, док у реакцији са трипептидом MeCOGly-His-Gly хидролизују MeCO-Gly и His-Gly пептидне везе. Механизам ових неселективних хидролитичких реакција садржи елиминацију хелатно координованог L-Ala лиганда у полазном комплексу праћену координовањем два молекула воде за паладијум(II) јон, као и хелатну координацију овог јона за пептид преко N3 атома азота из имидазола и депротонованог пептидног азота [87].

Табела 2. Вредности за константе брзине за супstrate који садрже хистидин у реакцији са $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ или $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ комплексима

Супстрат	$10^4 k_{obsd}, \text{min}^{-1}$		
	$[\text{PdCl}_4]^{2-}$	$[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$	
		His-Gly	MeCOHis
MeCOHis-Gly	5,0	29	49
MeCOHis		21	
MeCOHis(N1-Me)-Gly	5,2	22	43
MeCOHis(N1-Me)	20		
MeCOHis(N3-Me)-Gly	4,1	11	49
MeCOHis(N3-Me)		10	

Испитивања реакција хидролизе пептидних веза у полипептидима помоћу паладијум(II) комплекса су показала да, поред хидролизе His-X пептидне везе (X је било која аминокиселина), хидролизује и пептидна веза која се налази у суседству везе која садржи амино групу из хистидина. Тако, резултати испитивања реакција

MeCOGly-Gly-His-Gly пептида са паладијум(II) комплексима су показали да у овом пептиду хидролизују His-Gly и Gly-Gly пептидне везе. Хидролиза биолошки активног пептида ангиотенсина II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) са $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ квантитативно је испитивана [88]. Нађено је да се хидролиза His-Pro пептидне везе у овом пептида одвија брзо, док је хидролиза Tyr-Ile везе знатно спорија и она захтева елиминацију етилендиаминског лиганда са Pd(II) јона. Испитивања реакција хидролизе S-оксидованог облика инсулина помоћу комплекса паладијума(II) су показала да се у ланцу В овог пептида такође, кида пептидна веза која се налази у суседству везе која садржи аминок групу хистидина. Међутим, у свим наведеним случајевима нађено је да не долази до хидролизе пептидне везе у чију структуру улази аминок група из хистидина. Претходно описани резултати су веома значајни и са аспекта потенцијалне примене комплекса паладијума за селективно раскидање пептидних веза у протеинима.

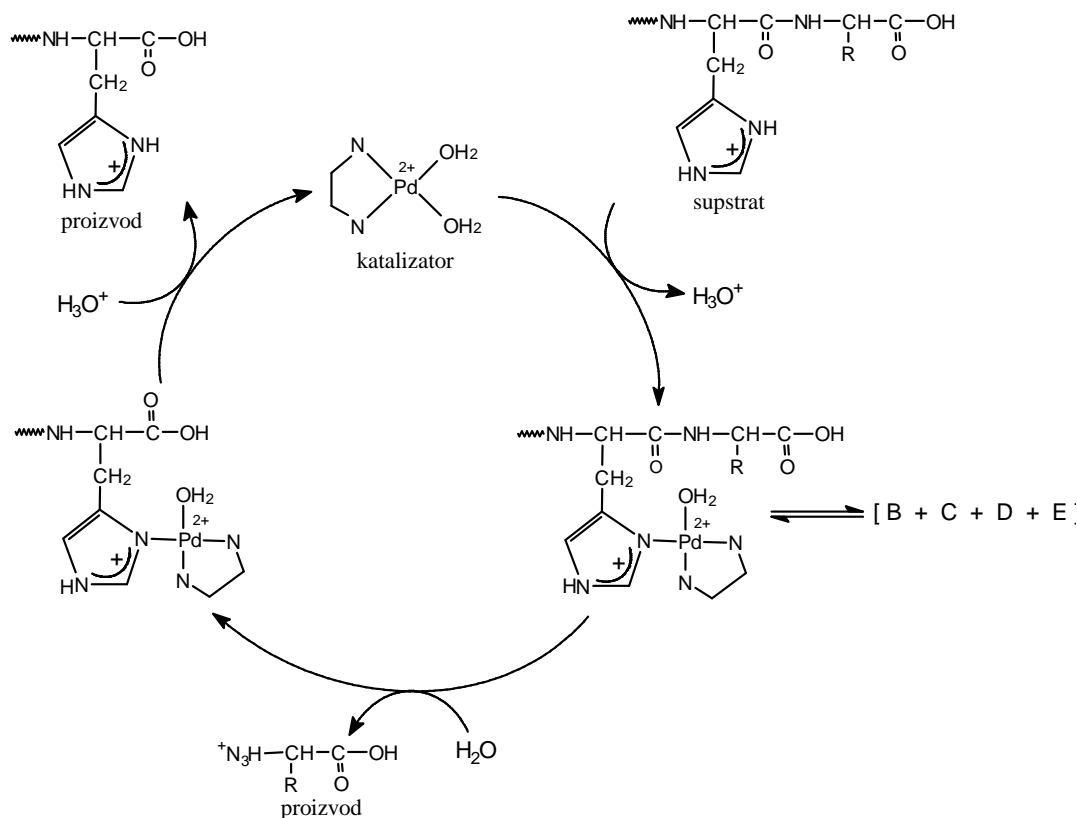
Циклус катализатора у реакцијама хидролизе пептида који садрже хистидин

Када се катализатор и супстрат помешају у молском односу 1 : 1 хидролиза супстрата је комплетна без обзира што у реакционој смеси настаје пет различитих Pd(II)-пептид комплекса (комплекси **A**, **B**, **C**, **D** и **E**; види слику 13) од којих је само комплекс **A** каталитички активан. Комплетност хидролизе пептидне везе може се објаснити чињеницом да се Pd(II)-пептид комплекс типа **A** понаша као катализатор и да се са временом, како хидролиза тече, равнотежа између комплекса **A-E** у раствору помера у правцу настајања комплекса **A** (Слика 18). Да комплекс паладијума(II) делује каталитички на реакцију хидролизе пептидне везе потврђено је у случају када се ацетиловани дипептид MeCOHis-Gly и $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ помешају у молском односу 4 : 1. Потпуна хидролиза супстрата, који је додат у вишку, потврђује циклусно дејство катализатора на његову хидролизу.

Најновији резултати су показали да ако је број циклуса у каталитичкој реакцији хидролизе пептидне везе у супстрату већи од четири у реакционој смеси постоји само комплекс типа **A**. Да би комплекс паладијума(II) поново ушао у нови циклус неходно је да се раскине Pd(II)-N3(imidazol) веза.

Раскидање ове везе потпомогнуто је присуством H_3O^+ јона у раствору који се упоредо са Pd(II) јоном могу координовати за N3 атом азота из имидазоловог прстена. На овај начин H_3O^+ јони конкуришу Pd(II) јону и потпомажу раскидање

његове везе са N3 атомом азота из имидазола (Слика 18). Катализатор ослобођен под дејством H_3O^+ јона реагује са другим молекулом супстрата, раскида пептидну везу, а затим се поново супституише са H_3O^+ јонима и циклус се тако наставља даље.



Слика 18. Циклусно каталитичко раскидање пептидне везе у пептидима који садрже хистидин у присуству $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса [84]

Реакције комплекса платине(II) са пептидима који садрже аминокиселине L-хистидин и L-метионин

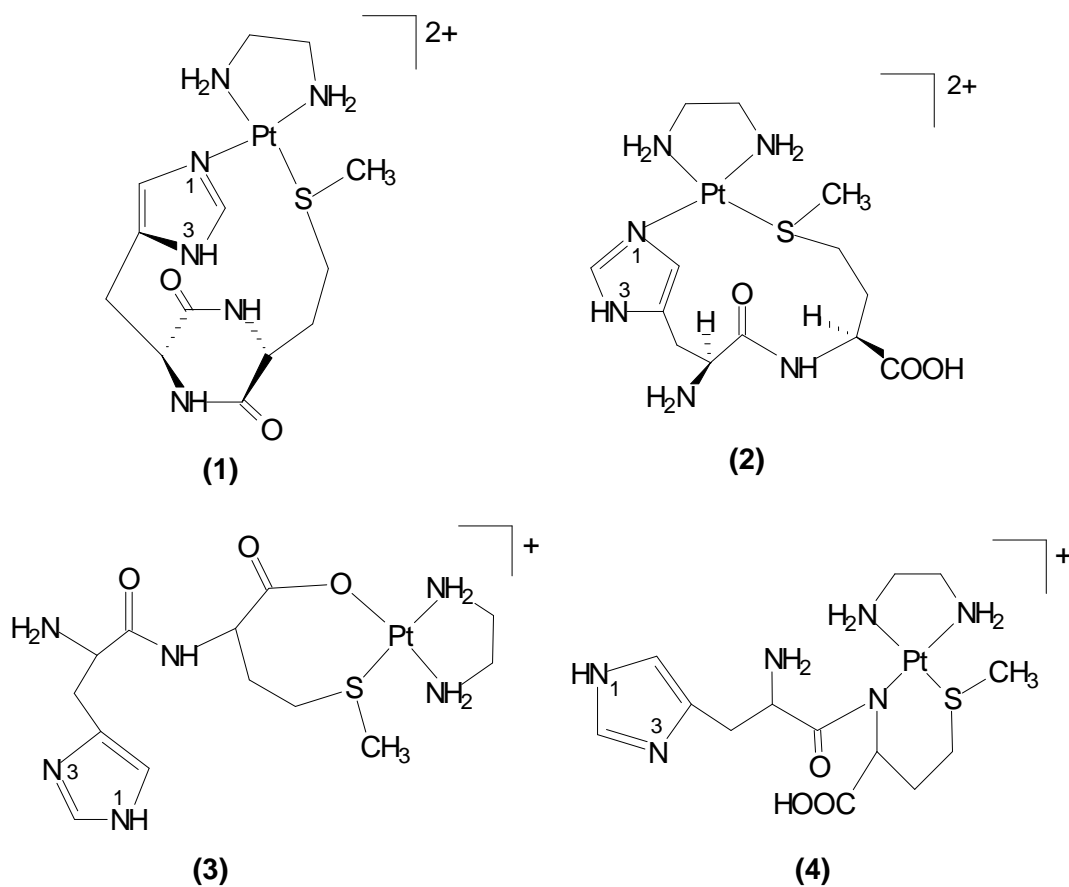
Реакције са $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексом

Реакције комплекса $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ са дипептидима који садрже L-хистидин и L-метионин (ciklo(-His-Met-), His-Met и Met-His) су испитиване применом HPLC и NMR спектроскопије на температури од 40 °C и pH области од 3,2 до 11,2 [89].

Циклични пептид ciklo(-His-Met-) бидентатно се координује преко атома сумпора из метионинског остатка и N1 атома азота имидазоловог прстена за Pt(II) при чему настаје $[\text{Pt}(\text{en})\{\text{ciklo}(-\text{His-Met-})-\text{N1,S}\}]^{2+}$ комплекс (Слика 19, комплекс 1). Овај макрохелатни комплекс са дванаесточланим хелатним N1,S-прстеном настаје у

првих неколико минута реакције и једини је производ при $\text{pH} < 8,0$. Дванаесточлани N1,S -хелатни прстен је веома флексибилан, чиме се може објаснити стабилност и кинетичка инертност ове комплексне врсте у раствору. Повећањем pH вредности ($\text{pH} > 9,0$) нађено је да у раствору постоји и $[\text{Pt}(\text{en})\{\text{ciklo}(-\text{His-Met-})-\text{N,S}\}]^+$ комплекс, код кога је $\text{ciklo}(-\text{His-Met-})$ координован преко атома сумпора из метионина и депротонованог атома азота His-Met пептидне везе.

Стабилни $[\text{Pt}(\text{en})(\text{His-Met-N1,S})]^{2+}$ макрохелат (Слика 19, комплекс **2**) се формира, као главна комплексна врста у реакцији $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и His-Met дипептида у pH области од 3,2 до 11,2, након 14 дана. При $\text{pH} = 4,5$ нађено је да у раствору постоји $[\text{Pt}(\text{en})(\text{His-Met-O,S})]^+$ комплекс (Слика 19, комплекс **3**), који брзо прелази у термодинамички стабилније $[\text{Pt}(\text{en})(\text{His-Met-N1,S})]^{2+}$ (**2**) и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{His-Met-N,S})]^+$ (**4**) комплексе. У базној средини, након координовања атом азота пептидне везе у $[\text{Pt}(\text{en})(\text{His-Met-N,S})]^+$ комплексу, долази до раскидања Pt-S везе и координације атома азота терминалне амино групе за платину(II), при чему се формира $[\text{Pt}(\text{en})(\text{His-Met-N,N}')]^+$ хелатни комплекс.

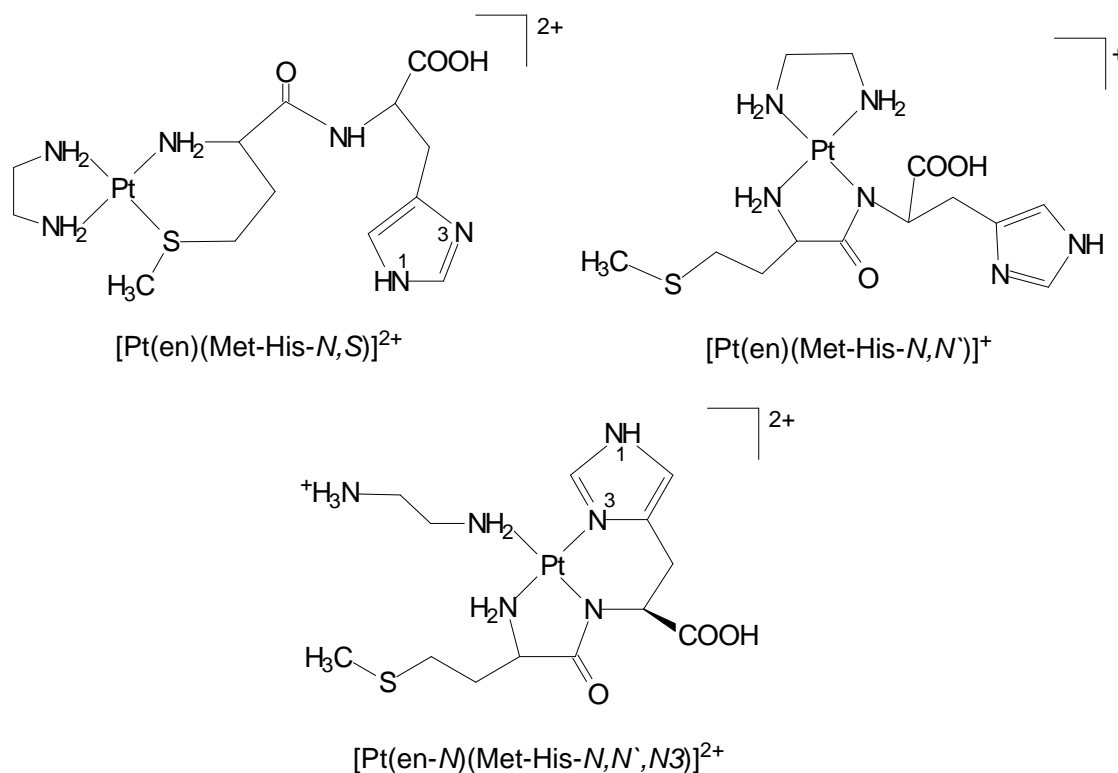


Слика 19. Структурне формуле комплекса који настају у реакцији $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ са $\text{ciklo}(-\text{His-Met-})$ и His-Met пептидима

Дванаесточлани хелатни прстен у комплексу (**2**) показује велику стабилност, чак и у базној средини (pH = 7 - 10) у којој су $[\text{Pt}(\text{en})(\text{His-Met-N},\text{N3})]^{2+}$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{His-Met-N},\text{N}')]^{+}$ комплекси, са координованим атомом азота терминалне амино групе, термодинамички стабилни.

Комплекси који настају у реакцији Met-His и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса приказани су на слици 20. У киселој средини, формира се кинетички фаворизован $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Met-His-N},\text{S})]^{2+}$ хелатни комплекс. При pH = 9,6 долази до споре конверзије $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Met-His-N},\text{S})]^{2+}$ комплекса у $[\text{Pt}(\text{en})(\text{Met-His-N},\text{N}')]^{+}$, који након раскидања једне Pt-N(en) везе прелази у $[(\text{Pt}(\text{en-N})(\text{Met-His-N},\text{N}',\text{N3}))]^{+}$ комплекс (N је атом азота терминалне амино групе, N' атом азота из пептидне везе и N3 атом азота из имидазоловог прстена аминокиселине хистидина; види Сliku 20).

Када се дипептид His-Met и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ помешају у 2 : 1 молском односу долази до споре реакције $[\text{Pt}(\text{en})(\text{His-Met-NI},\text{S})]^{2+}$ макрохелата (Слика 19, комплекс **2**) са другим $[\text{Pt}(\text{en})]^{2+}$ фрагментом, при чему настаје $[\{\text{Pt}(\text{en})\}_2(\text{His-Met-N},\text{N3})(\text{His-Met-NI},\text{S})]^{3+}$ комплекс. У аналогној реакцији са Met-His дипептидом такође, настаје динуклеарни $[\{\text{Pt}(\text{en})\}_2(\text{Met-His-N},\text{S})(\text{Met-His-N},\text{N3})]^{3+}$ комплекс.



Слика 20. Структурне формуле комплекса који настају у реакцији $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ са Met-His пептидом

Резултати HPLC испитивања реакција $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса и дипептида His-Met и Met-His указују да је конверзија кинетички фаворизованог комплекса који садржи координовани атом сумпора у термодинамички стабилнији комплекс са координованим атомом азота имидазола веома спора, и да зависи од положаја His и Met остатка у пептиду.

У реакцији $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са три-, тетра- и пентапептидима His-Gly-Met, MeCOHis-Gly-Gly-Met и MeCOHis-Ala-Ala-Ala-Met, одмах након мешања, долази до формирања кинетички фаворизованог комплекса код кога је атом сумпора из метионина координован за Pt(II) јон [90]. У киселој средини, након монодентатног координовања пептида, Pt(II) депротонује пептидни азот при чему настаје кинетички фаворизован $[\text{Pt}(\text{en})(\text{peptid-}N,S)]^+$ комплекс. Међутим, у базној средини, упоредо са формирањем $[\text{Pt}(\text{en})(\text{peptid-}N,S)]^+$ комплексне врсте, настају макрохелатни $[\text{Pt}(\text{en})(\text{peptid-}N1,S)]^{2+}$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{peptid-}N3,S)]^{2+}$ комплекси са координованим атомом азота из имидазоловог прстена. За краће пептиде (His-Gly-Met) карактеристична је N1,S координација, док у случају тетра- и пентапептида макрохелатни комплекси, $[\text{Pt}(\text{en})(\text{peptid-}N1,S)]^{2+}$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{peptid-}N3,S)]^{2+}$, настају у приближно истом односу у рН области 2,7 - 10,8. Истовремена N1/N3 координација постоји само у случају макрохелата који се формирају у реакцији пептида са две или више аминокиселине између хистидина и метионина.

Формирање макрохелатних комплекса зависи од брзине изомеризације $[\text{Pt}(\text{en})(\text{peptid-}N,S)]^+$ комплекса у термодинамички стабилније $[\text{Pt}(\text{en})(\text{peptid-}N1,S)]^{2+}$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{peptid-}N3,S)]^{2+}$ макрохелатне комплексе. Нађено је да у рН области 2,7 - 5,5, на 40 °C након 28 дана, у раствору постоје само макрохелатне врсте. Брзина ове реакције зависи од положаја хистидинског и метионинског остатка у пептидном ланцу. Формирање макрохелата је брже када се између метионина и хистидина налазе четири аминокиселинска остатка, у односу на пептиде код којих се између Met и His остатка налазе три аминокиселине [90].

С обзиром на чињеницу да се у *in vivo* условима након третмана са цисплатином преко 50% овог комплекса излучи из организма након неколико дана, формирање N1,S, као и N3,S, макрохелата са олигопептидима (или протеинима) не може се занемарити када се говори о реакционом путу антиканцерогених комплекса платине(II) [91].

За селективну хидролизу MeCOVal-Lys-Gly-Gly-His-Ala-Lys-Tyr-Gly-Gly-

Met-Ala-Ala-Arg-Ala пептида коришћени су $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ комплекси. Нађено је да Pt(II) комплекс селективно хидролизује само Met-Ala пептидну везу, док $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ комплекс хидролизује обе Gly-Gly пептидне везе у пептиду. Када се у реакциону смешу пептида и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ дода еквивалентна количина Pd(II) комплекса хидролизује Met-Ala (катализатор Pt(II) комплекс) и Gly-Gly пептидна веза у -Gly-Gly-His- фрагменту за чију је хидролизу одговоран Pd(II) [24].

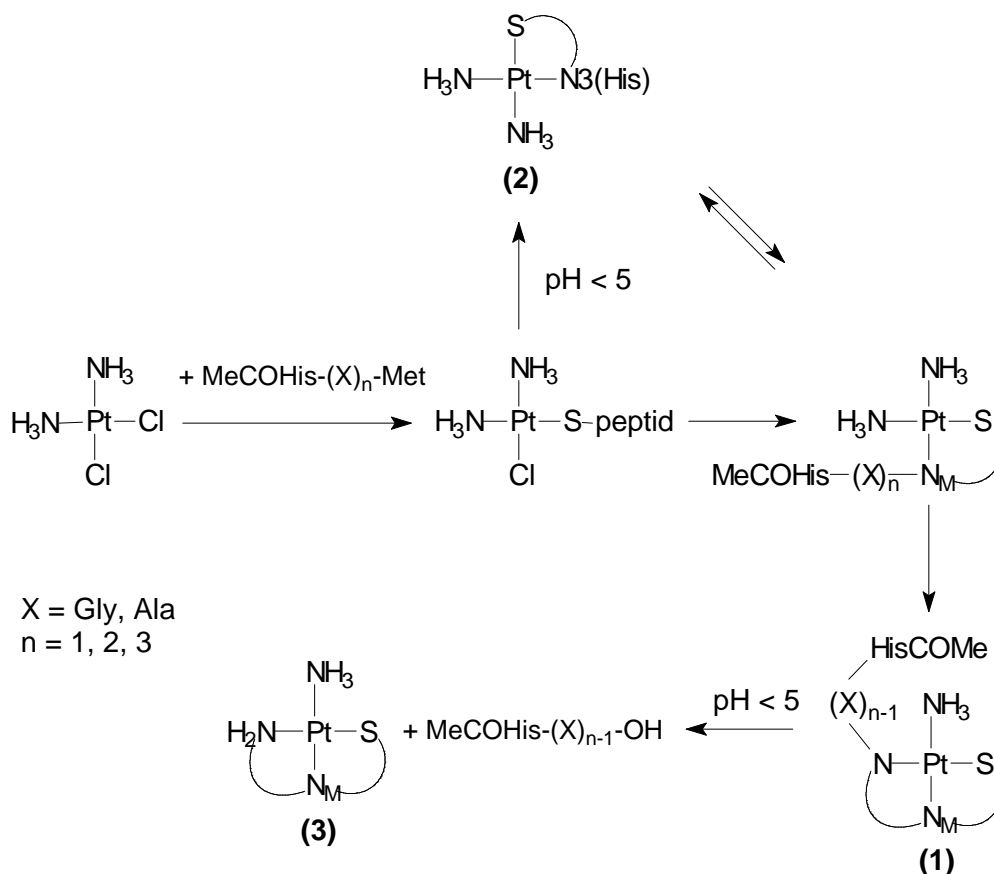
Реакције са *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ комплексом

Реакције *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ комплекса са MeCOMet-His, MeCOHis-Gly-Met, MeCOHis-Ala-Ala-Ala-Met, MeCOMet-Gly-His-Gly-Gly, MeCOMet-Gly-Gly-His-Gly и MeCOGly-Met-Gly-His-Gly пептидима испитиване су у pH области од 2,5 до 11,0 на 40 °C [62,63,67]. У свим реакцијама нађено је да, након монодентатног координовања пептида преко атома сумпора метионинског остатка, долази до брзе интрамолекуларске супституције другог хлоридо лиганда из комплекса платине(II) и формирања релативно стабилног $[\text{Pt}(\text{peptid-}N,S)(\text{NH}_3)_2]^+$ комплекса, са координованим депротонованим атомом азота X-Met пептидне везе.

У реакцији цисплатине и MeCOMet-His, при pH < 7,0, кинетички фаворизован $[\text{Pt}(\text{MeCOMet-His-}N,S)(\text{NH}_3)_2]^+$ комплекс прелази у термодинамички стабилније $[\text{Pt}(\text{MeCOMet-His-}NI,S)(\text{NH}_3)_2]^{2+}$, $[\text{Pt}(\text{MeCOMet-His-}N3,S)(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ и $[\text{Pt}(\text{MeCOMet-His-}N,N3,S)(\text{NH}_3)]^+$ комплексе. Нађено је да долази до селективне хидролизе Met-His пептидне везе, и у раствору је применом ^1H NMR спектроскопије нађено да постоји слободан *N*-ацетилвани метионин (MeCOMet), као и *cis*- $[\text{Pt}(\text{His-}N,N3)\text{Cl}(\text{NH}_3)]^+$ комплекс. У базној средини (pH > 7,0) не долази до хидролизе пептида и главни производ реакције је макрохелатни $[\text{Pt}(\text{MeCOMet-His-}NI,S)(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ комплекс [63].

Нађено је да у реакцијама *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ са MeCOHis-Gly-Met и MeCOHis-Ala-Ala-Ala-Met при pH < 5,0 (Слика 21) долази до хидролизе друге пептидне везе у односу на координовани бочни ланац метионина [62]. Производи хидролитичког раскидања His-Gly (MeCOHis и $[\text{Pt}(\text{Gly-Met-}N,N',S)(\text{NH}_3)]^+$) и Ala-Ala пептидних веза (MeCOHis-Ala-Ala и $[\text{Pt}(\text{Ala-Met-}N,N',S)(\text{NH}_3)]^+$) раздвојени су помоћу HPLC хроматографије, а применом NMR спектроскопије и MS спектрометрије извршена је њихова карактеризација. Нађено је да је комплекс (1) са тридентатно координованим MeCOHis-Gly-Met и MeCOHis-Ala-Ala-Ala-Met пептидима (N,N',S-координација, где

су N и N' атоми азота пептидних веза) мање стабилна интермедијерна врста у киселој средини. При овим условима у раствору постоји и макрохелатни $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{peptid-N3,S})]^{2+}$ комплекс (2). Међутим, при $\text{pH} < 3,4$ у реакцији цисплатине са $\text{MeCOHis-Ala-Ala-Ala-Met}$ пептидом не долази до координовања атома азота



Слика 21. Шема хидролитичких реакција пептида типа $\text{MeCOHis-(X)}_n\text{-Met}$ са *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] комплексом

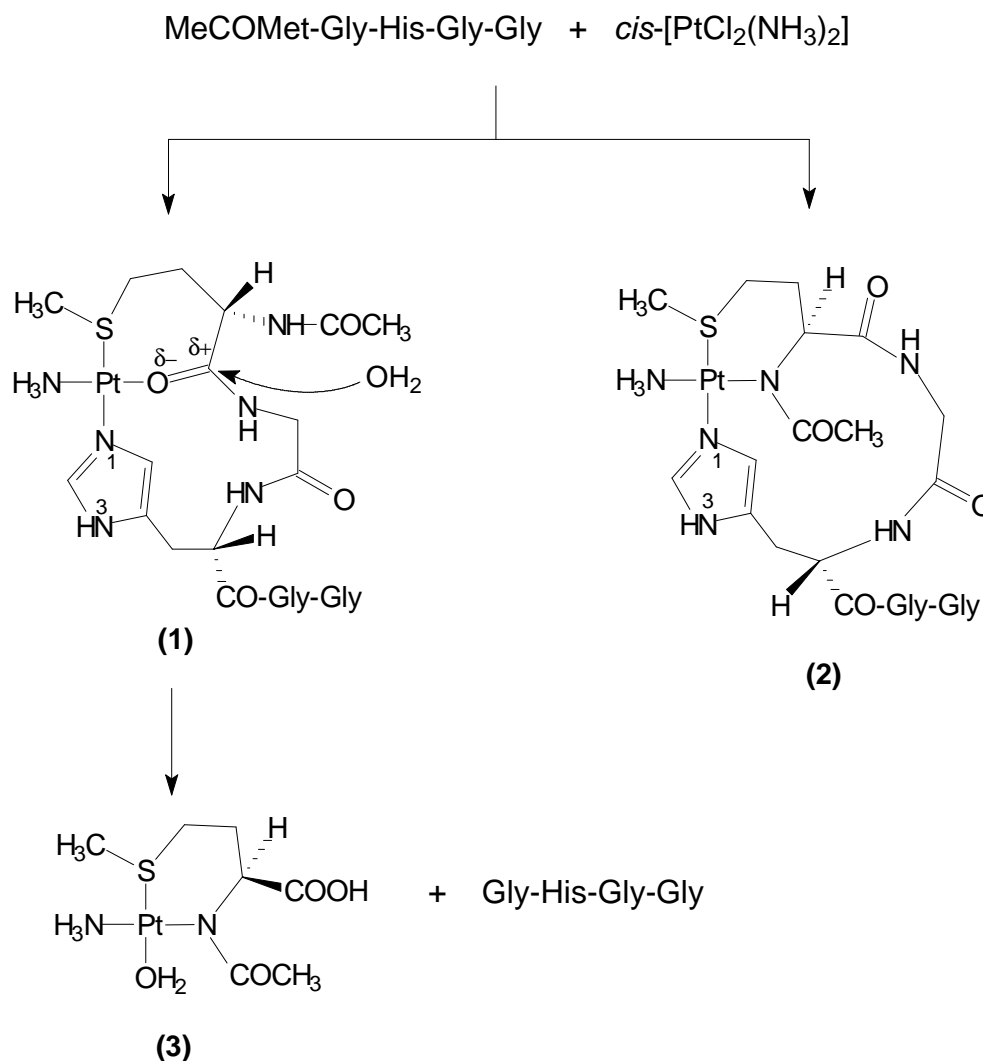
имидазола за Pt(II). Стабилни комплекси са тридентатно координованим MeCOHis-Gly-Met и MeCOHis-Ala-Ala-Ala-Met пептидима настају у неутралној и слабо базној средини. Претходна испитивања су показала да у реакцијама $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са MeCOHis-Gly-Met, као главни производи настају макрохелатни комплекси са N1,S и N3,S координацијом [89,90]. Макрохелатни комплекси са N1,S координацијом настају и у реакцијама $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са MeCOHis-Gly-Gly-Met и MeCOHis-Ala-Ala-Ala-Met [90], док у аналогним реакцијама пептида са *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] комплексом, у јако киселој средини, формирање ове комплексне врсте није потврђено помоћу HPLC хроматографије и ¹H NMR спектроскопије. Може

се закључити да реакциони пут који укључује брзу супституцију NH_3 лиганда, који се налази у *trans*-положају у односу на координовани атом сумпора метионина, има важну улогу у начину координовања пептида за Pt(II) , као и у хидролизи пептидне везе.

Комплекс *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ катализује хидролизу *Met-Gly* пептидне везе у *MeCOMet-Gly-His-Gly-Gly*, *MeCOMet-Gly-Gly-His-Gly* и *MeCOGly-Met-Gly-His-Gly* пептидима када се реакције изводе у слабо киселој средини ($\text{pH} \leq 5$) [67]. На слици 22 приказани су производи који настају у реакцији *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ са *MeCOMet-Gly-His-Gly-Gly*. Хидролиза *Met-Gly* пептидне везе одвија се преко каталитички активног интермедијерног Pt(II) -пептид комплекса (**1**), код кога је пентапептид, преко атома сумпора, N1 атома азота имидазола и карбонилног кисеоника *Met-Gly* пептидне везе, координован за платину(II) (Слика 22, комплекс **1**).

На основу аналитичке HPLC хроматографије нађено је да се у раствору током времена повећава концентрација производа хидролизе, слободних тетрапептида *Gly-His-Gly-Gly* и *Gly-Gly-His-Gly*, односно трипептида *Gly-His-Gly*. Поред тога, долази до повећања концентрација $[\text{Pt}(\text{MeCOMet-}i>S,N)(H_2O)(NH_3)]⁺ (**3**) и $[\text{Pt}(\text{MeCOGly-Met-}i>S,N)(NH_3)₂]⁺ комплекса. У малој концентрацији, у свим испитиваним реакцијама, настаје и макрохелатни $[\text{Pt}(\text{peptid-}i>S,N,N1)(NH_3)]⁺ комплекс (**2**) (Слика 22).$$$

Поред хидролизе пептидне везе која садржи карбоксилну групу координоване аминокиселине L-метионина, *Met-Gly* пептидна веза, у реакцији *MeCOGly-Met-Gly-His-Gly* пентапептида и *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ комплекса долази и до хидролизе *MeCO-Gly* пептидне везе. Након хидролизе *MeCO-Gly* пептидне везе формира се $[\text{Pt}(\text{Gly-Met-Gly-His-Gly-}i>N,N',S)(NH_3)]⁺ комплекс са *Gly-Met-Gly-His-Gly* остатком координованим за Pt(II) јон. Међутим, у реакцији *MeCO-Gly-Gly-Met-Gly-Gly* пентапептида и цисплатине, при идентичним експерименталним условима, не долази до хидролизе *Met-Gly* пептидне везе [67]. На основу тога може се закључити да брза супституција NH_3 лиганда, који се налази у *trans*-положају у односу на координовани атом сумпора метионинског остатка, са N1 атомом азота имидазоловог прстена из хистидина, потпомаже хидролитичко раскидање *Met-Gly* пептидне везе. У пептидима који садрже *X-Y-Met-(Z)_n-His* секвенцу ($n = 1, 2$; *Z* = аминокиселина са бочним низом који не садржи хетероатом погодан за координовање за Pt(II) јон), при $\text{pH} \leq 5$, цисплатина истовремено хидролизује *X-Y*, као и *Met-Z*, пептидну везу.$



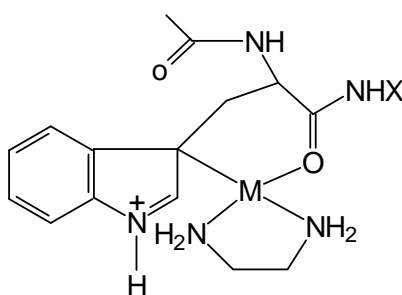
Слика 22. Структурне формуле производа хидролизе који настају у реакцији *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] са MeCOMet-Gly-His-Gly-Gly пептидом

У неутралној и слабо базној средини (рН < 8,6) цисплатина не катализује хидролизу пептида и у раствору је доминантан стабилни макрохелатни Pt(II)-пептид комплекс (2) (Слика 22).

Хидролиза пептида који садрже аминокиселину L-триптофан помоћу комплекса паладијума(II) и платине(II)

Координовање јона прелазних метала за индолов прстен аминокиселине триптофана није познато у биолошким системима. Међутим, у реакцији дипептида MeCOTrp-X (где је X = Ala, Val или ValOMe) са Pd(II) и Pt(II) комплексима, који садрже координован ацетон, нађено је да се индолов γ -C атом (C3) координује за наведене јоне метала [28]. Претпоставка је да се координовани ацетон у овим

комплексима лакше супституише са С3 атомом угљеника из индола у односу на аква лиганд. Волуминознија С-терминална аминокиселина успорава реакцију координовања триптофана за јон метала. До координовања индоловог С3 атома долази само онда када је на располагању и неки хетероатом, тако да се пептид може бидентатно координовати за јон метала. У реакцији MeCOTrp-X пептида и Pd(II) комплекса друго место координовања је кисеоников атом из карбонилне групе (Слика 23). Бидентатно координовани јон метала селективно хидролизује само Trp-X пептидну везу. У ацетону који садржи HClO₄ у концентрацији од 1,0·10⁻³ М хидролиза пептидне везе је комплетно завршена за мање од 24 сата на 50 °С.



M је Pd(II) или Pt(II)

Слика 23. Начин координовања Pd(II) или Pt(II) комплекса за MeCOTrp-X пептиде

Међутим, у воденим растворима нема координовања С3 атома индола за потенцијално активне комплексе платине(II) и паладијума(II), а самим тим нема ни хидролизе пептидне везе. Катализатори који садрже тридентатне лиганде нису активни, јер се не могу бидентатно координовати за пептид. Иако паладијум(II) комплекси имају много већи афинитет за координовање хистидина и метионина у односу на триптофан, ове хидролитичке реакције отварају нове могућности у биоаналитичкој пракси. Испитивање утицаја растварача на хидролизу пептидне везе са пептидима који садрже хистидин, метионин или триптофан су показала да у воденим растворима, с обзиром на велики афинитет Pd(II) и Pt(II) јона за сумпор и азот донорске атоме, доминантно је раскидање пептидних веза у околини хистидина или метионина. Насупрот овоме, у органским растварачима одвија се хидролиза пептидне везе у околини триптофана. Примена неводених растварача отвара ново поље примене комплекса платине(II) и паладијума(II) за хидролизу хидрофобних пептида и протеина.

1.2 ХИДРОЛИЗА ПРОТЕИНА ПОМОЋУ КОМПЛЕКСА ПРЕЛАЗНИХ МЕТАЛА

Главни разлог примене синтетичких протеаза које садрже паладијум(II) јон је потреба за региоселективном хидролизом протеина. Да би се синтетички катализатори могли примењивати у ову сврху неходно је да буду погодни за примену у биоаналитичкој пракси. Ранији резултати испитивања хидролитичких реакција хистидин, метионин и триптофан везивних пептида са паладијум(II) комплексима су потврдили да ови комплекси могу имати и практичну примену. Као што је претходно наведено, комплекси Pd(II) региоселективно раскидају пептидне везе у близини координованих бочних низова, обично хистидина и метионина. Ове две аминокиселине налазе се у протеинима у просеку око 5,5 %, тако да се велики фрагменти могу секвенционисати и припремити за друге биохемијске трансформације. Уклањањем паладијума(II) из реакционе смеше добијени фрагменти протеина могу се користити даље без накнадне обраде. Пошто је раскидање пептидне везе хидролитички процес (није редокс реакција), амино и карбоксилне групе у фрагментима могу се рекомбиновати на различите начине и градити нове пептидне везе.

Утицај конформације на региоселективну хидролизу пептидних веза испитиван је на сегменту протеина миохемеритрина [92]. Секвенца сегмента миохемеритрина је MeCOE-V-V-P-H-K-K-Nle-H-K-D-F-L-E-K-I-G-G-L-NH₂. Овај полипептид у воденом раствору, при рН 2,0 на 40 °С, има конформацију слободне спирале, док се на 22 °С у 50% воденом раствору трифлуороетанола (TFE) пептид налази претежно у α -хеликсу. Било да се пептид налази у α -хеликсоидној, или слободној спиралној конформацији [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ катализатор се координује за оба, His5 и His9, остатка. Конформација слободне спирале нема ефекат на брзину координовања Pd(II) катализатора за His5 и His9 остатке, али α -хеликсоидна конформација смањује брзину интеракције полипептида и катализатора, што је и очекивано за квадратно-планарне комплексе паладијума(II) [93]. Катализатор селективно хидролизује пептидну везу у обе конформације, при чему само веза између V3-P4, односно друга пептидна веза лево од His5, подлеже хидролитичким реакцијама.

Резултати испитивања су показали да је хидролиза знатно бржа када је пептид у слободној конформацији ($k_{\text{obsd}} = 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$) у односу на α -хеликсоидну ($k_{\text{obsd}} =$

$5,0 \cdot 10^{-6} \text{ min}^{-1}$). Смањење константе брзине хидролизе пептидне везе за око 30 пута је вероватно последица промене конформације полипептида, односно одвијања α -хеликса или високе температуре. На основу података који су добијени хидролизом трипептида MeCOGly-Gly-His разјашњена је ова недоумица. Хидролиза MeCOGly-Gly-His у присуству Pd(II) катализатора испитивана је на 22 и 40 °C у одсуству TFE, а такође и на 40 °C у присуству 50% TFE. Присуство TFE нема ефекта на конформацију овог кратког пептида, а утицај температуре и TFE на вредност константе брзине хидролизе пептидне везе могу се посебно разматрати. Нађено је да се у оба случаја раскида само друга пептидна веза лево од хистидина, односно Gly-Gly пептидна веза, и да се вредности константи брзина ових реакција могу поредити. Вредност константе брзине хидролизе трипептида на 40 °C не зависи од присуства TFE. Вредност константе брзине хидролизе пептидне везе на 22 °C за трипептид који има насумице увијену конформацију може се поредити са константом хидролизе полипептида који има делимично α -хеликсоидну конформацију. На основу ових испитивања закључено је да конформација супстрата не утиче на вредност константе брзине и селективност хидролизе одређених пептида. Ако даља изучавања покажу сличне резултате са другим пептидима и протеинима онда се паладијум(II) комплекси у будућности могу користити као маркери протеина.

Први протеин код кога је селективно раскинута пептидна веза уз каталитичко дејство комплекса паладијума(II) је цитохром c изолован из срца коња. Молекулска маса овог протеина је 12,4 kDa и садржи 104 аминокиселине, а његова терцијарна структура је позната. У структури овај пептид садржи пет места за која се могу координовати паладијум(II) комплекси, од којих три места припадају хистидинском, а два метионинском бочном остатку. Пептидна веза у цитохрому c је селективно раскинута у киселој средини на 40 °C помоћу Pd(II) комплекса [94]. Различити паладијум(II) комплекси при различитим рН вредностима дају производе хидролизе са молекулским масама од приближно 10 kDa. Резултати испитивања показују да у одсуству Pd(II) комплекса цитохром c не хидролизује ни након продуженог времена инкубације. Експериментално је потврђено да у случају када се у смешу цитохрома c и Pd(II) комплекса дода пептид глутатион, због координације додатог пептида за Pd(II) јон, не долази до хидролизе протеина. Такође, хидролиза је инхибирана и присуством киселина, као што је HCl. Сви ови додатни експерименти су потврдили да би дошло до хидролизе неходно је да се Pd(II) јон координује за протеин.

Испитивања хидролизе протеина са различитим комплексима паладијума(II) су показала да је углавном 60% протеина хидролизовало. Међутим, ако се као катализатор употреби $[Pd(dtcO-OH)(H_2O)_2]^{2+}$ помешан са протеином у молском односу 1 : 10 на 40 °C и рН око 1,7, нађено је да након 2 дана трајања реакције хидролизује 80% протеина. Помоћу Едманове деградационе методе одређено је место раскидања протеина, а резултати показују да је само пептидна веза између His18-Thr19 раскинута. На основу тога закључено је да место координовања Pd(II) може бити His18 или Cys17.

Да би се довела у везу хидролиза протеина са секвенцом аминокиселина, третирани су различити супстрати мање молекулске масе чија секвенца аминокиселина се подудара са редоследом аминокиселина у делу цитохрома с са комплексима паладијума(II). Хем-везивни фрагмент цитохрома с од 11 до 21 аминокиселине, познат као микропероксидаза-11, хидролизује у присуству комплекса паладијума(II) на истом месту као и цитохром с (тј. између His18 и Thr19). Нађено је да при овим реакцијама настаје хем слободни апоцитохром с. На основу ових испитивања закључено је да место раскидања није повезано са хемском групом већ се налази у протеинском делу протеина.

Место координовања Pd(II) јона за цитохром с утврђено је на основу упоредних експеримената са различитим трипептидима. Тако, пептид MeCOMeCys-His-Ala у присуству Pd(II) катализатора се раскида искључиво између His и Ala, што значи да се хидролиза одвија на потпуно истом месту као у цитохрому с. Пептид MeCOMeCys-Ala-Gly, који не садржи аминокиселину хистидин, хидролизује искључиво између MeCys и Ala, а утврђено је да не долази до хидролизе других пептидних веза. На основу ових испитивања закључено је да се Pd(II) координује за цитохром с искључиво преко His18, а не преко Cys17. Нађено је да у рН области од 3,0 до 5,0 не долази до хидролизе цитохрома с што је последица његове конформације [95]. Добијени резултати су показали да је рКа вредност преласка природног стања цитохрома с III у делимично отворено стање II око 2,5. У стању II шупљина хема је отворена и оба аксијална лиганда на атому гвожђа (His18 и Met80) су замењени са молекулима воде. У оваквом стању His18 је протонан. Из овога се може закључити да хидролизује само она пептидна веза која је изложена дејству растварача, чак и онда ако је цитохром с у делимично отвореном стању. Нађено је да је кисела средина потребна за отварање протеина, а не за саму реакцију хидролизе.

Недвосмислено, добијени резултати су потврдили да до хидролизе протеина долази под дејством комплекса паладијума(II), а не услед присуства H_3O^+ јона.

Истраживања су показала да са повећањем броја молова паладијума(II) у односу на протеин, као и са побољшањем електрофоретске резолуције, цитохром *c* се раскида на још неколико места. Међутим, закључено је да је хидролиза и у овом случају била региоселективна, односно дешава се искључиво у близини Met и His остатка, при чему хидролизује друга пептидна веза лево, или прва пептидна веза десно, од места координовања катализатора за протеин [88]. На основу свих напред изнетих резултата очигледно је да се хидролиза дешава, како у кратким пептидима, тако и у протеинима.

Ефикаснија селективна хидролиза цитохрома *c* постигнута је применом $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса. Након 24 сата на $40\text{ }^\circ\text{C}$ и pH 2,5, применом аналитичке HPLC хроматографије и Едманове деградационе методе одређено је место цепања протеина, а резултати показују да долази до хидролизе само Met-X пептидне везе. Детектована су три фрагмента који настају услед хидролитичког раскидања Met65-Glu66 и Met80-Ile81 пептидних веза у цитохрому *c*. Пептидна Met-Pro веза не хидролизује у присуству протеолитичких ензима, док у присуству $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса долази до њене хидролизе. Такође, нађено је да $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекс селективно хидролизује протеин бовин β -казеин [25].

Испитиван је утицај ултраљубичастих и микроталаса на хидролизу цитохрома *c* у присуству $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса. Када се реакциона смеша изложи дејству ултраљубичастих таласа од 300 nm, нађено је да се константа брзине хидролизе Met-X (X је аминокиселина која не садржи хетероатом у бочном низу) пептидне везе удвостручи, али да при томе долази и до споредних реакција. Међутим, употребом микроталаса хидролиза је бржа 2-3 пута на $60\text{ }^\circ\text{C}$, односно 7 пута на $100\text{ }^\circ\text{C}$, при чему не долази до споредних реакција. Утицај температуре на брзину хидролизе пептидне везе у присуству Pt(II) и Pd(II) комплекса је добро познат, док је утицај микроталаса на ове реакције још увек недовољно испитан. Хидролиза пептида и протеина под утицајем микроталаса у присуству Pt(II) комплекса је метода која ће вероватно наћи своје место у синтези и модификовању протеина, као и у биотехнологији [96].

Протеин миоглобин изолован из срчаног мишића коња има молекулску масу око 17,6 kDa. Око 80% протеина има α -хеликсоидну структуру, а у структури нису

присутне ковалентне везе. Његова структура се доста разликује у односу на структуру протеина цитохрома с. Од свих комплекса који су коришћени за испитивање реакција хидролизе миоглобина најбоље резултате је показао $[\text{Pd}(\text{dtco-ON})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекс [97]. Након 24 сата инкубације на 60 °С и у рН области од 6,2 до 3,2 количина хидролизованог пептида се креће од 39% до 85%. Резултати показују да денатурација протеина не утиче на брзину хидролизе и да брзина хидролизе, као и место раскидања везе, једино зависе од места координовања паладијум(II) комплекса за протеин и од његове околине. Неспецифично кидање протеина се дешава при $\text{pH} < 3,2$, а није присутно на $\text{pH} \geq 4,1$. Хидролиза миоглобина вршена је у благо киселој средини, која се на неки начин може поредити са биохемијским условима.

Применом сепарационе SDS-PAGE електрофорезе раздвојени су фрагменти који су били на *N*-терминалном крају и одређене су њихове молекулске масе. Добијени резултати показују да је протеин раскинут на 13 места. Многа места раскидања су очекивана јер се налазе у близини метионског и хистидинског остатка. У свим случајевима хидролизује веза која је лево, или десно, од места координовања катализатора за протеин. Поред тога, нађено је да долази до хидролизе неких пептидних веза у близини лизинског и аргининског остатка. Координовање паладијума(II) за бочни низ лизина је неочекивано и одвија се на другачији начин, док је координовање Pt(II) за Arg остатак са екстремно ниском базношћу веома ретко [98,99]. Упркос чињеници да механизам хидролизе миоглобина није потпуно разјашњен, добијени резултати испитивања су показали висок ниво селективности. Само 13, од укупно 152 пептидне везе, је раскинуто и њихово раскидање је селективно.

Када се миоглобин и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекс помешају у 1 : 5 молском односу, на 60 °С и рН 2,5, хидролизују само две пептидне везе, које садрже карбоксилну групу Met55 и Met131 [24].

Комплекси паладијума(II), $\text{trans-}[\text{Pd}(\text{py})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, $[\text{Pd}(\text{dach})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pd}(\text{dtco-3-ON})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (где је py = пиридин, en = етилендиамин, dach = 1,4-диазоциклохептан и dtco-3-ОН = 1,5-дитиоциклооктан-3-ол) су испитивани као катализатори за хидролизу протеина, бовин серум албумина, серум албумина изолованог из крви свиње и албумина изолованог из кокошијег јајета. Комплекси и протеини су мешани у молском односу 8 : 1 или 16 : 1 на рН =

4,6, а затим су реакционе смеше инкубиране на 60 °C два дана, или на 50 °C шест дана. Осим $[\text{Pd}(\text{dtco-3-OH})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса који је показао каталитичку инертност, преостала три Pd(II) комплекса селективно хидролизују X-Ser или X-Thr пептидне везе, као и пептидне везе у близини His и Met остатка. У бовин албумину долази до хидролизе Glu57-Ser58, Gly85-Asp86, Leu103-Ser104 и Lys285-Ser286 пептидних веза, албумин изолован из крви свиње хидролизовао је само на једном месту (Lys285-Ser286), док албумин изолован из јајета кокошке хидролизује на четири места (Ala6-Ser7, Ala220-Ser221, Gly237-Thr238 и Met239-Ser240) [27].

2. ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА

У оквиру ове докторске дисертације предвиђено је да се применом спектроскопских и потенциометријских метода, при различитим експерименталним условима, испитају реакције пептида који садрже аминокиселине L-метионин и L-хистидин са комплексима паладијума(II) и платине(II).

У првом делу рада предвиђено је да се применом ^1H NMR спектроскопије, у рН области од 2,0 до 2,5 и на температури од 25 и 60 °C, испитају реакције $[\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса (L је бидентатно координован 2,2'-дипиридиламин, dpa; 2-пиколиламин, pic; етилендиамин, en) са пептидима L-метионил-глицином (Met-Gly), L-хистидил-глицином (His-Gly) и N-ацетилованим пептидима L-метионил-глицил-глицином (MeCOMet-Gly-Gly), глицил-L-метионил-глицином (MeCOGly-Met-Gly) и L-метионил-глицил-L-хистидил-глицинамидом (MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂). Затим да се, при претходно наведеним експерименталним условима, испитају реакције $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса (dpa је бидентатно координован 2,2'-дипиридиламин) са дипептидима који садрже ацетиловану терминалну амино групу, као што су N-ацетиловани L-метионил-глицин, MeCOMet-Gly и N-ацетиловани L-хистидил-глицин, MeCOHis-Gly. У оквиру ових истраживања предвиђено је да се испита утицај бочног низа пептида (L-метионин и L-хистидин) на механизам и селективност раскидања пептидне везе у наведеним пептидима.

Поред тога, задатак рада је био да се применом потенциометријских мерења и ^1H NMR спектроскопије испитају реакције тетрапептида MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ са $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексима. Предвиђено је да се у првој фази ових испитивања, методом потенциометријских титрација, одреде услови

координације MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ тетрапептида за Pt(II) и Pd(II) комплексе, а затим да се испита механизам каталитичког деловања Pt(II) и Pd(II) комплекса на хиролизу пептидне везе у овом тетрапептиду.

Такође, као задатак ове дисертације предвиђено је да се применом ¹H NMR спектроскопије, при рН = 7,4 и на температури од 37 °С, испитају реакције [Pt(Gly-Gly-*N,N',O*)I]⁻ комплекса (Gly-Gly је тридентатно координован дипептид глицил-глицин) са *N*-ацетилованим L-метионил-L-хистидином (MeCOMet-His), као и реакције хидролизе *N*-ацетилованог L-метионил-глицина (MeCOMet-Gly) у присуству различитих [Pt(L)Cl₂] и [Pt(L)(CBDSA-*O,O'*)] комплекса (L је етилендиамин, en; (±)-*trans*-1,2-диаминоциклохексан, dach; (±)-1,2-пропилендиамин, 1,2-pp; CBDSA је анјон 1,1-циклобутандикарбоксилне киселине). На крају, добијене резултате ових испитивања довести у везу са механизмом токсичног деловања антитуморских комплекса платине.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1 Хемикалије и реагенси

Хемикалије и реагенси D_2O , DNO_3 , $NaOD$, $(CD_3)_2SO$, етилендиамин (en), 2-пиколиламин (pic), 2,2'-дипиридиламин (dpa), (\pm)-1,2-пропилендиамин (1,2-pn), (\pm)-*trans*-1,2-диаминоциклохексан (dach), диетилентриамин (dien), анјон 1,1-циклобутандикарбоксилне киселине (CBDCA), $K_2[PdCl_4]$, $K_2[PtCl_4]$, пептиди L-метионил-глицин (Met-Gly), L-хистидил-глицин (His-Gly), глицил-глицин (Gly-Gly), L-метионил-L-хистидин (Met-His), L-метионил-глицил-глицин (Met-Gly-Gly), глицил-L-метионил-глицин (Gly-Met-Gly) и S-метилглутатион су набављени од Sigma-Aldrich Chemical Co. Тетрапептид N-ацетилувани L-метионил-глицил-L-хистидил-глицинамид (MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂) је синтетизован помоћу Fmoc-chemistry методе [100,101]. Синтетизовани пептид је пречишћен коришћењем семипрепаративне RP-HPLC хроматографије. Чистоћа му је проверена помоћу аналитичке HPLC хроматографије и електроспреј јонизационе масене спектрометрије. Остале хемикалије употребљене у овом раду биле су комерцијални производи аналитичког степена чистоће и купљене су од домаћег произвођача. За припремање раствора наведених реагенаса употребљена је бидестилована вода.

3.2 Ацетиловање терминалне аминок групе у пептидима

За ацетиловање терминалне аминок групе у пептидима L-хистидил-глицину, L-метионил-глицину, L-метионил-L-хистидину, L-метионил-глицил-глицину и глицил-L-метионил-глицину употребљена је метода која је раније описана у литератури [53,68].

У што мањој запремини глацијалне сирћетне киселине растворити $5,0 \cdot 10^{-4}$ мола пептида и у овај раствор додати $7,5 \cdot 10^{-4}$ мола (70,9 μ l) анхидрида сирћетне киселине. Раствор се меша на собној температури за време од три сата, а затим остави да испари до сува. У већини случајева добија се уљаста супстанца која представља ацетиловани пептид. Чист ацетиловани пептид може се добити прекристалисавањем из смеше вода-ацетон, или неког другог органског растварача. Ацетиловани пептид у кристалном облику може се добити и растварањем уљастиг остатка у води, а затим испаравањем раствора на собној температури до сува. По потреби овај поступак се може поновити више пута. Чистоћа ацетилованог пептида проверена је помоћу ^1H NMR спектроскопије.

3.3 Добијање $[\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}_2]$ комплекса

Комплекси паладијума(II) типа $[\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}_2]$ (где је L бидентатно координовани en, pic или dra диамински лиганд) синтетизовани су по модификованом поступку који је раније описан у литератури [102-104].

У 10 cm^3 воде растворити 0,1632 g ($5,0 \cdot 10^{-4}$ мола) $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ и додати еквимоларну количину одговарајућег лиганда L. Добијени раствор закиселити (pH = 3,0) додавањем раствора HCl концентрације 1,0 mol/dm^3 . Реакциону смешу загревати на 80 $^\circ\text{C}$ за време од 2 сата. Сви комплекси кристалишу из воденог раствора на собној температури. Издвојене кристале комплекса одвојити цеђењем, испрати са мало хладне воде, а затим етанолом и сушити на ваздуху. Чисти комплекси добијени су прекристализацијом из мале количине топле воде и хлађењем.

Експериментални резултати микроанализе за C, H и N параметре за све $[\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}_2]$ комплексе у сагласности су са теоријски израчунатим вредностима.

Израчунато за $[\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}_2] = \text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pd}$ (Mr = 237,39): C, 10,12; H, 3,40; N, 11,79. Нађено: C, 10,08; H, 3,33; N, 11,63 %.

Израчунато за $[\text{Pd}(\text{pic})\text{Cl}_2] = \text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pd}$ (Mr = 285,47): C, 25,24; H, 2,82; N, 9,81. Нађено: C, 25,18; H, 2,77; N, 9,69 %.

Израчунато за $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2] = \text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{Cl}_2\text{Pd}$ ($M_r = 348,52$): C, 34,46; H, 2,60; N, 12,06. Нађено: C, 34,35; H, 2,70; N, 12,02 %.

3.4 Добијање $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса

Паладијум(II) комплекси опште формуле $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (где је L бидентатно координовани en, pic или dra диамински лиганд) добијени су мешањем одговарајућих хлоридо-комплекса са AgNO_3 у молском односу 1:1,95 у одговарајућој запремини воде, на начин који је раније описан у литератури [55]. Суд са реакционом смешом ($\text{pH} = 2,0$) увити у алуминијумску фолију и оставити преко ноћи уз мешање на собној температури. Издвојени талог AgCl одвојити цеђењем, а свеже припремљен $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекс користити за експерименте. Овако добијене растворе аква-комплекса чувати у фрижидеру на $+4^\circ\text{C}$. Помоћу ^1H NMR спектроскопије повремено проверити њихову чистоћу и у случају одговарајуће промене у боји, или разградње полазних комплекса, припремити свеж раствор $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса.

3.5 Добијање $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ комплекса

Платина(II) комплекси типа $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ (где је L бидентатно координовани en, 1,2-pp или dash диамински лиганд) синтетизовани су по модификованом поступку који је раније описан у литератури [102-104].

У 10 cm^3 воде растворити $0,2076\text{ g}$ ($5,0 \cdot 10^{-4}\text{ mola}$) $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ и додати еквимоларну количину одговарајућег диаминског лиганда L. Добијени раствор закиселити ($\text{pH} = 3,0$) додавањем раствора HCl концентрације $1,0\text{ mol/dm}^3$. Реакциону смешу загревати на 80°C за време од 2 сата. Сви комплекси кристалишу из мале запремине воденог раствора на собној температури. Издвојене кристале комплекса одвојити цеђењем, испрати са мало хладне воде, а затим етанолом и сушити на ваздуху. Чисти комплекси добијени су прекристализацијом из мале количине топле воде и хлађењем. Чистоћа и састав комплекса проверени су помоћу резултата микроанализе, ^1H и ^{13}C NMR спектроскопије. За снимање ^1H NMR и ^{13}C NMR спектра $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ комплекса као растварач коришћен је $\text{DMSO}-d_6$.

Израчунато за $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2] = \text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pt}$ ($M_r = 326,08$): C, 7,37; H, 2,47; N, 8,59. Нађено: C, 7,48; H, 2,43; N, 8,59 %. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 250 MHz); δ (ppm) 2,24 (s, 4H, 2CH₂), 5,30 (s, 4H, 2NH₂); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 250 MHz); δ (ppm) 48,76 (CH₂).

Израчунато за $[\text{Pt}(1,2\text{-pn})\text{Cl}_2] = \text{C}_3\text{H}_{10}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pt}$ ($M_r = 340,11$): C, 10,59; H, 2,96; N, 8,24. Нађено: C, 11,15; H, 3,17; N, 8,05 %. ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 250 MHz); δ (ppm): 1,11 (d, 3H, CH_3), 2,10 – 2,58 (m, 3H, CH и CH_2), 5,12-5,39 (m, 4H, 2NH_2); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 250 MHz); δ (ppm): 15,71 (CH_3), 52,49 (CH_2), 55,42 (CH).

Израчунато за $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2] = \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pt}$ ($M_r = 380,17$): C, 18,96; H, 3,71; N, 7,37. Нађено: C, 19,20; H, 3,49; N, 7,46 %. ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 250 MHz); δ (ppm) 1,06 (m, 4H, 2CH_2 од C4 и C5), 1,63 (m, 4H, 2CH_2 од C3 и C6), 2,07 (m, 2H, 2CH од C1 и C2), 4,98-5,71 (m, 4H, 2NH_2); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 250 MHz); δ (ppm) 24,08 (C4 и C5), 31,27 (C3 и C6), 62,66 (C1 и C2).

3.6 Добијање $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-}O,O')]$ комплекса

Платина(II) комплекси типа $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-}O,O')]$, (где је L бидентатно координовани en, 1,2-pn или dach диамински лиганд, а CBDCA ањон 1,1-циклобутандикарбоксилне киселине бидентатно координован преко кисеоникових атома карбоксилних група) синтетизовани су по модификованом поступку који је раније описан у литератури [55].

Комплекси типа $[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, добијени су мешањем одговарајућих хлоридо-комплекса ($[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$) са AgNO_3 у молском односу 1:1,95 при рН вредности 2,0 у одговарајућој запремини H_2O , на начин који је раније описан у литератури [55].

Издвојени талог AgCl одвојити цеђењем. У бистре растворе одговарајућег аква комплекса додати еквимоларну количину CBDCA лиганда и два еквивалента NaOH обрачунатог у односу на CBDCA лиганд. Реакциону смешу мешати на $60\text{ }^\circ\text{C}$ за време од 3 сата. Одговарајући комплекси кристалишу из мале запремине воденог раствора на собној температури. Након цеђења издвојених кристала у филтрате додати малу запремину етанола при чему се издваја додатна количина $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-}O,O')]$ комплекса, након хлађења у фрижидеру за време од два дана. Чистоћа и састав комплекса проверени су помоћу резултата микроанализе, ^1H и ^{13}C NMR спектроскопије. Принос је око 60–70%.

Израчунато за $[\text{Pt}(\text{en})(\text{CBDCA-}O,O')]$ = $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$ ($M_r = 397,29$): C, 24,19; H, 3,55; N, 7,05. Нађено: C, 24,28; H, 3,47; N, 7,04 %. ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 250 MHz); δ (ppm) 2,23 (s, 4H, 2CH_2 из en), 5,55 (s, 4H, 2NH_2), 1,64 (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$ из CBDCA), 2,65 (t, 4H, $\alpha\text{-CH}_2$ и $\beta\text{-CH}_2$ из CBDCA); ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 250 MHz); δ (ppm) 47,84 (CH_2

из en), 14,99 (C3 из CBDCA), 30,19 (C2 и C4 из CBDCA), 55,47 (C1 из CBDCA), 177,23 (C=O).

Израчунао за [Pt(1,2-pn)(CBDCA-O,O')] = C₉H₁₆N₂O₄Pt (Mr = 411,31): C, 26,28; H, 3,92; N, 6,81. Нађено: C, 25,31; H, 4,11; N, 6,95 %. ¹H NMR (DMSO-d₆, 250 MHz); δ (ppm) 1,11 (d, 3H, CH₃ из 1,2-pn), 2,12 – 2,56 (m, 3H, CH и CH₂ из 1,2-pn), 5,22-6,03 (m, 4H, 2NH₂), 1,65 (m, 2H, γ-CH₂ из CBDCA), 2,65 (t, 4H, α-CH₂ и β-CH₂ из CBDCA); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 250 MHz); δ (ppm) 15,82 (CH₃ из 1,2-pn), 53,49 (CH₂ из 1,2-pn), 56,41 (CH из 1,2-pn), 15,07 (C3 из CBDCA), 30,10 и 30,38 (C2 и C4 из CBDCA), 56,20 (C1 из CBDCA), 177,42 (C=O).

Израчунао за [Pt(dach)(CBDCA-O,O')] = C₁₂H₂₀N₂O₄Pt (Mr = 451,38): C, 31,93; H, 4,47; N, 6,21. Нађено: C, 30,70; H, 4,53; N, 6,13 %. ¹H NMR (DMSO-d₆, 250 MHz); δ (ppm) 1,11 (m, 4H, 2CH₂, C4 и C5 из dach), 1,62 (m, 4H, 2CH₂, C3 и C6 из dach), 2,03 (m, 2H, 2CH, C1 и C2 из dach), 4,98-5,71 (m, 4H, 2NH₂), 1,65 (m, 2H, γ-CH₂ из CBDCA), 2,68 (t, 4H, α-CH₂ и β-CH₂ из CBDCA); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 250 MHz); δ (ppm) 24,07 (C4 и C5 из dach), 31,49 (C3 и C6 из dach), 62,06 (C1 и C2 из dach), 15,04 (C3 из CBDCA), 30,26 (C2 и C4 из CBDCA), 55,47 (C1 из CBDCA), 177,34 (C=O).

3.7 Добијање [Pd(dpa)₂]Cl₂ · 4H₂O комплекса

Раствору који је добијен растварањем 0,0300 g (1,45 · 10⁻⁴ mola) Met-Gly у 4 cm³ воде додати 0,0507 g (1,45 · 10⁻⁴ mola) чврстог [Pd(dpa)Cl₂] комплекса. Добијени раствор закиселити (pH = 2,4) додавањем раствора HCl концентрације 1,0 mol/dm³ и реакциону смешу загревати на 60 °C уз мешање 4-5 сати. Након тога раствор процедити од неизреагованог [Pd(dpa)Cl₂] комплекса. Филтрат оставити у фрижидеру за време од неколико дана. Светло жуте кристале [Pd(dpa)₂]Cl₂ · 4H₂O комплекса одвојити цеђењем, пропрати са етанолом, а затим сушити на ваздуху. Чистоћа и састав комплекса проверени су помоћу резултата микроанализе, ¹H и ¹³C NMR спектроскопије. Принос је 40% (0,0343 g).

Израчунао за [Pd(dpa)₂]Cl₂ · 4H₂O = C₂₀H₂₆H₆PdCl₂O₄ (Mr = 591,74): C, 40,59; H, 4,43; N, 14,20. Нађено: C, 40,06; H, 4,54; N, 14,12 %. За снимање ¹H NMR и ¹³C NMR спектра [Pd(dpa)₂]Cl₂ комплекса као растварач коришћен је D₂O и TSP (триметил-силилпропан-3-сулфонат) као референтни стандард. ¹H NMR (D₂O, 200

MHz); δ (ppm) 7,13 (*m*, H5); 7,46 (*d*, H3); 7,61 (*d*, H4); 8,05 (*m*, H6); ^{13}C NMR (D_2O , 200 MHz); δ (ppm) 119,41 (C4); 125,10 (C5); 146,59 (C3); 153,48 (C6); 155,58 (C2).

3.8 Добијање [Pt(dien)Cl]Cl комплекса

Комплекс [Pt(dien)Cl]Cl (где је dien тридентатно координан диетилентриамин) је добијен на начин који је описан у литератури [105]. У 10 cm^3 воде растворити 0,4151 g ($1,0 \cdot 10^{-3}$ mola) $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ и у овај раствор додати 0,5 ml (98%) диетилентриамин. Подесити рН вредност раствора на 3,0 додатком $1,0\text{ mol/dm}^3$ HCl и рефлуктовати за време од 6 сати. Добијени жути раствор упарити на вакуум упаривачу на малу запремину и оставити преко ноћи у фрижидеру. Издвојене кристале [Pt(dien)Cl]Cl комплекса одвојити цеђењем, испрати са мало етанола и сушити на ваздуху. Чистоћа и састав комплекса проверени су помоћу микроанализе. Принос је 60% (0,2242 g).

Израчунато за [Pt(dien)Cl]Cl = $\text{C}_4\text{H}_{13}\text{N}_3\text{PtCl}_2$ (Mr = 369,16): C, 13,01; H, 3,54; N, 11,38. Нађено: C, 13,21; H, 3,48; N, 11,14 %.

3.9 Добијање K[Pt(Gly-Gly-N,N',O)] комплекса

Комплекс K[Pt(Gly-Gly-N,N',O)] (Gly-Gly је тридентатно координани дипептид преко азота терминалне аминок групе, депротонаног пептидног атома азота и кисеониковог атома из терминалне карбоксилне групе) је синтетизован по модификованом поступку који је раније описан у литератури [106].

У 5 cm^3 воде растворити 0,2076 g ($5,0 \cdot 10^{-4}$ mola) $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ и у овај раствор додати 0,3320 g ($2,0 \cdot 10^{-3}$ mola) KI. Реакциону смешу загревати на $60\text{ }^\circ\text{C}$ за време од 5 минута. У добијену реакциону смешу додати 0,0660 g ($5,0 \cdot 10^{-4}$ mola) дипептида Gly-Gly раствореног у 5 cm^3 воде и наставити загревање на $60\text{ }^\circ\text{C}$ наредних 30 минута. У току овог времена, рН вредност реакционе смеси је контролисана сваких 5 минута и одржавана на око 6,5 помоћу $1,0\text{ mol/dm}^3$ раствора KHCO_3 . Добијени раствор упарити на запремину од око 5 cm^3 на вакуум упаривачу и затим оставити на собној температури преко ноћи. Издвојене жуте кристале комплекса одвојити цеђењем, испрати са мало етанола и сушти на ваздуху. Чистоћа и састав комплекса проверен је

помоћу микроанализе, ^1H NMR и ^{13}C NMR спектроскопије. Принос је 40% (0,0980 g).

Израчунато за $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-}N,N',O)] = \text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3\text{IPt}$ ($M_r = 491,18$): C, 9,78; H, 1,23; N, 5,70. Нађено: C, 9,63; H, 1,34; N, 5,81 %.

За снимање ^1H NMR и ^{13}C NMR спектра $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-}N,N',O)]$ комплекса као растварач коришћен је D_2O и TSP (триметил-силилпропан-3-сулфонат) као референтни стандард. ^1H NMR (D_2O , 200 MHz); δ (ppm) 3,99 (s, 2H, CH_2) и 3,62 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (D_2O , 200 MHz); δ (ppm) 51,72 (CH_2); 53,37 (CH_2); 182,55 (C=O) и 194,00 (C=O).

3.10 Мерење рН вредности

Сва рН мерења су рађена на 25 °C. За ову сврху употребљен је рН-метар Iskra MA 5704, који је калибрисан у односу на Фишерове (Fischer) пуферске растворе за рН = 4,0 и рН = 7,0. Измерене рН вредности нису кориговане у односу на деутеријумски ефекат.

3.11 Микроанализа

Све микроанализе за C, H и N параметре рађене су у Микроаналитичком одељењу Института за хемију Хемијског факултета, Универзитета у Београду и на Хемијском факултету, Технолошког Универзитета у Варшави, Пољска.

3.12 NMR (^1H и ^{13}C) мерења

За снимање ^1H NMR и ^{13}C NMR спектра употребљени су D_2O и $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (DMSO) као растварачи и TSP (триметил-силилпропан-3-сулфонат) као референтни стандард. Спектри су снимани на Varian Gemini 200 MHz, Bruker AC 250 и Bruker AM360 FT-NMR спектрометрима. Све реакције су извођене у NMR киветама пречника 5 mm.

Реакције $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{D}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са *N*-ацетилованим дипептидима MeCOMet-Gly и MeCOHis-Gly праћене су помоћу ^1H NMR спектроскопије. Паладијум(II) комплекс и пептиди мешани су у молском односу 1 : 1 у NMR кивети. Концентрација раствора након мешања била је 10 mM у односу на реактанте. Наведене реакције су извођене на температури од 25 и 60 °C, а рН

вредност реакционе смеше била је између 2,0 - 2,5.

Реакције $[\text{Pd}(\text{en})(\text{D}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{D}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са *N*-ацетилованим тетрапептидом MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ праћене су помоћу ¹H NMR спектроскопије. Одговарајући комплекс и пептиди мешани су у молском односу 1 : 1 у NMR кивети. Наведене реакције су извођене на температури од 60 °C, а рН вредност реакционе смеше била је између 1,5 - 2,0.

Реакције између *N*-ацетилованих трипептида MeCOMet-Gly-Gly и MeCOGly-Met-Gly и паладијум(II) комплекса типа $[\text{Pd}(\text{L})(\text{D}_2\text{O})_2]^{2+}$ (где је L бидентатно координовани en, pic или dra лиганд) изучаване су помоћу ¹H NMR спектроскопије. Еквимоларне количине паладијум(II) комплекса и трипептида мешане су директно у NMR кивети. Финални раствор био је 10 mM у односу на реактанте. Реакције су извођене на температури од 60 °C, а рН вредност реакционе смеше била је у опсегу 2,0 - 2,5.

Реакције између MeCOMet-Gly и платина(II) комплекса типа $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCSA-}O,O')]$ (где је L бидентатно координован један од следећих лиганда: en, 1,2-pn, dach, а CBDCSA ањон 1,1'-циклобутандикарбоксилне киселине) изучаване су помоћу ¹H NMR спектроскопије. Еквимоларне количине платина(II) комплекса и MeCOMet-Gly мешане су директно у NMR кивети у 50 mM фосфатном пуферу. Реакције су извођене при физиолошким условима, на температури од 37 °C и при рН вредности реакционе смеше од 7,4.

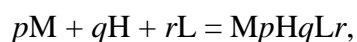
Реакција $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-}N,N',O)]^-$ комплекса са *N*-ацетилованим дипептидом MeCOMet-His праћена је помоћу ¹H NMR спектроскопије. Платина(II) комплекс и MeCOMet-His мешани су у молском односу 1 : 1 у 50 mM фосфатном пуферу. Реакција је праћена на температури од 25 °C, а рН вредност реакционе смеше била је 7,4.

3.13 Потенциометријска мерења

За потенциометријска мерења употребљен је MOLSPIN рН-метар опремљен 6.0234.100 комбинованом електродом (Metrohm) и MOL-ACS микробиретом са компјутерском контролом. Паладијум(II) комплекс и MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ тетрапептид мешани су у 1 : 1 молском односу и потенциометријске титрације су извођене у рН области 2,5 - 11,0.

Титрација је извођена са бескарбонатним раствором калијум-хидроксида познате концентрације. Током реакције кроз узорак је пропуштана струја аргона да би се обезбедило потпуно одсуство кисеоника и угљеник(IV)-оксида, као и за мешање раствора. Сва рН-потенциометријска мерења су извођена на константној температури (25 °C) и при константној јонској јачини раствора (0,2 mol/dm³ KCl). Концентрација хидронијум јона израчуната је на основу очитаних рН вредности, на начин који је раније описан у литератури [107].

Константе протоновања тетрапептида и константе стабилности ($\log\beta_{pqr}$) Pd(II) комплекса су израчунате помоћу компјутерских програма PSEQUAD [108] и SUPERQUAD [109] употребом следећих једначина:



$$\beta_{pqr} = \frac{[MpHqLr]}{[M]^p \cdot [H]^q \cdot [L]^r}.$$

3.14 Рендгенска структурна анализа

Светло жути плочасти кристали $[Pd(dpa)_2]Cl_2 \cdot 4H_2O$ комплекса, димензија 0,25 x 0,15 x 0,05 mm добијени су прекристалисавањем из воденог раствора. Рендгенска структурна испитивања комплекса су вршена на бази мерења интензитета рефлексија помоћу KM4CCD дифрактометра применом МоК α радијације ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) на собној температури. Остали кристалографски подаци и експериментални детаљи за комплекс $[Pd(dpa)_2]Cl_2 \cdot 4H_2O$ дати су у табели 3.

Структура комплекса је решена директном методом, коришћењем програма SHELXS-86 [110], а утачњавање методом најмањих квадрата помоћу SHELXL-97 програма [111]. Добијени интензитети су кориговани за L ρ ефекте и за апсорпцију. Анизотропни термални параметри су употребљени за атоме теже од водоника. Водоникови атоми везани за угљеникове атоме су смештени на израчунате позиције, док су они везани за кисеоников атом из молекула воде и азотов атом лоцирани у диферентним Фуриеровим (Fourier) мапама (ΔF). Дужине О-Н и N-Н веза су стандардизоване на вредности од 0,85 и 0,90 \AA , респективно. Позиције свих водоникових атома су утачњаване тако што су њихови изотропни температурни фактори фиксирани на вредност 30% већу од изотропних температурних фактора

атома на којима се налазе. "Siemens Stereochemical Workstation" програм употребљен је за припрему цртежа [112].

Табела 3. Кристалографски и други експериментални подаци за комплекс $[\text{Pd}(\text{dpa})_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Комплекс	$[\text{Pd}(\text{dpa})_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Емпиријска формула	$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{Pd}$
Молекулска маса	591,77
Кристални систем	моноклиничан
Просторна група	$C2/c$
Параметри јединичне ћелије:	
a (Å)	15,8539(11)
b (Å)	7,7580(6)
c (Å)	20,5302(12)
β (°)	107,563(6)
V (Å ³)	2407,4(3)
Z	4
D_x (Mg m ⁻³)	1,633
Абсорпциони коефицијент (mm ⁻¹)	1,032
Број сакупљених рефлексција	12500
Број независних рефлексција	2137
Број употребљених рефлексција	1705
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$	0,0360
$wR(F^2)$	0,0852
S	1,096
$\Delta\rho_{\text{max}}$ (e Å ⁻³)	1,125
$\Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å ⁻³)	-0,426

4. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА

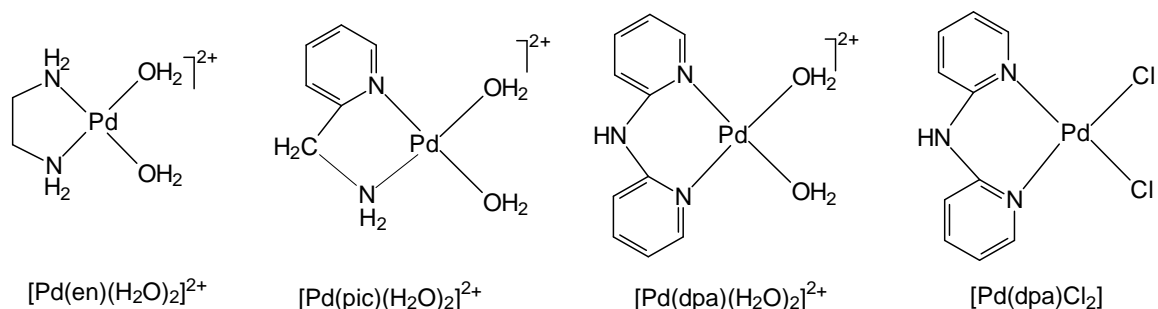
4.1 ХИДРОЛИЗА ПЕПТИДА КОЈИ САДРЖЕ L-МЕТИОНИН И L-ХИСТИДИН ПОМОЋУ РАЗЛИЧИТИХ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) И ПЛАТИНЕ(II)

Многи биолошки процеси укључују реакцију хидролизе пептидне везе у пептидима и протеинима. Поред тога, селективна хидролиза ових биолошки значајних молекула је од велике важности за одређивање њихове сложене структуре. Због свог великог биолошког значаја реакције селективне хидролизе пептидне везе у пептидима и протеинима су веома интересантне и са хемијске тачке гледишта. Испитивања реакција комплекса метала са пептидима су показала да се ови комплекси могу са успехом употребити као каталитички агенси селективног раскидања пептидне везе у овим молекулима. У току последњих тридесет година, посебна пажња посвећена је испитивању реакција квадратно-планарних комплекса паладијума(II) [54,68,69,72,83-85,87,113-116] и платине(II) [53] са пептидима који у структури садрже аминокиселине L-метионин или L-хистидин. Добијени резултати ових испитивања су показали да се наведени комплекси координују за неки од хетероатома у бочном низу пептида (тиоетарски атом сумпора из L-метионина или N3 атом азота имидазолског прстена из L-хистидина) при чему настају хидролитички активни паладијум(II)- и платина(II)-пептид комплекси. Координовани комплекси ових јона метала катализују хидролизу пептидне везе у чију структуру улази карбоксилна група аминокиселина L-метионина и L-хистидина.

Предност комплекса паладијума(II) и платине(II) у односу на друге комплексе прелазних метала је у томе што се ови комплекси веома лако координују за бочни низ пептида, што су реакције хидролизе пептидне везе прилично брзе и што се ови комплекси веома једноставно могу одвојити од хидролизованог супстрата. Поред биохемијског значаја и њихове могуће примене у биоаналитичкој пракси, реакције хидролизе пептидне везе у присуству комплекса платине(II) су од посебног значаја са аспекта бољег разумевања механизма токсичног деловања атнтитуморских комплекса платине(II). Упркос чињеници да су у новије време реакције хидролизе пептидне везе у пептидима који садрже аминокиселине L-метионин или L-хистидин у присуству различитих комплекса платине(II) и паладијума(II) интензивно изучаване, механизам ових реакција је још увек недовољно разјашњен. Имајући у виду биолошки значај ових реакција и њихову потенцијалну примену у биоаналитичкој пракси, ова докторска дисертација се бави испитивањем механизма хидролитичких реакција пептида који садрже L-хистидин и L-метионин у присуству различитих комплекса паладијума(II) и платине(II).

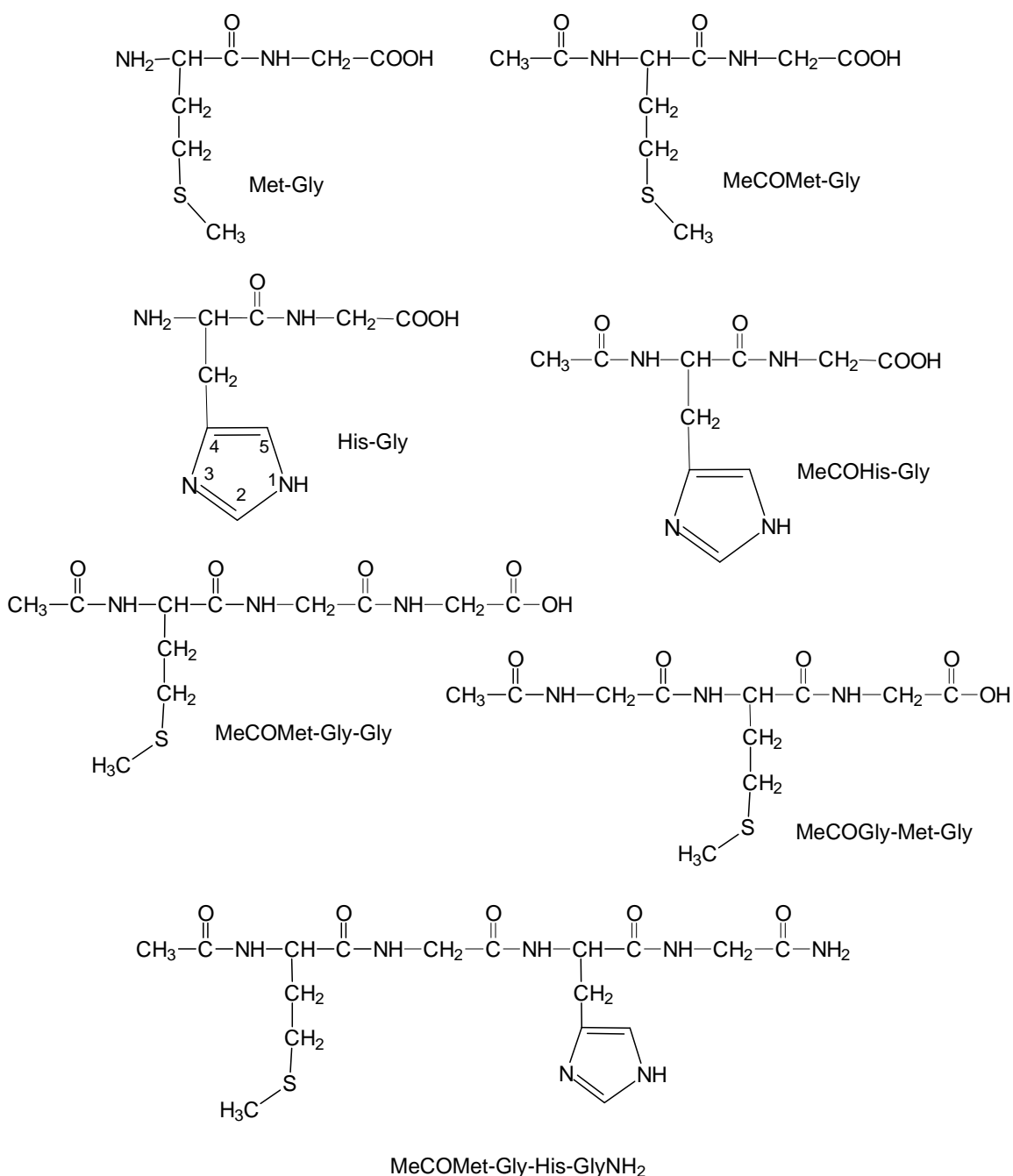
4.1.1 ИСПИТИВАЊЕ РЕАКЦИЈА КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) СА ПЕПТИДИМА

У првом делу овог рада, применом ^1H NMR спектроскопије, изучаване су реакције различитих паладијум(II) комплекса типа $[\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (L је бидентатно координован 2,2'-дипиридиламин, dpa; 2-пиколиламин, pic; етилендиамин, en) са пептидима L-метионил-глицином (Met-Gly), L-хистидил-глицином (His-Gly) и N-ацетилованим дериватима следећих пептида: L-метионил-глицил-глицин (MeCOMet-Gly-Gly), глицил-L-метионил-глицин (MeCOGly-Met-Gly) и L-метионил-глицил-L-хистидил-глицинамид (MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂).



Слика 24. Структурне формуле испитиваних паладијум(II) комплекса

Структурне формуле паладијум(II) комплекса приказане су на слици 24, док су одговарајуће формуле испитиваних пептида дате на слици 25. Реакције комплекса паладијума(II) са пептидима су изучаване у рН области од 2,0 до 2,5 и на температури од 25 и 60 °C.

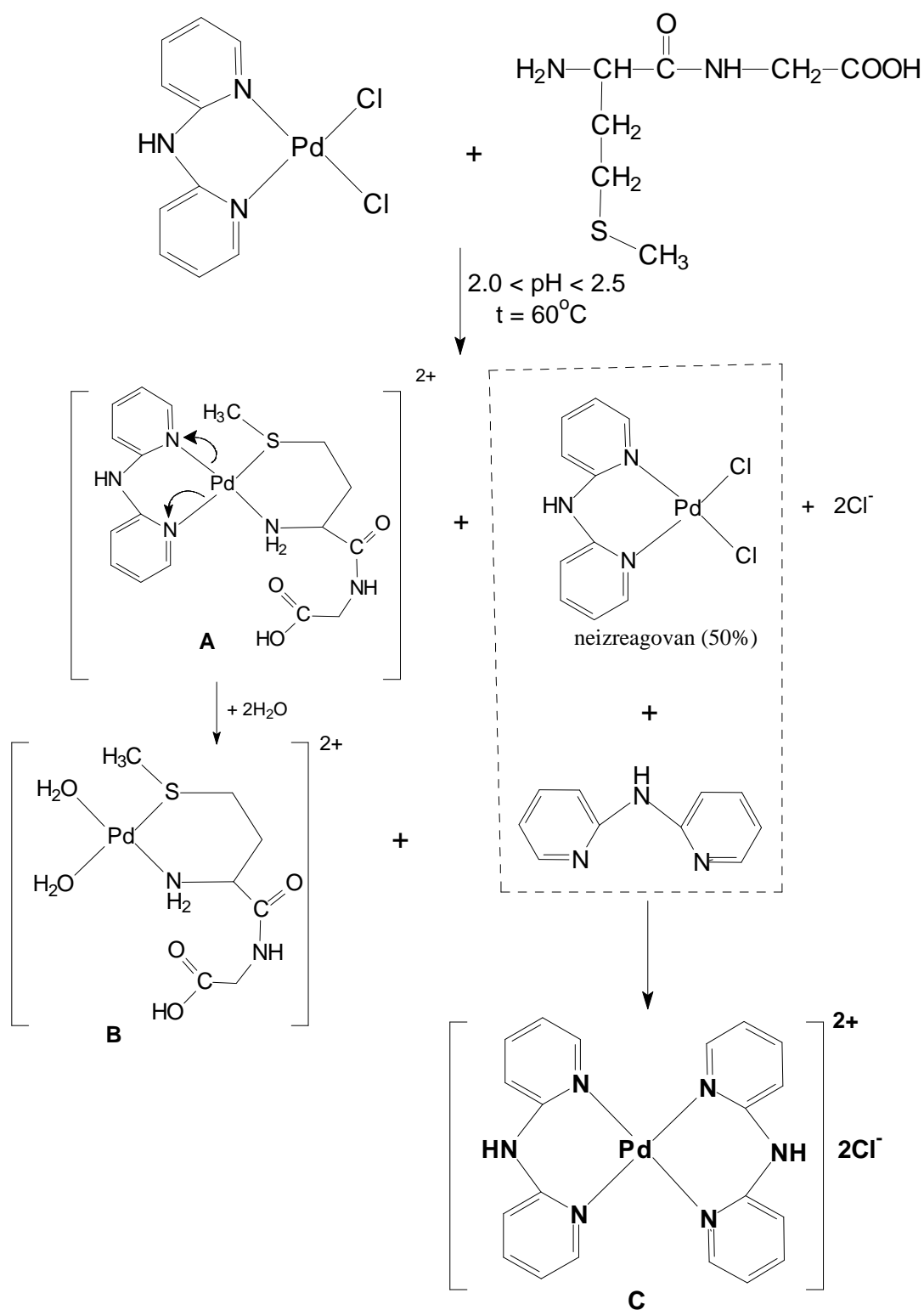


Слика 25. Структурне формуле испитиваних пептида

Као што су претходна истраживања показала, кисела средина у овим реакцијама је неопходна да би се спречило формирање динуклеарних хидроксо-паладијум(II) комплекса који су хидролитички неактивни [54,84,81,117]. Константа протоновања *N*-ацетилованог тетрапептида и константе стабилности ($\log \beta_{pqr}$) интермедијерних комплексних врста, који настају у реакцији $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2$, су одређене методом потенциометријске титрације. Структура реакционог производа који настаје у реакцији $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ комплекса са дипептидом Met-Gly је у овом раду одређена помоћу рендгенске структурне анализе.

Испитивање реакција Met-Gly и His-Gly дипептида са $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексима

Применом ^1H NMR спектроскопије изучаване су реакције $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ са дипептидима Met-Gly или His-Gly. Нађено је да у овим реакцијама не долази до хидролизе пептидне везе у рН области од 2,0 - 2,5. Синглет на 3,80 ppm који потиче од метиленских протона слободног глицина не појављује се у ^1H NMR спектру ни након праћења реакције у трајању од 7 дана на температури од 60 °C. Додатком глицина у реакциону смешу појављује се сигнал на 3,80 ppm, чиме је потврђено да у испитиваној реакцији не настаје слободан глицин као производ хидролизе пептидне везе. Шематски приказ реакције $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ и Met-Gly дат је на слици 26. Скоро исти реакциони пут може се претпоставити за реакцију $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ са овим дипептидом, као и за реакције $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са дипептидом His-Gly. Као што се из слике 26 види, један од производа у овој реакцији је квадратно-планарни $[\text{Pd}(\text{dpa})_2]^{2+}$ комплекс (C). Синтеза $[\text{Pd}(\text{dpa})_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ комплекса описана је у експерименталном делу овог рада, а његова структура потврђена на основу резултата рендгенске структурне анализе. Одсуство хидролизе пептидне везе у L-метионил-глицину и L-хистидил-глицину у присуству испитиваних паладијум(II) комплекса је у сагласности са раније добијеним резултатима за реакције неких Pd(II) комплекса са Met-X или His-X пептидима (X је нека алифатична аминокиселина) који немају ацетиловану *N*-терминалну amino групу [118]. Нађено је да у овим реакцијама настају веома стабилни паладијум(II)-пептид комплекси у којима је пептид бидентатно координован за Pd(II) јон преко атома сумпора из метионина (односно N3 атома азота имидазолског прстена из хистидина) и азота терминалне amino групе [82].



Слика 26. Шематски приказ реакције $[Pd(dpa)Cl_2]$ комплекса са Met-Gly пептидом

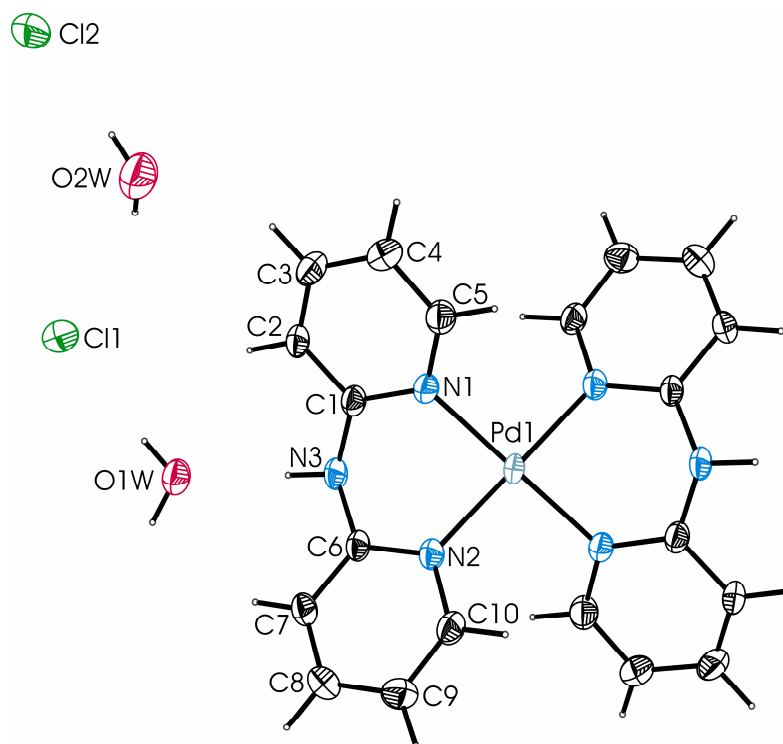
Такође, нађено је да је овај начин координовања пептида неповољан за хидролизу пептидне везе. На основу ових резултата закључено је да је за хидролизу пептидне везе, у којој учествује карбоксилна група координоване аминокиселине (хистидина или метионина) у His-X и Met-X пептидима, неопходно заштитити *N*-терминалну аминокиселинску групу [54,84,81,118].

Када се еквимоларна количина $[Pd(dpa)Cl_2]$ комплекса помеша са Met-Gly пептидом при $2,0 < pH < 2,5$ и на $60\text{ }^\circ\text{C}$, нађено је да у првој фази ове реакције настаје интермедијерни паладијум(II)-пептид комплекс, $[Pd(dpa)(Met-Gly-S,N)]^{2+}$ (**A**) (Слика 26). У овом комплексу пептид је бидентатно координован за Pd(II) јон преко атома сумпора из метионина и атома азота терминалне аминокиселинске групе. Реакција са His-Gly пептидом даје паладијум(II)-пептид комплекс у коме је паладијум(II) јон бидентатно координован преко N_3 атома азота имидазоловог прстена и атома азота терминалне аминокиселинске групе. Настајање $[Pd(dpa)(Met-Gly-S,N)]^{2+}$ комплекса (**A**) може се лако пратити у 1H NMR спектру на основу померања сигнала CH_3-S протона ка већем пољу у односу на одговарајуће хемијско померање ових протона за слободан пептид. Интензитет сигнала на 2,14 ppm, који потиче од CH_3-S протона слободног Met-Gly пептида, са временом се смањује, док интензитет сигнала на 2,54 ppm који одговара CH_3-S протонима координованог метионина за паладијум(II) јон са временом расте. Из односа интеграла синглета за слободан и координовани пептид израчуната је количина награђеног паладијум(II)-пептид комплекса (**A**). Ова реакција је прилично спора, што је у супротности са раније нађеним резултатима и добро познатим афинитетом сумпор доносних лиганда за координацију за Pt(II) и Pd(II) јоне [4,119]. Успоравање ове реакције је додатно потпомогнуто стерним ефектом између dpa лиганда и Met-Gly пептида у квадратно-планарном $[Pd(dpa)(Met-Gly-S,N)]^{2+}$ комплексу (**A**). Нађено је да након 2 сата на $60\text{ }^\circ\text{C}$ приближно 50% полазног $[Pd(dpa)Cl_2]$ комплекса изреагује, док на собној температури мање од 50% овог комплекса изреагује након 12 сати. Из слике 26 се види да након формирања комплекса **A** у следећој фази долази до елиминације бидентатно координованог dpa лиганда и његове супституције са молекулима воде (комплекс **B**; Слика 26). Настајање комплекса **B** из комплекса **A** је веома брз процес, тако да се не може пратити помоћу 1H NMR спектроскопије. Сигнали који одговарају слободном dpa лиганду и сигнали dpa лиганда координованог за паладијум(II) јон јављају се у области од 7,00 до 8,50 ppm и међусобно се преклапају. Елиминација dpa лиганда

потпомогнута је киселом средином раствора и *trans*-ефектом координованог атома сумпора [12]. Некоординовани дра лиганд даље реагује са слободним $[\text{Pd}(\text{dra})\text{Cl}_2]$ комплексом формирајући $[\text{Pd}(\text{dra})_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ комплекс (C) (Слика 26). Овај комплекс добијен је и директном синтезом у одвојеној реакцији $[\text{Pd}(\text{dra})\text{Cl}_2]$ комплекса са дра лигандом. Реакција $[\text{Pd}(\text{dra})\text{Cl}_2]$ комплекса са His-Gly је око три пута спорија у односу на реакцију са Met-Gly пептидом, што има за последицу веома мали принос $[\text{Pd}(\text{dra})_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ комплекса.

Опис кристалне структуре $[\text{Pd}(\text{dra})_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ комплекса

Резултати рендгенске структурне анализе су показали да $[\text{Pd}(\text{dra})_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ комплекс у структури садржи квадратно-планарни $[\text{Pd}(\text{dra})_2]^{2+}$ катјон, два хлоридна анјона и четири молекула воде (Слика 27). Овај комплекс представља један од пет дра-паладијум(II) комплекса чије су структуре потврђене рендгенском структурном анализом [110-112]. Асиметрична јединица се састоји од $[\text{Pd}(\text{dra})_2]^{2+}$ катјона смештеног на центру инверзије, два независна Cl^- анјона и два независна молекула воде који потичу од растварача. У координационој сфери паладијум(II) јона налазе се два дра лиганда, који су бидентатно координовани преко атома азота из пиридина (Слика 27). Одговарајуће дужине веза и величине углова веза у $[\text{Pd}(\text{dra})_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$



Слика 27. Структура комплексног $[\text{Pd}(\text{dra})_2]^{2+}$ катјона са хлоридним контра јонима и молекулима воде у $[\text{Pd}(\text{dra})_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ комплексу

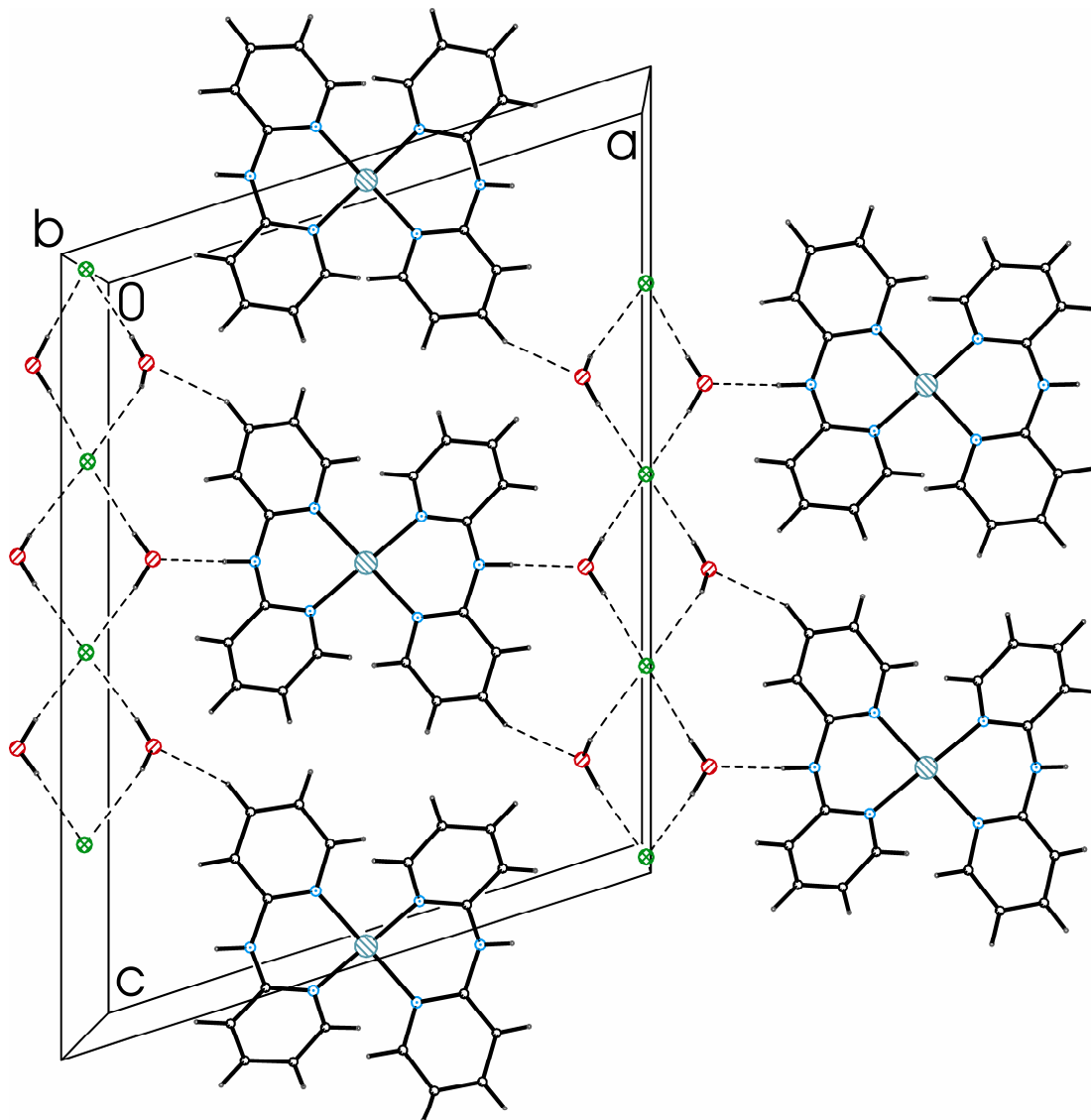
комплексу приказани су у табели 4. Дужине веза између паладијум(II) јона и *N*-донорских атома (2,017(3) и 2,024(3) Å) одговарају средњој вредности од 2,017(4) Å израчунатој за различито супституисане Pd(dpa) јединице [111,120-125] (28 посматраних структура у кристалографској бази података CSD (CSD = Cambridge Structural Database)) [126]. Угао од 86,16(12)^o који заклапају два атома азота пиридинских прстенова из dpa лиганда, који су координовани за паладијум(II) јон (N(2)-Pd(1)-N(1)), је нешто мањи у односу на исти угао код раније окарактерисаних [Pd(dpa)₂]²⁺ комплекса [110-112], где је ова вредност у области 87,8 - 91,8^o. Два пиридинска прстена dpa лиганда су увијена један у односу на други са диедарским углом од 42,8(1)^o. Овај угао је знатно већи од вредности нађених у CSD за [Pd(dpa)₂]²⁺ комплексе, које се крећу од 16,2^o до 31,3^o. На основу ових података може се закључити да постоји повезаност између величине N(2)-Pd(1)-N(1) угла и међусобног положаја пиридинских прстенова у [Pd(dpa)₂]Cl₂ · 4H₂O комплексу. Шесточлани хелатни прстен има конформацију дисторговане лађе са Pd1 и N3 атомима у положајима ван равни. Одступање N3 атома од просечне равни хелатног прстена (0,374(4) Å) мање је од одступања Pd1 атома (0,842(4) Å). Два хлоридна анјона (Cl2 и њихов транслациони еквивалент дуж осе *b*, слика 29) налазе се изнад и испод PdN₄ равни, али Pd^{····}Cl⁻ растојање (3,879(2) Å) искључује могућност постојања ове везе.

Табела 4. Одговарајуће дужине веза (Å) и величине углова веза (°) у [Pd(dpa)₂]Cl₂ · 4H₂O комплексу

Дужина везе	(Å)	Угао везе	(°)
Pd(1)-N(2)	2,017(3)	N(2)*-Pd(1)-N(1)	93,84(12)
Pd(1)-N(1)	2,024(3)	N(2)-Pd(1)-N(1)	86,16(12)
N(1)-C(1)	1,341(4)	C(1)-N(1)-Pd(1)	121,1(2)
C(1)-N(3)	1,391(4)	N(1)-C(1)-N(3)	119,2(3)
N(2)-C(6)	1,342(4)	C(6)-N(2)-Pd(1)	121,2(2)
C(6)-N(3)	1,391(4)	N(2)-C(6)-N(3)	119,4(3)
		C(1)-N(3)-C(6)	123,4(3)

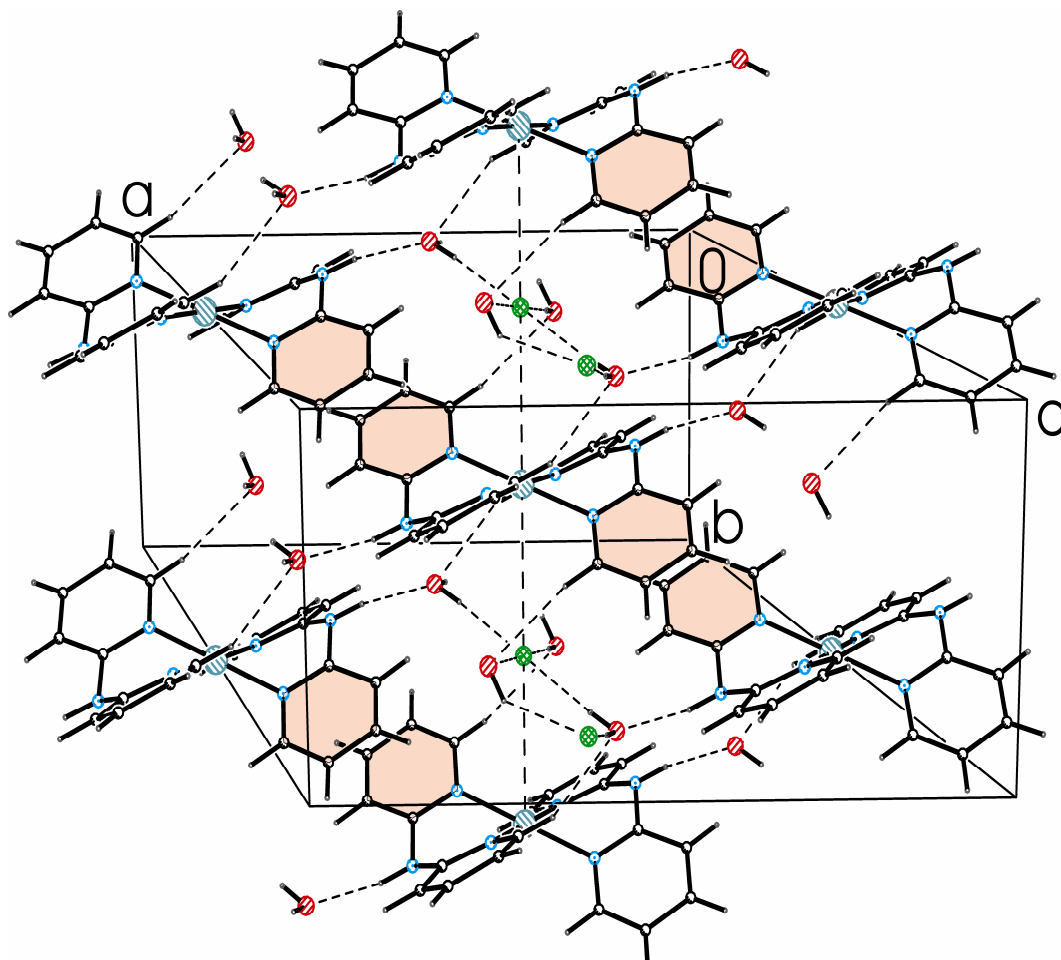
* атом је генерисан инверзијом кроз центар симетрије.

Молекули воде у $[\text{Pd}(\text{dpa})_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ комплексу се понашају као двоструки доноси у односу на атоме хлора. За разлику од молекула воде O_2w , молекула воде O_1w гради водоничну везу са N-H групом дпа лиганда (Слика 27 и 28). Као што се са слике 28 може видети, сваки хлоридни анјон гради четири водоничне везе са четири суседна молекула воде са просечним растојањем $\text{O}(\text{H})\cdots\text{Cl}$ од $3,203(30)$ Å. Молекули воде и хлоридни јони формирају траке повезане водоничним везама оријентисане дуж c осе које се састоје од $\text{R}_4^2(8)$ водоничних прстенова (Слика 28).



Слика 28. Супрамолекулски $\text{R}_4^2(8)$ мотиви који формирају спиралне траке садрже хлоридне анјоне и молекуле воде међусобно повезане водоничним везама. Траке су повезане за метал-органски део преко молекула воде који имају улогу акцептора протона из N-H групе дпа лиганда

Резултати претраживања помоћу CSD [126] дају 534 структуре које садрже вода-хлорид $R_4^2(8)$ водоничне прстенове, међутим чини се да у истраживањима хидратације халогенидних јона вода-хлоридни кластери нису детаљно третирани. Параметри везани за водоничне везе дати су у табели 5.



Слика 29. Паковање лиганата у $[Pd(dpa)_2]Cl_2 \cdot 4H_2O$ комплексу (π - π интеракције између пиридинских прстенова)

Бесконачне траке, које чине $R_4^2(8)$ водонични прстенови повезани у спиралу, међусобно повезују колоне Pd(II) катјона комплексираних органским лигандима. Између колона примећене су слабе π - π интеракције између једног од пиридинских прстенова (N2, C6, C7, C8, C9 и C10) и његовог симетријског еквивалената (-1/2-x, 1/2-y, 1-z) на растојању од 4,135(3) Å (Слика 29).

Табела 5. Дужине и углови интермолекулских водоничних веза у кристалу $[\text{Pd}(\text{dpa})_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ комплекса

	D-H (Å)	D...A (Å)	H...A (Å)	D-H...A (°)	Симетријске трансформације које се односе на акцепторски атом (A)
N3-H3N...O1W	0,90	2,901(4)	2,01	168	
O1W-H1W...Cl2	0,85	3,196(3)	2,35	173	-1-x, y, 0,5-z
O1W-H2W...Cl1	0,85	3,224(2)	2,38	173	
O2W-H3W...Cl1	0,85	3,237(4)	2,53	141	
O2W-H4W...Cl2	0,85	3,159(3)	2,31	175	

Испитивање реакција хидролизе MeCOMet-Gly и MeCOHis-Gly дипептида у присуству $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса

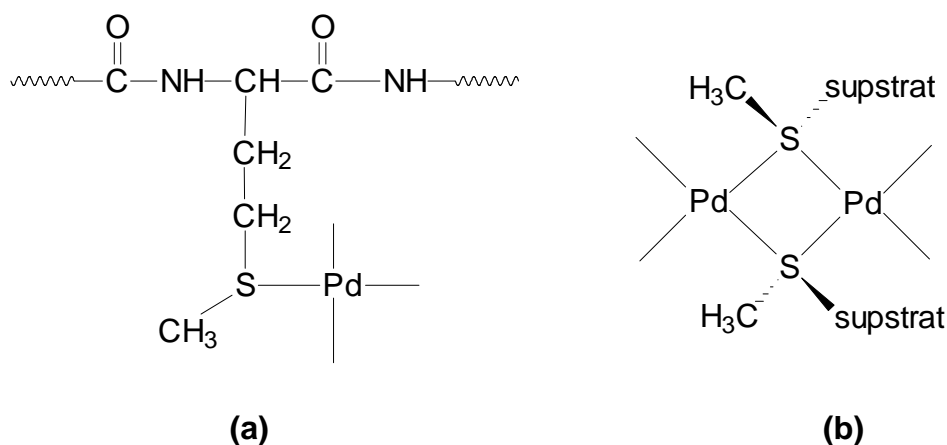
Применом ^1H NMR спектроскопије изучаване су реакције $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса (dpa је бидентатно координован 2,2'-дипиридиламин) са дипептидима који имају ацетиловану терминалну аминок групу, као што су *N*-ацетилвани L-метионил-глицин, MeCOMet-Gly и *N*-ацетилвани L-хистидил-глицин, MeCOHis-Gly . Паладијум(II) комплекс и *N*-ацетилвани пептиди приказани су на слици 24 и 25. Терминална аминок група у овим пептидима је ацетилована из разлога да би се спречило бидентатно координовање дипептида за паладијум(II) јон и на тај начин онемогућила хидролиза пептидне везе. Реакције су изучаване у рН области од 2,0 до 2,5 и на две различите температуре (25 и 60 °C). Реакције између паладијум(II) комплекса и *N*-ацетилваних дипептида извођене су директно у NMR кивети у 1 : 1 молском односу, а коначна концентрација појединачних реактаната била је 10 mM.

Хидролиза MeCOMet-Gly дипептида

Реакције $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ са *N*-ацетилваним дипептидом, MeCOMet-Gly , испитиване су на 25 и 60 °C и у рН области од 2,0 до 2,5. Одмах након мешања паладијум(II) комплекса са еквимоларном количином MeCOMet-Gly дипептида долази до координовања атома сумпора из метионина за паладијум(II) јон. Координовање атома сумпора из метионина је веома брз процес и лако се може пратити у ^1H NMR спектру. Синглет на 2,14 ppm који потиче од метил протона

некоординованог метионинског остатка се смањује, док интензитет синглета на 2,54 ppm који потиче од CH₃-S- протона координованог метионинског остатка за паладијум(II) јон са временом расте.

Хидролитичке реакције пептида који садрже метионин са различитим паладијум(II) и платина(II) комплексима раније су детаљно изучаване [118,70]. На основу ¹H NMR спектра закључено је да различити комплекси паладијума(II) дају различите хидролитички активне паладијум(II)-пептид комплексе. Када се као катализатор користи [PdCl₄]²⁻, активна форма је мононуклеарни паладијум(II)-пептид комплекс (Слика 30a). Међутим, ако се као катализатор употреби [Pd(H₂O)₄]²⁺, у раствору постоји динуклеарни паладијум(II)-пептид комплекс, који садржи два атома сумпора из два метионинска бочна низа као мостне лиганде и молекуле воде на терминалним местима (Слика 30b). Ово потврђује да су динуклеарни комплекси као катализатори у хидролитичким реакцијама пептидне везе много ефикаснији од одговарајућих мононуклеарних паладијум(II)-пептид комплекса. Нађено је да се у реакцијама пептида који садрже метионин са [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ (en је етилендиамин), [Pd(Me₄en)(H₂O)₂]²⁺ (Me₄en је N,N,N',N'-тетраметилетилендиамин) и *trans*-[Pd(py)₂(H₂O)₂]²⁺ (py је пиридин) комплексима, лиганди координовани преко азотових атома супституишу са молекулима воде, тако да настаје хидролитички активан комплекс, који је идентичан са оним који настаје у реакцијама пептида који садрже метионин са [Pd(H₂O)₄]²⁺ [73].



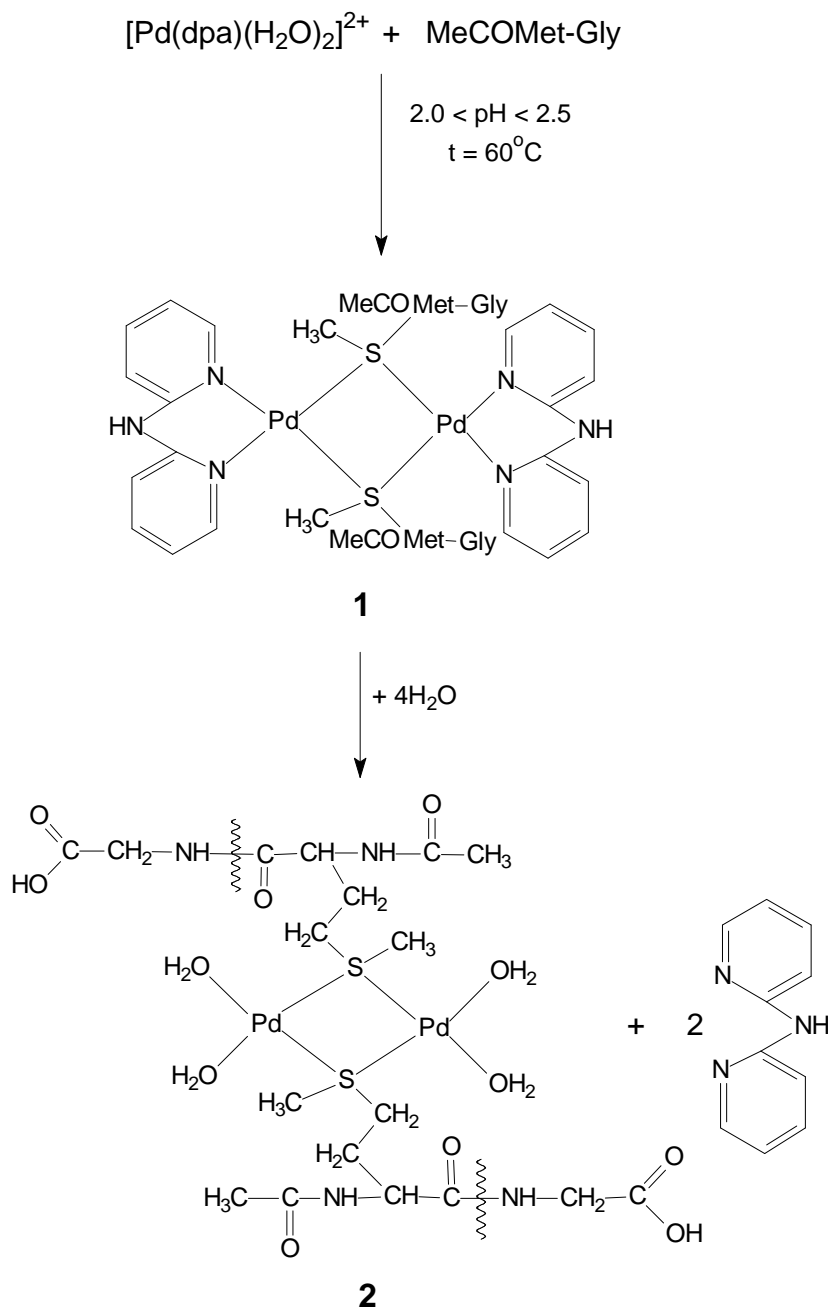
Слика 30. Могући хидролитички активни паладијум(II)-пептид комплекси у реакцијама између паладијум(II) комплекса и пептида који садрже метионин: (a) мононуклеарни и (b) динуклеарни

Ови резултати су у сагласности са недавно добијеним резултатима у реакцијама MeCOMet-Gly са серијом паладијум(II) комплекса типа $[Pd(L)(H_2O)_2]^{2+}$ (L је 1,2-пропилендиамин, изобутилендиамин, 1,2-диаминоциклохексан, N-метилетилендиамин) [70].

Шематски приказ испитиване реакције хидролизе пептидне везе у MeCOMet-Gly пептиду помоћу $[Pd(dpa)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса дат је на слици 31. Као што се из ове слике може видети, у првој фази ове реакције долази до координовања атома сумпора из метионинског бочног низа за паладијум(II), при чему настаје каталитички неактиван динуклеарни паладијум(II)-пептид комплекс (1). У другој фази ове реакције долази до супституције бидентатно координованог dpa лиганда са молекулима воде из растварача, тако да настаје каталитички активан паладијум(II)-пептид комплекс (2). Супституција бидентатно координованог dpa лиганда са молекулима воде је веома брз процес, а реакција је додатно потпомогнута *trans*-ефектом координованог сумпора и киселом средином раствора. Аква лиганди у комплексу (2) су у *cis*-положају у односу на супстрат, тако да се молекули воде, неопходни за хидролизу пептидне везе, налазе у веома повољном положају.

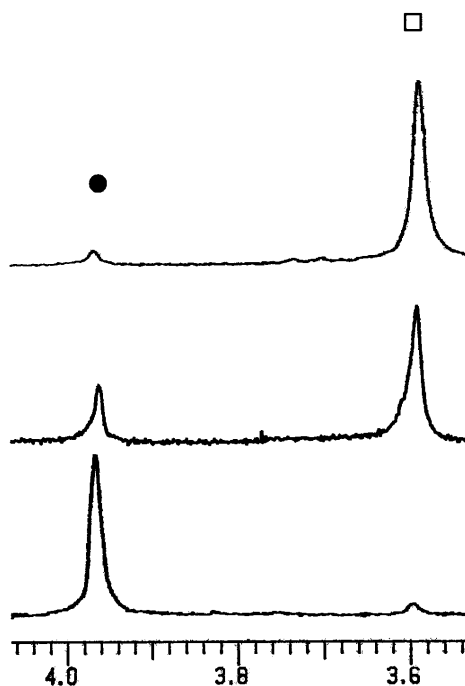
У реакцији паладијум(II) комплекса и MeCOMet-Gly пептида утврђено је да долази до селективне хидролизе пептидне везе која садржи карбоксилну групу метионина. Хидролиза пептидне везе праћена је применом 1H NMR спектроскопије. Синглет на 3,94 ppm који одговара метиленским протонима глицина у MeCOMet-Gly у току реакције опада, док интензитет синглета на 3,60 ppm који одговара $-CH_2-$ протонима слободног глицина временом расте (Слика 32). Додатком глицина директно у реакциону смешу у којој се налази одговарајући паладијум(II) комплекс и пептид интензитет синглета на 3,60 ppm се повећава, на основу чега је потврђено да овај сигнал одговара протонима слободног глицина. Из односа интеграла синглета за $-CH_2-$ глицинске протоне полазног пептида и синглета за ове протоне из слободног глицина израчунат је проценат хидролизованог пептида. Нађено је да незнатна количина слободног глицина реагује са полазним паладијум(II) комплексом, при чему настаје $[Pd(dpa)(Gly-N,O)]^+$ комплекс. Постојање овог комплекса у реакционој смеси потврђено је у 1H NMR спектру на основу сигнала на 3,52 ppm који одговара $-CH_2-$ протонима бидентатно координованог глицина. Присуство $[Pd(dpa)(Gly-N,O)]^+$ комплекса у реакционој смеси потврђено је директним синтезом овог комплекса додатком глицина у раствор $[Pd(dpa)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса, а затим

снимањем ^1H NMR спектра. Сигнал на 2,08 ppm који одговара метил-протонима слободне сирћетне киселине се не појављује у ^1H NMR спектру, што потврђује да у испитиваној реакцији не долази до хидролизе MeCO-Met пептидне везе.



Слика 31. Механизам хидролизе Met-Gly пептидне везе у MeCOMet-Gly помоћу $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса

На основу ових резултата закључено је да само Met-Gly пептидна веза из MeCOMet-Gly хидролизује у присуству $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса. На основу количине хидролизованог пептида током времена, под напред описаним експерименталним условима, одређена је каталитичка способност $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса. Нађено је да око 25% Met-Gly пептидне везе хидролизује на 60 °C након 2 сата, а 90% након 72 сата. Када је реакција извођена на 25 °C само 40% Met-Gly пептидне везе у MeCOMet-Gly пептиду хидролизује након 10 дана.



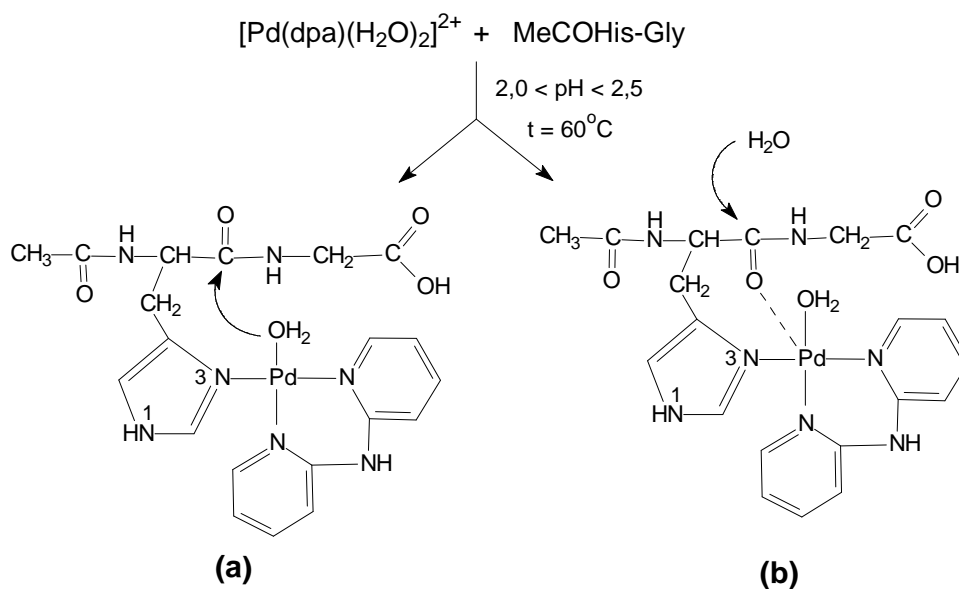
Слика 32. Део ^1H NMR спектра мерених за реакцију хидролизе Met-Gly пептидне везе у MeCOMet-Gly пептиду у присуству $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса. (●) $-\text{CH}_2-$ глицински протони нехидролизованог пептида; (□) метиленски протони слободног глицина

Хидролиза MeCOHis-Gly дипептида

У реакцији $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ са *N*-ацетилованим MeCOHis-Gly дипептидом, на 60 °C и у pH области од 2,0 до 2,5, нађено је да не долази до хидролизе His-Gly и MeCO-His пептидних веза. Интензитет синглета на 3,94 ppm који одговара глицинским протонима и интензитет синглета на 2,00 ppm за метил протоне, који потичу од слободног MeCOHis-Gly, нису се променили под напред описаним експерименталним условима за време од 7 дана. У току овог времена у ^1H NMR спектру нису се појавили сигнали на 3,60 ppm за слободан глицин и 2,08 ppm за

метил протоне слободне сирћетне киселине, на основу чега је закључено да у овим реакцијама не долази до хидролизе одговарајућих пептидних веза.

Ранија испитивања хидролитичких реакција MeCOHis-Gly пептида помоћу различитих комплекса паладијума(II), опште формуле $[Pd(L)(H_2O)_2]^{2+}$ (где је L бидентатно координовани диамински лиганд), су показала да His-Gly пептидна веза хидролизује [85]. Применом 1H NMR спектроскопије утврђено је да у реакцији MeCOHis-Gly са $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ комплексом при $pH < 3,0$ настаје пет паладијум(II)-пептид комплекса [54]. Ови комплекси су окарактерисани на бази разлика у хемијским померањима за C2H и C5H протоне имидазоловог прстена и њихове структурне формуле су детаљно описане у Општем делу рада (Слика 13). Каталитички активни паладијум(II)-пептид комплекс је одређен и окарактерисан у одвојеним експериментима са N1 и N3 метилованим дериватима MeCOHis-Gly дипептида. Испитивања су показала да само паладијум(II)-пептид комплекс, код кога је пептид монодентатно координован преко N3 атома имидазоловог прстена, може хидролизовати пептидну везу која садржи карбоксилну групу хистидина, док су преостала четири паладијум(II)-пептид комплекса хидролитички неактивни [84]. Постоје два могућа механизма хидролизе пептидне везе, интернални (Слика 33a) и екстернални (Слика 33b) механизам [84,83].



Слика 33. Могући начини (интернални (a) и екстернални (b)) хидролитичког раскидања His-Gly амидне везе у реакцији између MeCOHis-Gly пептида и $[Pd(dpa)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса

Као што је приказано на слици 33, за оба механизма неопходно је да паладијум(II) јон и пептидна веза буду на оптималном растојању.

Међутим, стерни ефекат бидентатно координованог *dpa* лиганда за паладијум(II) јон спречава реакцију хидролизе између MeCOHis-Gly пептида и [Pd(*dpa*)(H₂O)₂]²⁺ комплекса. Испитивани [Pd(*dpa*)(H₂O)₂]²⁺ комплекс садржи два волуминозна пиридинска прстена у *dpa* лиганду, који имају велику π-електронску густину, тако да онемогућавају координовање атома азота из имидазолског остатка за Pd(II) јон. На основу ¹H NMR спектроскопије закључено је да у току од 7 дана, на 60 °C и pH 2,0 - 2,5, хидролизује само 5% His-Gly пептидне везе. Веома спора реакција Pd(II) комплекса са MeCOHis-Gly пептидом може се довести у везу са стерним ефектом *dpa* лиганда из Pd(II) комплекса и имидазолског прстена из хистидинског бочног ланца, што за последицу има одсуство хидролизе пептидне везе у испитиваном дипептиду.

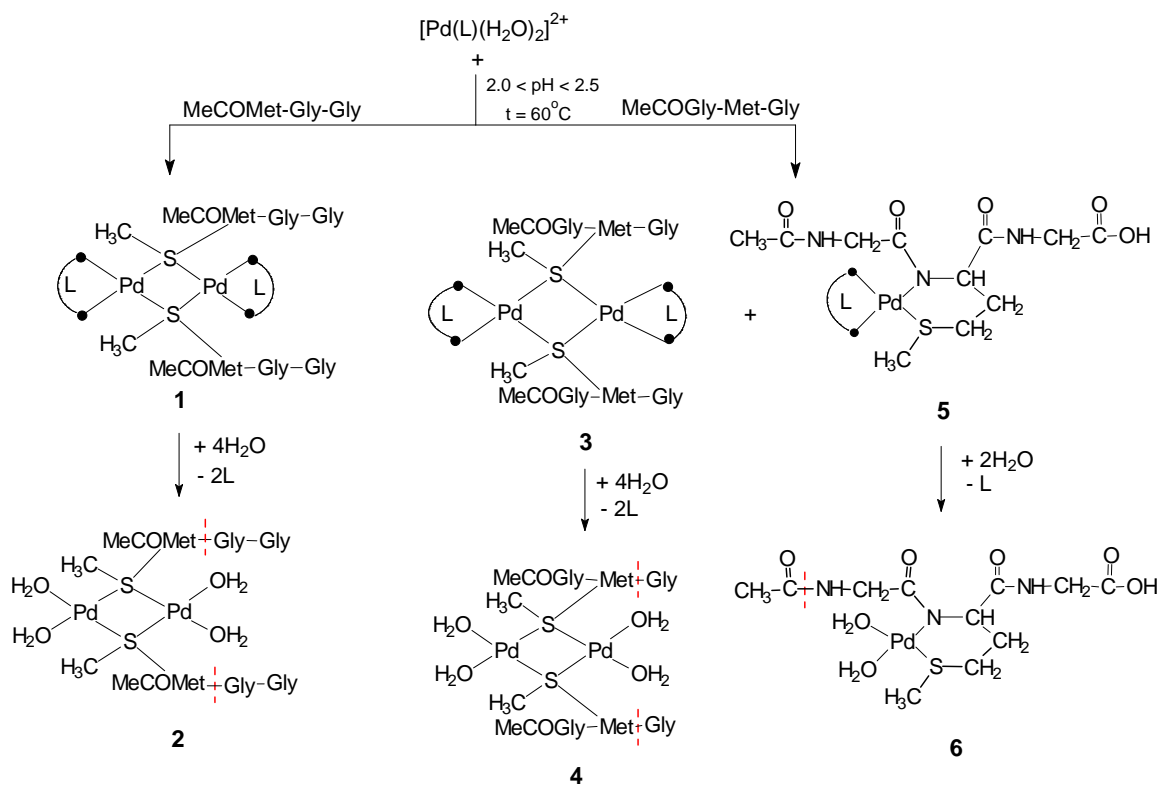
Хидролиза пептида који садрже L-метионин помоћу [Pd(L)(H₂O)₂]²⁺-типа комплекса

Реакције различитих паладијум(II) комплекса типа [Pd(L)(H₂O)₂]²⁺ (L је бидентатно координован *en*, *pic* или *dpa* лиганд; види Слику 24) са *N*-ацетилованим трипептидима, MeCOMet-Gly-Gly и MeCOGly-Met-Gly, изучаване су помоћу ¹H NMR спектроскопије. Све реакције су извођене у pH области 2,0 - 2,5 и на 60 °C. Утврђено је да у реакцији MeCOMet-Gly-Gly трипептида са [Pd(L)(H₂O)₂]²⁺ комплексима долази до региоселективног раскидања пептидне везе која укључује карбоксилну групу метионина, док у реакцији MeCOGly-Met-Gly са овим комплексима долази до раскидања две амидне везе и то Met-Gly и MeCO-Gly (Слика 34). У свим испитиваним реакцијама, након мешања Pd(II) комплекса и еквимоларне количине пептида под наведеним експерименталним условима, долази до спонтане координације атома сумпора метионинског остатка пептида за Pd(II) јон одговарајућег комплекса. Ову реакцију координације је могуће пратити у ¹H NMR спектру на основу промена у интензитету сигнала на 2,11 ppm који одговара CH₃-S протонима слободног пептида и промена у интензитету сигнала на 2,54 ppm који одговара CH₃-S протонима пептида координованог за Pd(II) преко атома сумпора.

Хидролиза MeCOMet-Gly-Gly трипептида

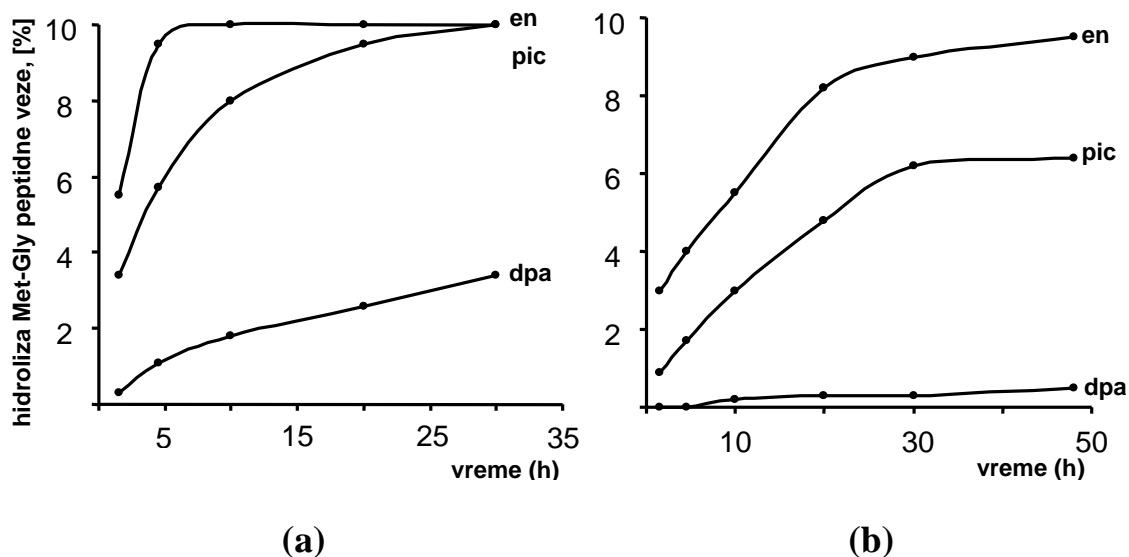
Шематски приказ реакција комплекса типа $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (L је en, pic, dra) са MeCOMet-Gly-Gly трипептидом дат је на слици 34. Хидролитички активни паладијум(II)-пептид комплекс у овим реакцијама је динуклеарни комплекс (2) који садржи два атома сумпора из два метионинска бочна низа као мостне лиганде и молекуле воде на терминалним местима. Резултати ранијих истраживања реакција комплекса паладијума(II) овог типа и пептида који садрже метионин показују да при $\text{pH} < 3,0$ долази до формирања динуклеарног комплекса са атомима сумпора у мосту [70,73,118]. Комплекс (2) настаје из интермедијерног динуклеарног паладијум(II)-пептид комплекса (1) супституцијом хелатно координованог диаминског лиганда L са два молекула воде. Супституција лиганда L молекулима воде је веома брза реакција и додатно потпомогнута *trans*-ефектом координованог сумпора и киселом средином раствора ($2,0 < \text{pH} < 2,5$) [127]. У реакцији трипептида MeCOMet-Gly-Gly и $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса супституцију етилендиамина са молекулима воде је могуће пратити помоћу ^1H NMR спектроскопије. Интензитет синглета на 2,86 ppm који одговара протонима бидентатно координованог en лиганда временом опада, док интензитет синглета на 3,36 ppm који потиче од слободног H_2en^{2+} лиганда временом расте. Међутим, у реакцијама овог трипептида са $[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pd}(\text{dra})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексима долази до преклапања сигнала који потичу од протона слободног pic и dra лиганда са сигналимa протона из одговарајућих Pd(II)-пептид комплекса (Слика 34; комплекс 1) и формирања мултиплета у области 7,00 - 8,50 ppm, због чега супституцију ових диаминских лиганда са молекулима воде није могуће пратити помоћу ^1H NMR спектроскопије.

У реакцијама MeCOMet-Gly-Gly са испитиваним $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексима интензитет сигнала глицинских протона (глицин у суседству метионина) нехидролизованог пептида на 3,98 ppm временом опада, док интензитет сигнала на 3,89 ppm глицинских протона слободног глицил-глицина временом расте. Додатком глицил-глицина у реакциону смешу долази до повећања интензитета сигнала на 3,89 ppm, што потврђује да овај сигнал потиче од слободног глицил-глицина. Из односа интеграла сигнала слободног Gly-Gly и интеграла сигнала који одговара почетној концентрацији MeCOMet-Gly-Gly израчунат је проценат хидролизованог пептида.



Слика 34. Шематски приказ реакција комплекса типа $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (L = en, pic и dpa) са MeCOMet-Gly-Gly и MeCOGly-Met-Gly трипептидима у области $2,0 < \text{pH} < 2,5$ и на 60°C

Каталитичка способност различитих $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса је одређена израчунавањем процента хидролизованог пептида у току времена, под истим експерименталним условима (Слика 35а). На основу података представљених на слици 35а може се закључити да брзина хидролизе Met-Gly пептидне везе опада са повећањем стерног ефекта лиганда координаног за Pd(II) јон (en > pic > dpa). Због стерног ефекта ароматичних пиридинских прстенова pic и dpa диаминских лиганда реакције хидролизе пептидне везе са $[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексима су знатно спорије у односу на реакције са $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексом. У реакцији $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса и MeCOMet-Gly-Gly после 4,5 сата хидролизује 95% Met-Gly пептидне везе. За исти временски период у реакцији овог трипептида и $[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ хидролизује 55%, док у реакцији са $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ хидролизује свега 15% Met-Gly пептидне везе (Слика 35а).



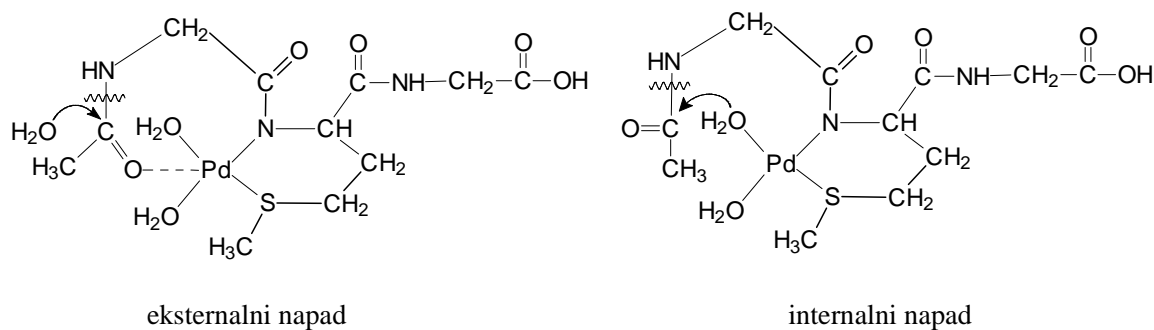
Слика 35. Временска зависност хидролитичког раскидања Met-Gly пептидне везе у пептидима који садрже метионин помоћу различитих комплекса типа $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ ($\text{L} = \text{en}, \text{pic}$ и dpa) при $2,0 < \text{pH} < 2,5$ и на $60\text{ }^\circ\text{C}$: **(a)** MeCOMet-Gly-Gly и **(b)** MeCOGly-Met-Gly.

Након 30 сати на $60\text{ }^\circ\text{C}$ у присуству $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса реакција хидролизе MeCOMet-Gly-Gly је потпуна, док је за исти временски период у присуству $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса само 35% Met-Gly пептидне везе из овог трипептида хидролизовало. Нађено је да под наведеним експерименталним условима не долази до хидролитичког раскидања других пептидних веза у MeCOMet-Gly-Gly пептиду.

Хидролиза MeCOGly-Met-Gly трипептида

На основу ^1H NMR спектроскопије нађено је да у реакцијама еквимоларних количина $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса и MeCOGly-Met-Gly трипептида, у рН области 2,0 - 2,5 и на $60\text{ }^\circ\text{C}$, долази до формирања динуклеарног **(3)** и мононуклеарног паладијум(II)-пептид комплекса **(5)** (Слика 34). Комплекси **(3)** и **(5)**, који настају у 3 : 1 молском односу, су интермедијерни производи и након супституције хелатног лиганда L молекулима воде, прелазе у хидролитички активне паладијум(II)-пептид комплексе **(4)** и **(6)**. Хидролитички активни комплекс **(4)** доводи до раскидања Met-Gly пептидне везе у MeCOGly-Met-Gly трипептиду, што се може уочити у ^1H NMR

спектру на основу појаве сигнала на 3,71 ppm који потиче од метиленских протона слободног глицина, а који настаје као производ хидролизе Met-Gly пептидне везе. Интензитет овог сигнала током времена расте, док интензитет сигнала на 4,01 ppm, који потиче од метиленских протона *N*-терминалног глицина у MeCOGly-Met-Gly трипептиду, временом опада. Из односа интеграла сигнала слободног глицина и интеграла сигнала који одговара почетној концентрацији MeCOGly-Met-Gly трипептида израчунат је проценат хидролизе Met-Gly пептидне везе. У реакцијама MeCOGly-Met-Gly са $[Pd(L)(H_2O)_2]^{2+}$ комплексима, као и у случају MeCOMet-Gly-Gly пептида, брзина реакције хидролизе опада са порастом стерног ефекта лиганда у Pd(II) комплексу ($en > pic > dpa$) (Слика 35b). Након 4,5 сата у реакцији MeCOGly-Met-Gly са $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ комплексом око 40% Met-Gly пептидне везе хидролизује, док је реакција хидролизе овог пептида са $[Pd(pic)(H_2O)_2]^{2+}$ комплексом два пута спорија. Као што се са слике 35b може видети, у току овог времена у реакцији са $[Pd(dpa)(H_2O)_2]^{2+}$ комплексом не долази до хидролизе Met-Gly пептидне везе у MeCOGly-Met-Gly пептиду. Из слике 34 може се видети да координовањем атома сумпора из метионинског остатка и депротонаног атома азота Gly-Met пептидне везе настаје мононуклеарни комплекс (5) који, након елиминације бидентатно координаног L (*en*, *pic*, *dpa*) лиганда и његове супституције са молекулима воде, гради хидролитички активан мононуклеарни паладијум(II) пептид комплекс (6). Ова реакција супституције је потпомогнута *trans*-ефектом негативно наелектрисаног депротонаног пептидног азота и киселом средином раствора. Одсуство хидролизе Gly-Met везе у овом пептиду је у складу са чињеницом да хелатном координацијом пептида за Pd(II) јон долази до стабилизације C-N везе, што инхибира њену хидролизу [60,72,87]. Међутим, нађено је да комплекс (6) катализује хидролизу MeCO-Gly пептидне везе у MeCOGly-Met-Gly трипептиду. Као што је приказано на слици 36, хидролиза MeCO-Gly амидне везе може се вршити преко два различита механизма. По првом механизму паладијум(II) јон као Луисова (Lewis) киселина интерреагује са депротонаним атомом азота амино групе метионина и атомом кисеоника пептидне везе која хидролизује. Интеракција Pd(II) јона са кисеоником поларизује карбонилну групу, при чему карбонилни угљеник постаје парцијално позитиван и погодан за нуклеофилни напад молекула воде из растварача (*екстернални механизам*). Да би се реакција хидролизе одвијала по овом механизму Pd(II) јон и карбонилни атом кисеоника морају бити на оптималном растојању.



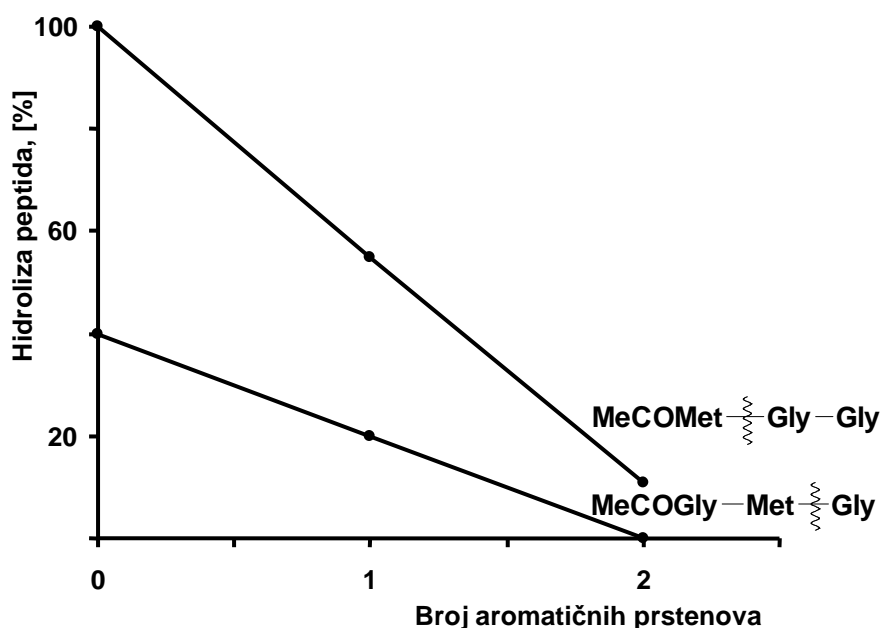
Слика 36. Шематски приказ могућих начина каталитичког раскидања MeCO-Gly пептидне везе у MeCOGly-Met-Gly трипептиду у присуству $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -типа комплекса

Друга могућност је да молекул воде који је координован за Pd(II) јон интерреагује са карбонилним C-атомом суседне пептидне везе која подлеже хидролизи (*интернални механизам*). За хидролизу пептидне везе по овом механизму молекул воде координован за Pd(II) мора бити у близини карбонилног атома угљеника пептидне везе која се раскида. На основу анализе ^1H NMR спектра, нађено је да у реакцијама $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са MeCOGly-Met-Gly интензитет сигнала на 2,05 ppm који одговара метил протонима ацетил групе из N-ацетилованог трипептида опада, док интензитет сигнала на 2,08 ppm који потиче од метил протона слободне сирћетне киселине са временом расте. Додатком сирћетне киселине у реакциону смешу долази до повећања интензитета сигнала на 2,08 ppm, чиме је потврђено да овај сигнал потиче од слободне сирћетне киселине. Из односа интеграла сигнала слободне сирћетне киселине и интеграла сигнала који одговара почетној концентрацији MeCOGly-Met-Gly трипептида, израчунат је проценат хидролизе MeCO-Met пептидне везе. У случају реакције овог трипептида са $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексом око 15% MeCO-Gly пептидне везе хидролизује након 30 сати. Брзина хидролизе MeCO-Gly пептидне везе опада са повећањем стерног ефекта бидентатно координованог лиганда за Pd(II) јон, следећим редом: en > pic > dra.

На основу резултата ^1H NMR испитивања реакција $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -типа комплекса са два трипептида, која садрже L-метионин, MeCOMet-Gly-Gly и MeCOGly-Met-Gly, у pH области 2,0 - 2,5 и на температури од 60 °C, може се закључити да брзина хидролизе у овим реакцијама строго зависи од природе бидентатно координованог диаминског лиганда L. Нађено је да брзина реакције

хидролизе опада са повећањем стерног ефекта лиганда координованог за Pd(II) јон, следећим редом: ep > pic > dra (Слике 35 и 37). Прва фаза у овим реакцијама је монодентатно координовање атома сумпора метионинског остатка за Pd(II) јон одговарајућег комплекса. Брзина интеракције Pd(II) комплекса са метионинским остатком је фаза која одређује брзину реакције хидролизе пептидне везе у испитиваним пептидима. Због тога је применом UV-VIS спектрофотометрије у овом раду одређена брзина реакција одговарајућег $[Pd(L)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса и *N*-ацетилованог L-метионина (MeCOMet) на pH = 2,5 и собној температури. Како би се обезбедили услови реакције псеудо-првог реда, концентрација лиганда била је у великом вишку у односу на концентрацију $[Pd(L)(H_2O)_2]^{2+}$ комплекса, ($[MeCOMet] : [Pd(L)(H_2O)_2]^{2+} > 20 : 1$). Спектрофотометријско одређивање константе брзине реакције псеудо-првог реда, k_{obs} , врши се праћењем промене апсорбције раствора A_t са временом t на одређеној таласној дужини, на основу једначине:

$$\ln(A_t - A_\infty) = \ln(A_0 - A_\infty) - k_{obs}t.$$



Слика 37. Зависност брзине реакције хидролизе Met-Gly пептидне везе у пептидима који садрже L-метионин од стерног ефекта лиганда L у $[Pd(L)(H_2O)_2]^{2+}$ комплексу. Реакције су испитиване за време од 4,5 сати у pH области 2,0 – 2,5 и на 60 °C

Зависност $\ln(A_t - A_\infty)$ од времена t је линеарна, тако да се из нагиба праве добија вредност константе брзине k_{obs} . Величина A_∞ представља апсорбцију раствора након времена t_∞ . У реакцији испитиваних Pd(II) комплекса и MeCOMet очекивано је формирање динуклеарних Pd(II) комплекса са два атома сумпора L-метионина у мосту [70,73,118]. Реакција MeCOMet са $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ је два пута бржа ($k_2 = 1,75 \cdot 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) у односу на реакцију са $[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ ($k_2 = 8,29 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) и приближно 36 пута бржа него реакција са $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексом ($k_2 = 4,87 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

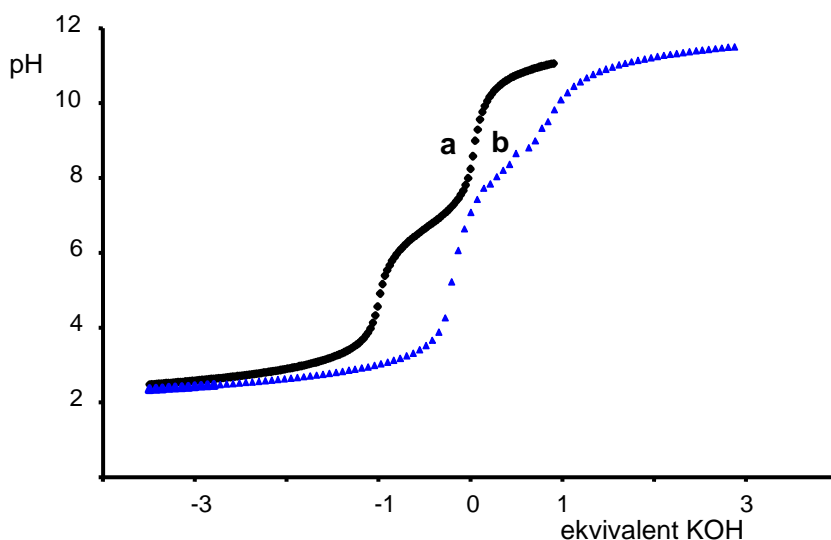
Ови резултати су у сагласности са чињеницом да су, због стерног ефекта ароматичних пиридинских прстенова диаминских лиганда у случају $[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса, реакције хидролизе пептидне везе са овим комплексима знатно спорије у поређењу са $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексом. Добијени резултати UV-VIS мерења се могу узети у обзир као потврда чињеници да брзина реакције хидролизе пептида који садрже L-метионин строго зависи од стерног ефекта лиганда L у $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексу. Такође, може се закључити да положај метионинског остатка у пептиду утиче на селективност и брзину хидролитичких реакција. Хидролиза MeCOMet-Gly-Gly пептида у присуству $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, $[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса, под наведеним експерименталним условима, је региоселективна и хидролизује само пептидна веза која садржи карбоксилну групу L-метионина (Слика 34). Међутим, хидролитичке реакције MeCOGly-Met-Gly са Pd(II) комплексима нису селективне и под наведеним условима две пептидне везе, Met-Gly и MeCO-Gly, хидролизују (Слика 34). Хидролиза ове две пептидне везе је процес који се одиграва истовремено и зависи од стерног ефекта лиганда L координованог за Pd(II) јон.

Испитивање реакција MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ тетрапептида са различитим Pd(II) и Pt(II) комплексима

Применом потенциометријских мерења и ¹H NMR спектроскопије испитиване су реакције тетрапептида MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ са $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексима. У првој фази ових испитивања, методом потенциометријских титрација, одређени су услови координације комплекса Pt(II) и Pd(II) за MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ тетрапептид, док је у другом делу овог рада применом ¹H NMR спектроскопије испитиван механизам каталитичког деловања Pt(II) и Pd(II) комплекса на хиролизу пептидне везе у овом тетрапептиду.

Потенциометријска испитивања реакција $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ са
 $MeCOMet-Gly-His-GlyNH_2$

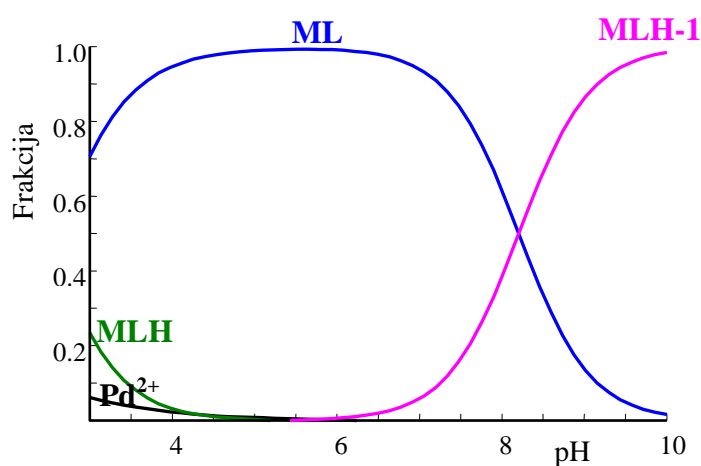
Константа протоновања *N*-ацетилованог тетрапептида и константе стабилности ($\log\beta_{pqr}$) интермедијерних комплексних врста, које настају у реакцији $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ (M) и $MeCOMet-Gly-His-GlyNH_2$ (L), израчунате су применом компјутерских програма PSEQUAD [108] и SUPERQUAD [109]. Паладијум(II) комплекс и $MeCOMet-Gly-His-GlyNH_2$ тетрапептид мешани су у 1 : 1 молском односу и потенциометријске титрације су извођене у рН области 2,5 - 11,0. Сва мерења су извођена на 25 °C у 0,2 mol/dm³ раствору KCl, као јонској средини, а као титрационо средство употребљен је раствор калијум-хидроксида познате концентрације (око 0,1 mol/dm³). Одговарајуће титрационе криве *N*-ацетилованог тетрапептида (a) и реакционе смеше $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ и $MeCOMet-Gly-His-GlyNH_2$ (b) приказане су на слици 38.



Слика 38. Крива потенциометријске титрације слободног пептида (a) и реакционе смеше $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ и $MeCOMet-Gly-His-GlyNH_2$ у 1 : 1 молском односу (b)

Поређењем потенциометријских кривих слободног лиганда (Слика 38a) и реакционе смеше $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ и $MeCOMet-Gly-His-GlyNH_2$ у 1 : 1 молском односу (Слика 38b) може се закључити да се депротоновање атома азота из

имидазоловог прстена хистидинског остатка одиграва у киселој средини. Формирање стабилне комплексне врсте [ML] (Слика 39) у рН области 4,0 - 7,0 додатно је потпомогнуто депротоновањем имидазолових атома азота. Комплекс [ML] је макрохелат, код кога је пептид преко тиюетарског атома сумпора и N3 атома азота имидазоловог прстена координован за Pd(II) јон. Такође, постојање ове комплексне врсте је потврђено на основу ^1H NMR спектроскопије (дискусија ^1H NMR спектра дата је у следећем поглављу). На слици 38 се јасно види да на рН око 7,0 почиње још један процес депротоновања, који највероватније одговара депротонацији атома азота пептидне везе. Ово је у складу са дистрибуционим дијаграмом приказаним на слици 39, где се јасно види да при $\text{pH} > 7,0$ долази до формирања [MH₁L] комплексне врсте. С обзиром да [MH₁L] садржи један протон мање у односу на [ML], може се претпоставити да је у [MH₁L] комплексу тетрапептид тридентатно координован за Pd(II) јон преко N3 атома азота имидазоловог прстена, депротонованог пептидног азота Gly-His пептидне везе и тиюетарског атома сумпора. ^1H NMR спектри при $\text{pH} > 7,0$ су веома сложени и постојање [MH₁L] комплексне врсте у раствору потврђено је само на основу потенциометријских израчунавања.



Слика 39. Дистрибуциони дијаграм комплекса који настају у реакцији $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $\text{MeCOMet-Gly-His-Gly-NH}_2$: $c([\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}) = 2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{пептида}) = 2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$

Константа протоновања *N*-ацетилованог тетрапептида и константе стабилности комплекса који настају у реакцији $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2$ приказане су у табели 6. Бројна вредност константе стабилности за $[\text{ML}]$ врсту је већа у односу на константе стабилности монодентатно координованог *N*-ацетилованог хистамина преко N3 атома за Pd(II) ($\log K = 6,45$ за $\text{MeCO-хистамин-}[\text{Pd}(\text{dien})]^{2+}$) [128], или монодентатно координованог L-метионина преко атома сумпора за Pd(II) јон ($\log K = 5,61$ за $\text{MeCOMet-}[\text{Pd}(\text{dien})]^{2+}$) [129]. Истовремено бидентатно координовање испитиваног тетрапептида преко N3 атома азота и тиоетарског сумпора је фактор који доприноси повећању константе стабилности $[\text{ML}]$ макрохелатне врсте у раствору.

Табела 6. Константа протоновања *N*-ацетилованог $\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2$ тетрапептида и константе стабилности комплекса добијених у реакцији $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (M) и $\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2$ (L) ($t = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $I = 0,2\text{ mol/dm}^3$). Константе стабилности су дефинисане као $\log \beta_{\text{pqr}}$ за $\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r$

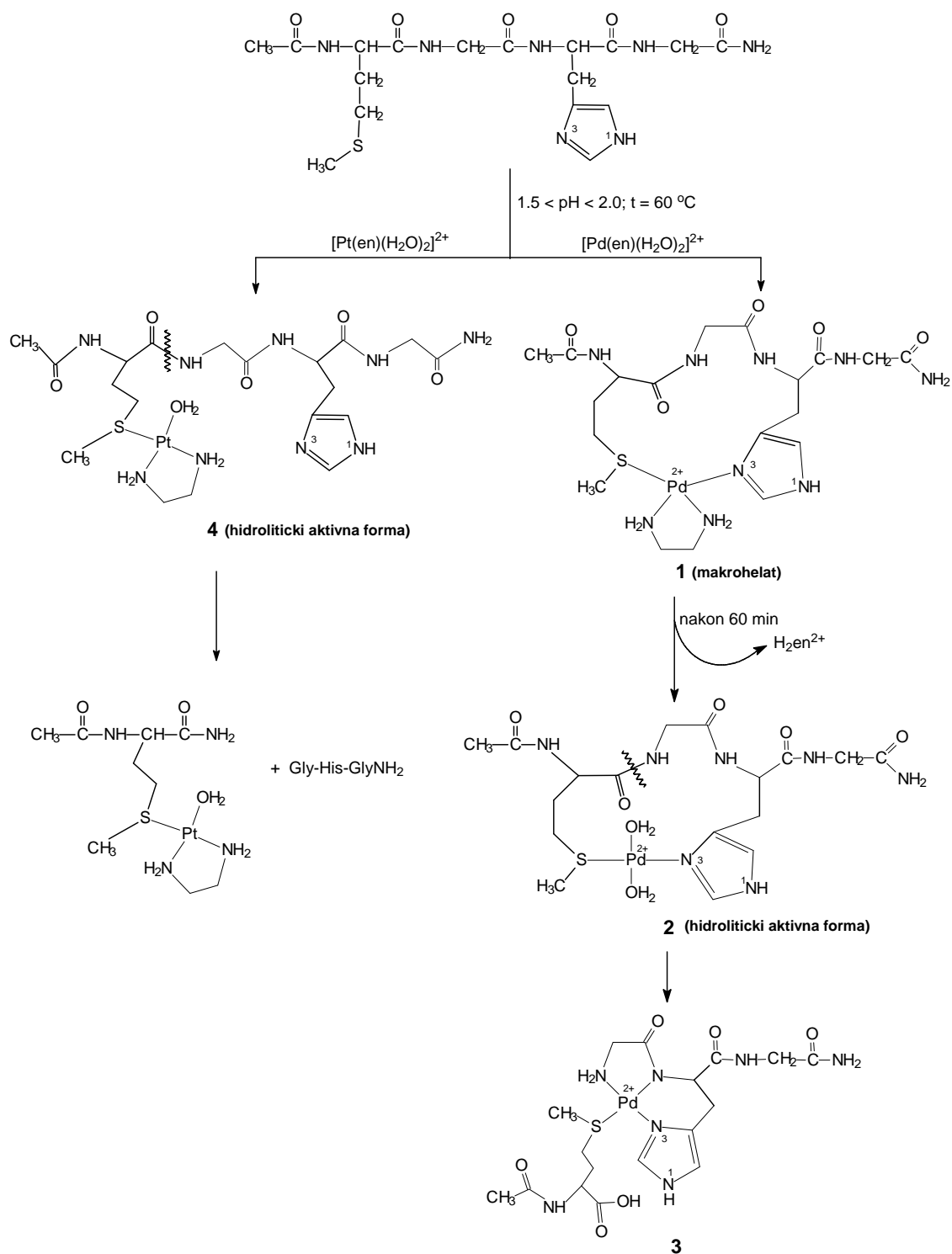
	$\text{MeCO-MetGlyHisGly-NH}_2$	$[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + \text{MeCO-MetGlyHisGly-NH}_2$
$[\text{HL}]^+$	6,50(1)	
$[\text{ML}]^{2+}$		9,54(4)
$[\text{MH}_1\text{L}]^+$		1,34(5)
pK(пептидне везе) ($\text{ML} \rightarrow \text{MH}_1\text{L}$)		8,20

Хидролиза N-ацетилованог тетрапептида MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ у присуству $[\text{M}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса (M = Pd(II) и Pt(II))

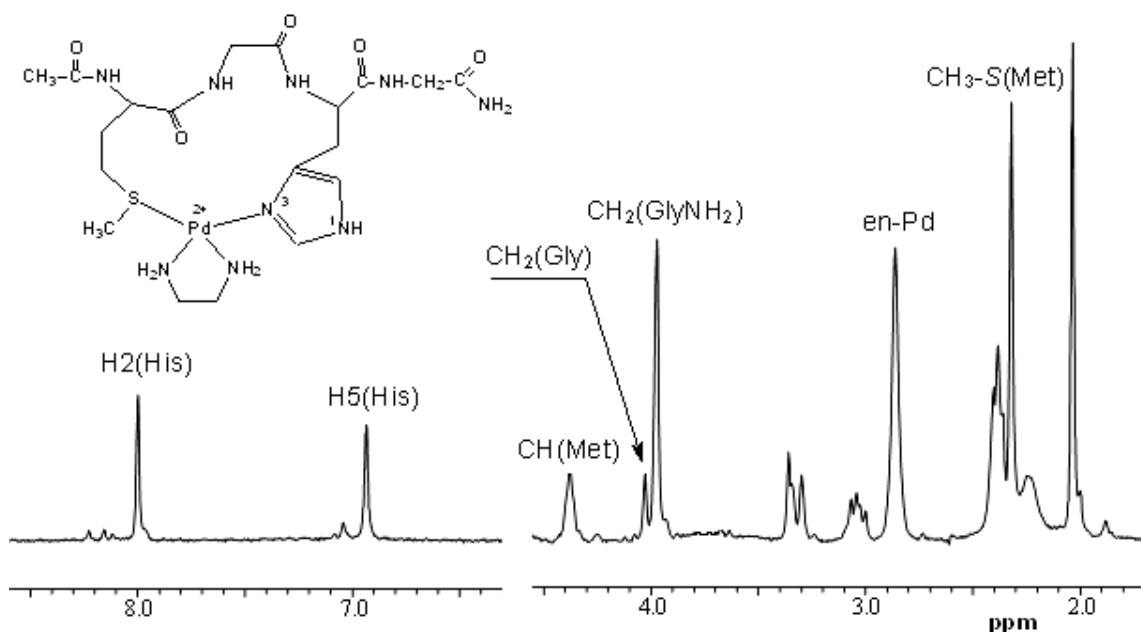
Применом ^1H NMR спектроскопије испитиване су реакције *N*-ацетилованог тетрапептида $\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2$ и $[\text{M}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса (M = Pd(II) и Pt(II)). Реакције између одговарајућег етилендиаминског (en) комплекса и тетрапептида су извођене директно у NMR кивети, у 1 : 1 молском односу реактаната, на 60 °C и у pH области 1,5 - 2,0. Као што се на слици 40 може видети, у реакцијама $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са $\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2$ тетрапептидом долази до региоселективног раскидања Met-Gly пептидне везе. Међутим, реакциони механизам хидролитичког раскидања ове пептидне везе зависи од употребљеног $[\text{M}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса.

Када се помеша $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекс са $\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2$, под напред наведеним експерименталним условима, након 60 минута реакционог времена настаје макрохелатни паладијум(II)-пептид комплекс (1) (Слика 40). Формирање овог интермедијерног макрохелатног $[\text{Pd}(\text{en})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S,N3})]^{2+}$ комплекса са бидентатно координованим тетрапептидом, преко N3 атома азота имидазоловог прстена и атома сумпора метионина, се може пратити применом ^1H NMR спектроскопије. Интензитети сигнала на 8,62 и 7,29 ppm који потичу од C2H и C5H протона имидазола некоординованог $\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2$ тетрапептида, се смањују током времена, док се у спектру јављају два нова сигнала, на 8,00 и 6,93 ppm, који потичу од истих протона макрохелатног комплекса (1) (Слика 40). На слици 41 приказан је ^1H NMR спектар $[\text{Pd}(\text{en})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S,N3})]^{2+}$ комплекса, док су вредности хемијских померања дате у табели 7.

Такође, координовање $\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2$ преко атома сумпора метионинског остатка за Pd(II) јон може се пратити у ^1H NMR спектру на основу померања сигнала са 2,09 ppm, који одговара метил протонима метионина у некоординованом тетрапептиду на 2,32 ppm. Макрохелатни $[\text{Pd}(\text{en})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S,N3})]^{2+}$ комплекс је нестабилан под датим експерименталним условима и након 60 минута реакционог времена прелази у хидролитички активан $[\text{Pd}(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S,N3})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекс (2) (Слика 40). Елиминација бидентатно координованог en лиганда се може пратити ^1H NMR спектроскопијом. Интензитет синглета на 3,36 ppm који потиче од слободног H_2en^{2+} лиганда расте, док интензитет синглета на 2,86 ppm, који потиче од метиленских протона бидентатно координованог en лиганда, током времена опада. Елиминација етилендиаминa у овој реакцији је потпомогнута *trans*-ефектом координованог атома сумпора и киселом средином раствора ($1,5 < \text{pH} < 2,0$) [127]. Начин координовања тетрапептида у комплексу (2) омогућава да се Pd(II) јон и аква лиганд нађу на оптималном растојању у односу на Met-Gly пептидну везу која подлеже хидролизи. Крајњи производ испитиване реакције је $[\text{Pd}(\text{Gly-His-GlyNH}_2\text{-N,N',N3})(\text{MeCOMet-S})]^+$ комплекс (3). Након 2 сата реакције у ^1H NMR спектру појављују се два нова сигнала на 3,62 и 3,67 ppm. Ови сигнали су приписани метиленским протонима N-терминалног глицина у Gly-His-GlyNH₂ фрагменту, који је тридентатно координован за Pd(II) преко терминалне амино групе глицина, депротонованог атома азота Gly-His пептидне везе и N3 атома азота имидазоловог прстена. У имидазолској области



Слика 40. Шематски приказ реакционих механизма хидролитичких реакција MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ са [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ и [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ комплексима



Слика 41. ^1H NMR спектар макрохелатног $[\text{Pd}(\text{en})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S,N3})]^{2+}$ комплекса који настаје у реакцији између $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2$ у рН области 1,5–2,0

појављују се нови сигнали на 7,96 и 7,03 ppm који одговарају C2H и C5H протонима тридентатно координованог Gly-His-Gly-NH₂ фрагмента у $[\text{Pd}(\text{Gly-His-GlyNH}_2\text{-N,N',N3})(\text{MeCOMet-S})]^+$ комплексу. Хемијска померања одговарајућих протона некоординованог тетрапептида, интермедијерног $[\text{Pd}(\text{en})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S,N3})]^{2+}$ комплекса и хидролитичког производа ($[\text{Pd}(\text{Gly-His-GlyNH}_2\text{-N,N',N3})(\text{MeCOMet-S})]^+$), дата су у табели 7. У одвојеном експерименту у реакцији $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ са трипептидом Gly-His-Gly, под истим експерименталним условима, добијен је $[\text{Pd}(\text{Gly-His-Gly-N,N',N3})\text{Cl}]$ комплекс. Додатком овог комплекса у реакциону смешу, долази до повећања интензитета сигнала на 3,62 и 3,67 ppm, као и сигнала на 7,96 и 7,03 ppm, што указује да је у комплексу (3) (Слика 40) хидролитички фрагмент Gly-His-GlyNH₂ тридентатно координован за Pd(II) јон.

У $[\text{Pd}(\text{Gly-His-GlyNH}_2\text{-N,N',N3})(\text{MeCOMet-S})]^+$ комплексу (3) MeCOMet фрагмент је преко атома сумпора метионина монодентатно координован и није примећена значајна разлика у хемијском померању метил протона метионина за комплекс (2) и (3) (Слика 40). У комплексу (3), сигнал на 4,24 ppm одговара метинским протонима из метионинског остатка, док ови протони у комплексу (1) и

Табела 7. ^1H NMR хемијска померања за Pd(II)-пептид комплексе који настају у реакцији $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ у рН области од 1,5 до 2,0

Пептид/Хидролитички активна форма/ Хидролитички производ	Хемијска померања (δ , ppm)					
	C2H	C5H	CH ₂ (Gly)	CH ₂ (GlyNH ₂)	CH(Met)	CH ₃ -S(Met)
MeCOMet-Gly-His-GlyNH ₂	8,62	7,29	4,02	3,97	4,36	2,09
$[\text{Pd}(\text{en})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S},\text{N3})]^{2+}$	8,00	6,93	4,02	3,97	4,36	2,32
$[\text{Pd}(\text{Gly-His-GlyNH}_2\text{-N},\text{N}',\text{N3})(\text{MeCOMet-S})]^+$	7,96	7,03	3,62; 3,67	3,97	4,24	2,37

(2) се налазе на 4,36 ppm (Табела 7). Формирање комплекса (3) је праћено током времена, а концентрација овог комплекса је одређена на основу интеграла сигнала на 4,02 ppm који потиче од метиленских протона глицина у комплексу (1) и сигнала на 3,62 и 3,67 ppm који потичу од истих протона у комплексу (3). Укупна количина хидролизованог MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ тетрапептида је израчуната у односу на концентрацију комплекса (3) и нађено је да више од 90% тетрапептида хидролизује након 24 сата. Ранија истраживања су показала да у реакцији антитуморски активног комплекса платине(II), *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], и пентапептида који садрже L-метионин и L-хистидин, MeCOMet-Gly-His-Gly-Gly-OH, MeCOMet-Gly-Gly-His-Gly-OH и MeCOGly-Met-Gly-His-Gly-OH, долази до региоселективног раскидања Met-Gly пептидне везе [67]. У овим реакцијама хидролитички активне врсте су такође, макрохелатни Pt(II)-пентапептид комплекси у којима су пептиди координовани преко атома сумпора метионинског остатка и N1 или N3 атома имидазола.

У реакцији $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ тетрапептидом, у рН области $1,5 < \text{pH} < 2,0$ и на 60 °C, након 2 сата реакционог времена у раствору је присутан само $[\text{Pt}(\text{en})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ комплекс (4) (Слика 40). У овом комплексу тетрапептид је монодентатно координован за Pt(II) јон, преко атома сумпора метионина. Бидентатно координовани етилендиамин представља стабилни део молекула и остаје координован за Pt(II) јон током реакције. Комплекс $[\text{Pt}(\text{en})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ са координованим молекулом воде је хидролитички активан, а у испитиваној реакцији долази до региоселективног раскидања Met-Gly пептидне везе.

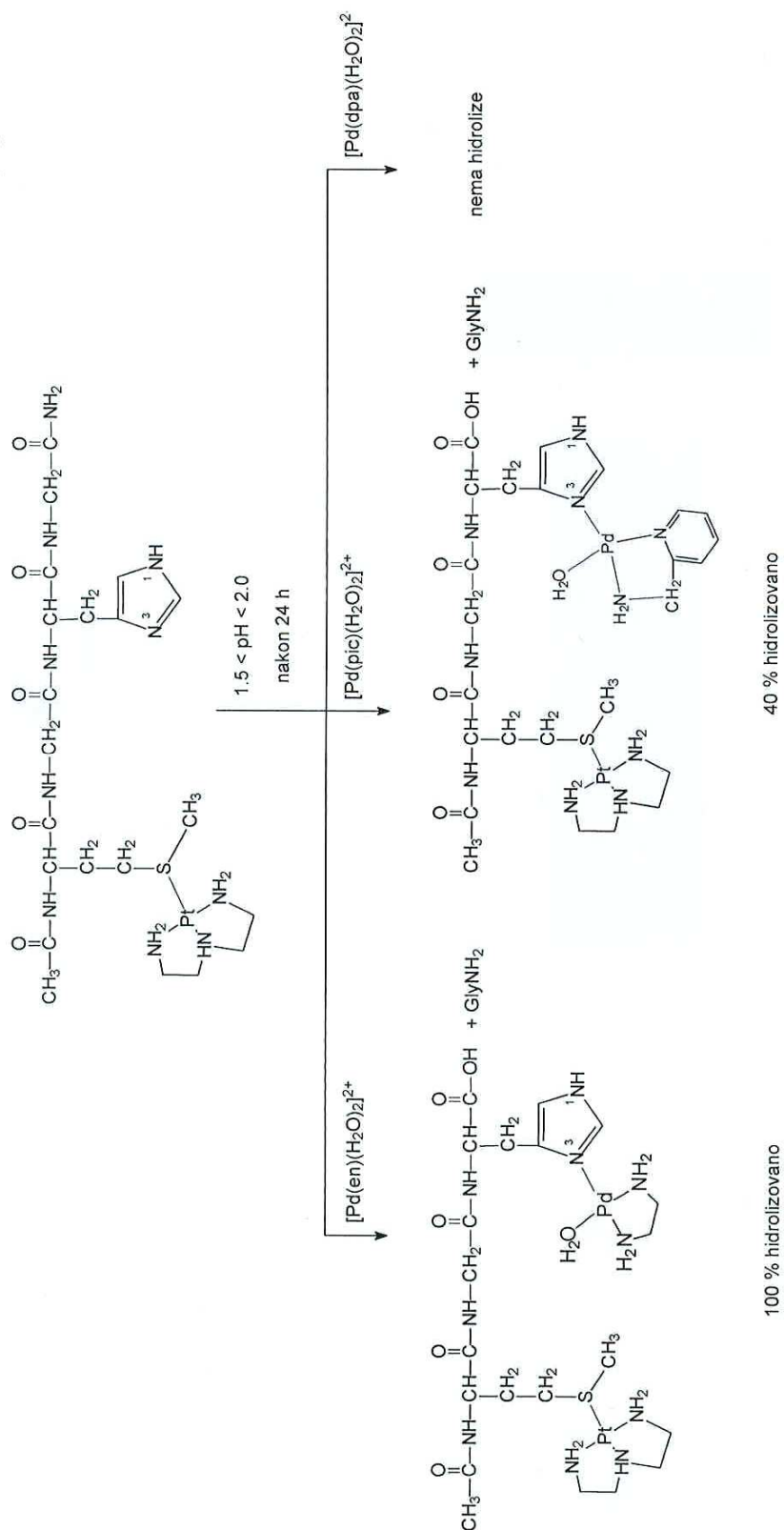
У ^1H NMR спектру могу се уочити два хидролитичка производа ове реакције, трипептид Gly-His-GlyNH₂ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{MeCOMet-S})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ комплекс (Слика 40). Интензитет сигнала на 3,94 ppm, који потиче од метиленских протона глицина (глицин у суседству метионина) у комплексу (4) се смањује током времена, док се интензитет сигнала на 3,83 ppm слободног Gly-His-GlyNH₂ временом повећава. Додатком Gly-His-GlyNH₂ трипептида у реакциону смешу долази до повећања интензитета сигнала на 3,83 ppm, што потврђује да овај сигнал потиче од метиленских протона *N*-терминалног глицина у Gly-His-GlyNH₂ трипептиду. Процент хидролизе Met-Gly пептидне везе одређен је из односа интеграла сигнала глицинских протона слободног Gly-His-GlyNH₂ пептида и интеграла ових сигнала који одговарају почетној концентрацији MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂. Каталитичка способност $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса у испитиваној реакцији је одређена израчунавањем процента хидролизованог MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ у току времена, под истим експерименталним условима. Концентрација слободног и хидролизованог тетрапептида је одређивана сваких 30 минута и реакција је праћена 24 сата. Нађено је да 85% Met-Gly пептидне везе у MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ тетрапептиду хидролизује након 24 сата на 60 °C.

Хидролиза $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ у присуству $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса

На основу претходно описаних резултата, може се закључити да се MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ тетрапептид у реакцијама са $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексима (где је L бидентатно координовани етилендиамин, en; 2-пиколиламин, pic или 2,2'-дипиридиламин, dpa) бидентатно координује за Pd(II) јон, преко тиоетарског атома сумпора и N3 атома азота имидазоловог прстена. Настали макрохелатни $[\text{Pd}(\text{L})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S,N3})]^{2+}$ комплекс, након елиминације бидентатно координованог диаминског лиганда, прелази у хидролитички активни комплекс у коме долази до хидролизе Met-Gly пептидне везе. Да би се спречила реакција грађења макрохелатног комплекса и хидролиза Met-Gly пептидне везе, у овом раду испитивани тетрапептид је у првој фази реагован са еквимоларном количином $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ комплекса (dien је тридентатно координовани диетилентриамин). Формирање $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ комплекса се може пратити применом ^1H NMR спектроскопије. Интензитет сигнала на 2,09 ppm, који потиче од S-метил протона метионинског остатка слободног MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂, се

смањује у току времена, док се интензитет сигнала на 2,55 ppm одговарајућих S-метил протона тетрапептида координаног за Pt(II) преко атома сумпора временом повећава. Главни производ ове реакције, након 2 сата реакционог времена, је $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ комплекс у приносу од 95%. У другој фази реакције, раствору који садржи $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ комплекс додата је еквимоларна количина одговарајућег $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса (Слика 42). Све реакције су извођене на 60 °C у pH области 1,5 - 2,0. Када се еквимоларна количина $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса дода раствору који садржи $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$, под наведеним експерименталним условима, долази до формирања пет Pd(II)/Pt(II)-пептид комплекса (Слика 43). Ови комплекси су окарактерисани на основу хемијских померања за C2H и C5H протоне имидазоловог прстена. Такође, резултати ранијих испитивања реакција $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса и MeCOHis-Gly дипептида [54,83-85,115], као и новија испитивања реакција *trans*- $[\text{Pd}(\text{DEA})_2\text{Cl}_2]$ и *trans*- $[\text{Pd}(\text{DEA})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (DEA је диетаноламин) са истим пептидом [116], показују да на pH < 3,0 настаје пет различитих паладијум(II)-пептид комплекса. Ови комплекси су означени од **A** до **E**, па је исто означавање коришћено и за Pd(II)/Pt(II)-тетрапептид комплексе који настају у нашим испитиваним реакцијама (Слика 43; Табела 8). Два главна Pd(II)/Pt(II)-тетрапептид производа су изомери код којих је тетрапептид монодентатно преко N3, или N1, атома азота имидазоловог прстена координан за Pd(II), комплекси **A** и **B**.

У комплексу **D** тетрапептид је бидентатно координан за Pd(II) јон, док је у комплексима **C** и **E** имидазолов прстен тетрапептида мостни лиганд између две Pd(II) комплексне јединице (види Слику 43). Ови начини координовања потврђени су на основу реакција $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ са MeCOHis-Gly у коме је селективно метилован N1, или N3, атом азота из имидазоловог прстена. Утврђено је да у реакцији паладијум(II) комплекса са N1 метилованим дериватом дипептида настаје комплекс **A** (Слика 43), који је хидролитички активан и доводи до раскидања пептидне везе која укључује карбоксилну групу хистидина, док преостала четири комплекса нису хидролитички активни [84]. Такође, експерименти са различитим пептидима који садрже L-хистидин и различитим Pd(II) комплексима показују да само монодентатна координација преко N3 атома азота имидазола за Pd(II) јон



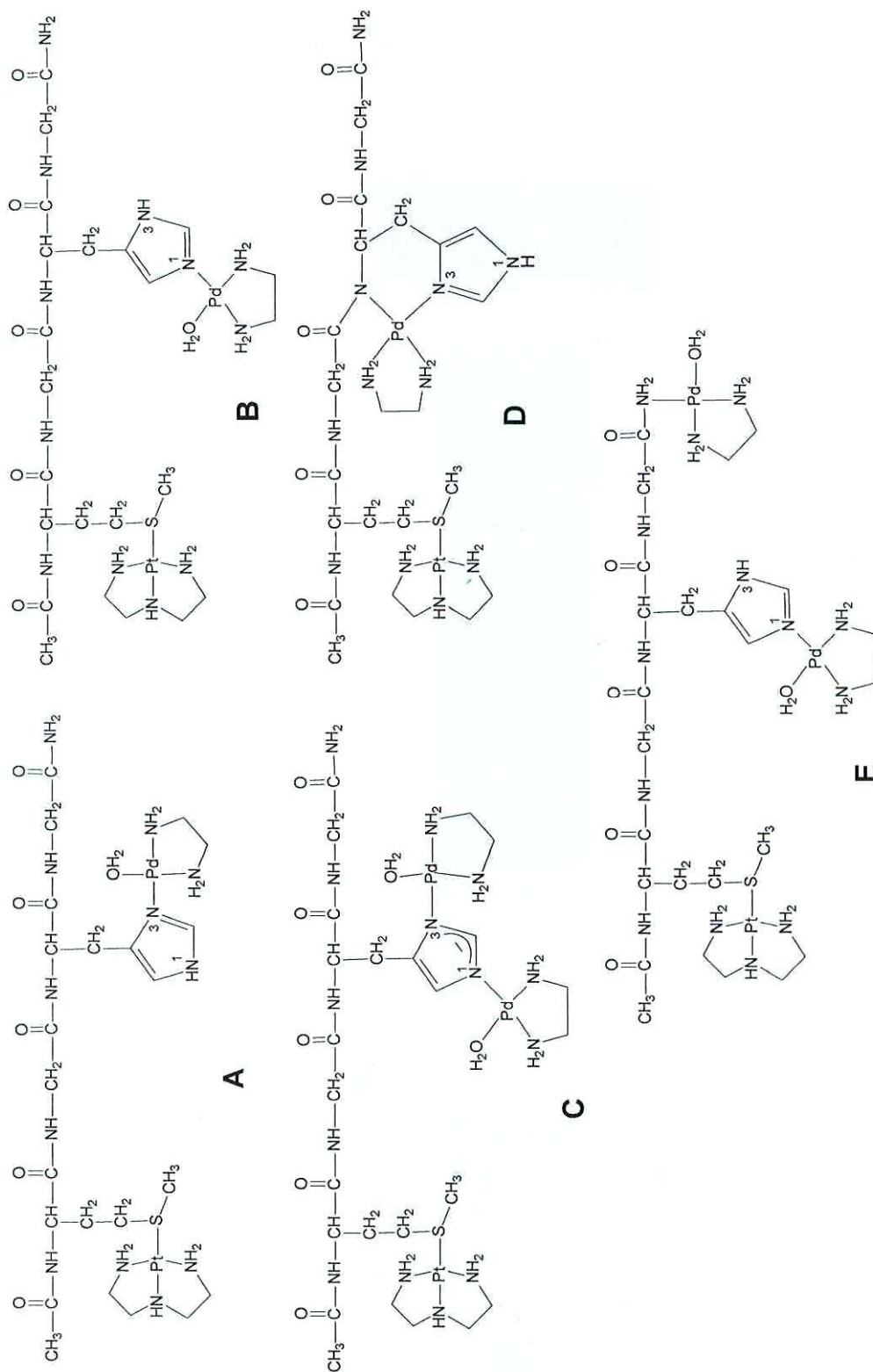
Слика 42. Шематски приказ реакција [Pt(dien)(MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂-S)]²⁺ са комплексима [Pd(L)(H₂O)₂]²⁺-типа, где је L = en, pic или dpa

доводи до хидролитичког раскидања пептидне везе, која укључује карбоксилну групу хистидина [54,83-85,115,116,118]. Овај начин координовања омогућава интеракцију Pd(II) јона и његовог аква лиганда са пептидном везом, и на тај начин катализује њену хидролизу. Хемијска померања C2H и C5H протона имидазоловог прстена Pd(II)/Pt(II)-тетрапептид комплекса, који настају у реакцији $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ са $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$, су поређена са одговарајућим хемијским померањима добијеним у реакцији $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и MeCOHis-Gly дипептида [54,83,84], под истим експерименталним условима (Табела 8). Закључено је да су комплекси добијени у испитиваној реакцији (Слика 43) идентични са комплексима који настају у реакцији MeCOHis-Gly дипептида и $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса. Нађено је да у реакцији $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ са $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ не долази до елиминације етилендиаминског лиганда. Поред тога, на основу $^1\text{H NMR}$ испитивања, може се закључити да долази до хидролизе само His-GlyNH₂ пептидне

Табела 8. $^1\text{H NMR}$ хемијска померања Pd(II)/Pt(II)-пептид комплекса који настају у реакцији комплекса типа $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$

Реактанти	Тип Pd(II)/Pt(II)-пептид комплекса	δ (^1H)	
		C2H	C5H
$[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + \text{MeCOHis-Gly}^a$	A	8,14	7,12
	B	7,88	6,89
	C	7,66	6,60
	D	8,04	7,10
	E	7,74	6,67
$[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + [\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$	A	8,14	7,10
	B	7,88	6,89
	C	7,62	6,63
	D	8,05	7,01
	E	7,73	6,78
$[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + [\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$	A	<i>b</i>	7,15
	B	<i>b</i>	6,89
$[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + [\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$	A	<i>b</i>	7,04
	B	7,87	6,84

^aРеф. [54,83]; ^bСигнал C2H протона се преклапа са протонима пиридина



Слика 43. Палладијум(II)/платина(II)-тетрапептид комплекси који настају у реакцији између $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ и $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса у рН области 1,5 – 2,0 и на 60 °С

везе. Интензитет сигнала на 3,96 ppm, који потиче од метиленских GlyNH₂ протона у MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ тетрапептиду, са временом опада, док интензитет сигнала на 3,86 ppm, који потиче од метиленских протона слободног GlyNH₂ расте. Додатком GlyNH₂ у реакциону смешу долази до повећања интензитета сигнала на 3,86 ppm, што потврђује да овај сигнал потиче од слободног GlyNH₂. Процент хидролизе His-GlyNH₂ пептидне везе одређен је из односа интеграла сигнала глицинских протона слободног GlyNH₂ и интеграла ових сигнала који одговарају почетној концентрацији тетрапептида MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂. Такође, нађено је да извесна количина слободног GlyNH₂ реагује са полазним Pd(II) комплексом, при чему настаје [Pd(en)(GlyNH₂-N,N')]²⁺ комплекс (N' је амидни азот). Постојање овог комплекса у реакционој смеси је потврђено у ¹H NMR спектру на основу сигнала на 3,52 и 3,54 ppm, који одговарају метиленским протонима бидентатно координованог GlyNH₂ за Pd(II) јон. Реакција хидролизе His-GlyNH₂ пептидне везе у MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ тетрапептиду је региоселективна и комплетно је завршена за мање од 24 сата (Слика 42).

У реакцији између [Pd(pic)(H₂O)₂]²⁺ и [Pt(dien)(MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂-S)]²⁺, под истим експерименталним условима, у ¹H NMR спектру се могу уочити само два Pd(II)/Pt(II)-тетрапептид комплекса, означена са **A** и **B**. Означавање ових комплекса је у сагласности са претходним означавањем за реакцију [Pt(dien)(MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂-S)]²⁺ са [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ (Слика 43). Комплекси типа **C**, **D** и **E** приказани на слици 43 не настају у реакцији испитиваног тетрапептида са [Pd(pic)(H₂O)₂]²⁺ комплексом, ни након 3 дана реакционог времена. Нађено је да у овој реакцији долази до хидролизе само His-GlyNH₂ пептидне везе (Слика 42). Процент хидролизе His-GlyNH₂ пептидне везе одређен је из односа интеграла сигнала глицинских протона слободног GlyNH₂ и интеграла ових сигнала који одговарају почетној концентрацији тетрапептида MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂. Нађено је да за време од 24 сата само 40% His-GlyNH₂ пептидне везе у MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ тетрапептиду хидролизује, под наведеним експерименталним условима.

Међутим, у реакцији између [Pt(dien)(MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂-S)]²⁺ и [Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ комплекса, при истим експерименталним условима, не долази до хидролизе ниједне пептидне везе у MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ тетрапептиду, ни након 3 дана реакционог времена (Слика 42). Ово је у складу са нашим ранијим резултатима постигнутим приликом испитивања реакција [Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺

комплекса са MeCOHis-Gly. Објашњење за ово лежи у чињеници да стерни ефекат бидентатно координованог dpa лиганда за Pd(II) јон спречава реакцију хидролизе MeCOHis-Gly пептида у присуству $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса. У сагласности са овим резултатима, на исти начин може се објаснити стерна инхибиција хидролизе His-GlyNH₂ пептидне везе у $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ помоћу $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса.

У закључку испитивања описаних у поглављу под насловом “Испитивање реакција MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ тетрапептида са различитим Pd(II) и Pt(II) комплексима” (види страну 96) може се рећи да су хидролитичке реакције $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ и $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ у рН области 1,5 - 2,0 и на 60 °С строго селективне и при овим условима хидролизује пептидна веза која укључује карбоксилну групу метионина. Хидролиза Met-Gly пептидне везе је примарна у односу на остале пептидне везе у овом тетрапептиду захваљујући великом афинитету Pt(II) и Pd(II) јона према атому сумпора. Реакција MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ и монофункционалног $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ комплекса се показала као добра метода за блокирање тиоетарског атома сумпора и спречавање његове координације за Pd(II) и Pt(II) комплексе. На основу реакција $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ и комплекса типа $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ може се закључити да потпуна стерна инхибиција хидролизе пептидне везе која укључује карбоксилну групу хистидина, може се постићи применом модификованих паладијум(II) комплекса који садрже волуминозне диаминске лиганде.

4.1.2 ИСПИТИВАЊЕ РЕАКЦИЈА КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) СА ПЕПТИДИМА КОЈИ САДРЖЕ L-МЕТИОНИН И L-ХИСТИДИН

Применом ¹H NMR спектроскопије испитивана је селективна интрамолекулска миграција комплекса платине(II) у реакцији између $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})\text{I}]^-$ (Gly-Gly је дипептид глицил-глицин тридентатно координован преко атома азота терминалне аминок групе, депротонованог атома азота пептидне везе и кисеониковог атома карбоксилне групе) и N-ацетилованог L-метионил-L-хистидина (MeCOMet-His) на рН = 7,4 и собној температури. У другом делу овог рада испитиване су реакције хидролизе пептидне везе у N-ацетилованом L-метионил-глицину (MeCOMet-Gly) помоћу различитих $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDSA-O,O}')]^-$ -типа комплекса (L је етилендиамин, en; (±)-trans-1,2-диаминоциклохексан, dach; (±)-1,2-

пропилендиамин, 1,2-рп; CBDSA је анјон 1,1-циклобутандикарбоксилне киселине) при физиолошким условима рН и температуре (рН = 7,4 и 37 °С). Добијени спектроскопски резултати ових испитивања су повезивани са механизмом токсичног деловања антитуморских комплекса платине.

Селективна интрамолекулска миграција комплекса платине(II) у реакцији између [Pt(Gly-Gly-N,N',O)]⁻ и MeCOMet-His

Ранија истраживања су показала да у реакцији [Pt(dien)Cl]⁺ комплекса, где је dien диетилентриамин, са MeCOMet-His долази до селективне интрамолекулске миграције Pt(II) комплекса са атома сумпора метионинског остатка на N1 атом азота имидазола [130]. Нађено је да у првој фази реакције настаје кинетички фаворизован [Pt(dien)(MeCOMet-His-S)]⁺ комплекс, код кога је MeCOMet-His дипептид монодентатно координован преко атома сумпора метионинског остатка. У другој фази реакције долази до интрамолекулске миграције [Pt(dien)]²⁺ комплексног фрагмента са атома сумпора на атом азота имидазоловог прстена, при чему настаје термодинамички стабилнији [Pt(dien)(MeCOMet-His-N)]⁺ комплекс. Миграција је веома спор и строго селективан процес. Претходни резултати су поређени са резултатима добијеним у реакцији [Pt(Gly-Met-S,N,N')Cl] (где је Gly-Met дипептид глицил-L-метионин тридентатно координован преко атома сумпора метионина, депротонованог атома азота пептидне везе и атома азота терминалне амино групе) са дипептидом MeCOMet-His, при чему настаје веома стабилан [Pt(Gly-Met-S,N,N')(MeCOMet-His-S)] комплекс. Нађено је да [Pt(Gly-Met-S,N,N')Cl] реагује спорије са тиоетарским лигандима у односу на [Pt(dien)Cl]⁺ комплекс, при чему се формира стабилнија Pt(II)-S веза (Табела 9) [106,130,131]. Због стерног ефекта тридентатно координованог Gly-Met дипептида у Pt(II) комплексу не долази до миграције [Pt(Gly-Met-S,N,N')]⁺ комплекса са тиоетарског атома сумпора на атоме азота (N1 или N3) из имидазоловог прстена [130].

У овом раду монофункционални [Pt(Gly-Gly-N,N',O)]⁻ комплекс и MeCOMet-His дипептид су реаговани у 1 : 1 молском односу, у 50 mM фосфатном пуферу на рН 7,4 и на 25 °С. Терминална амино група у Met-His дипептиду је ацетилована да би се спречило њено координовање за Pt(II) јон. Шематски приказ испитиване реакције дат је на слици 44. Формирање производа у овој реакцији праћено је применом ¹H NMR спектроскопије на основу хемијских померања сигнала за C2H и C5H протоне

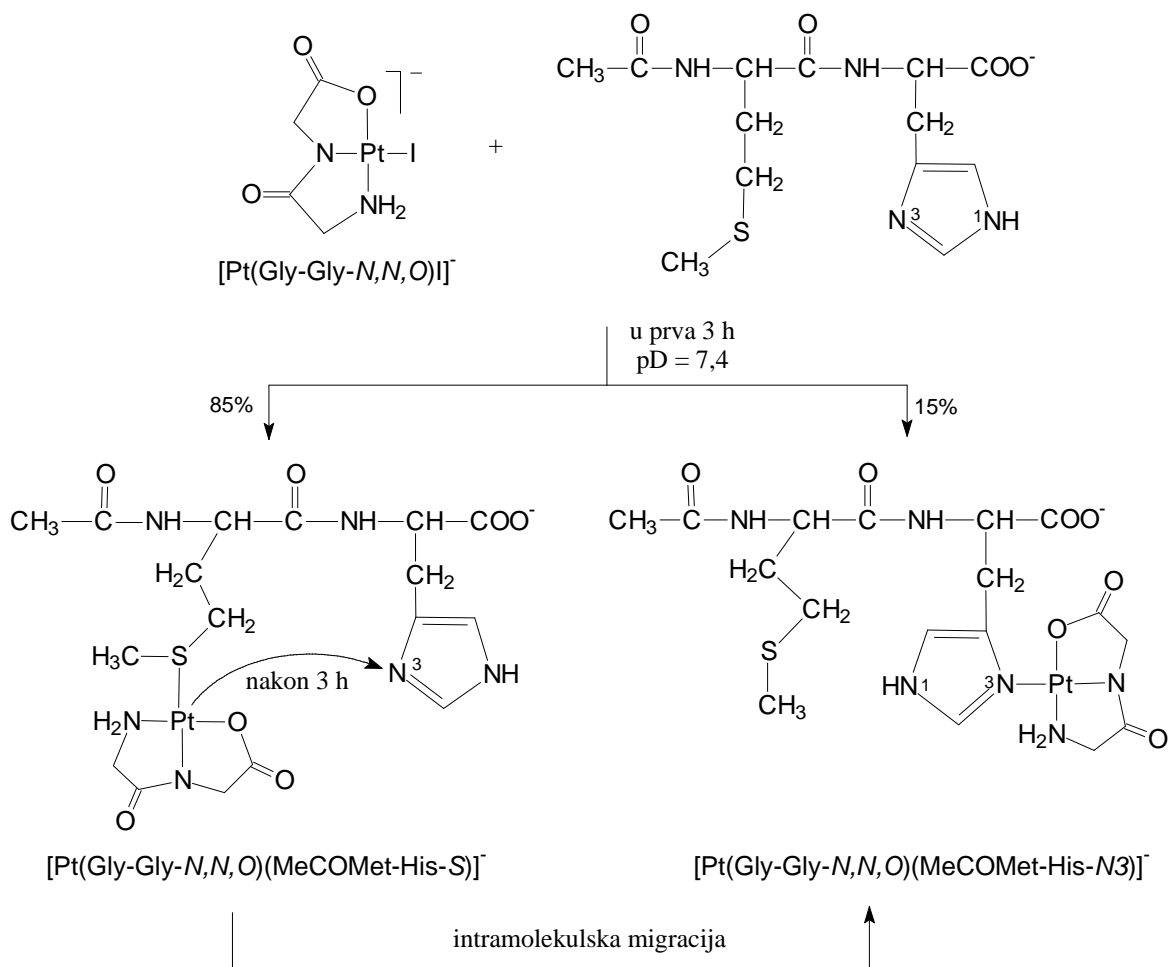
имидазоловог прстена хистидинског остатка и хемијског померања сигнала за метил протоне метионинског остатка. Комплекс $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-}N,N',O)]^-$ је стабилан, под наведеним експерименталним условима, и елиминација тридентатно координованог Gly-Gly лиганда се може уочити тек након 34 дана. Елиминација овог лиганда се може пратити у ^1H NMR спектру на основу два нова сигнала на 3,82 и 3,86 ppm, који потичу од метил протона слободног Gly-Gly дипептида. Додатком Gly-Gly у реакциону смешу долази до повећања интензитета ова два сигнала, чиме је потврђено да потичу од слободног дипептида.

Табела 9. Константе брзине k_2 за реакције Pt(II) комплекса са тиоетарским лигандима на 25 °C

Реактанти [комплекс + лиганд]	pD вредност	$10^3 k_2 /$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Реф.
$[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+ + \text{L-метионин}$	4,31	14	[131]
$[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+ + \text{S-метилглутатион}$	5,41	33	[106]
$[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+ + \text{MeCOMet-His}$	4,40	44	[130]
$[\text{Pt}(\text{Gly-Met-S},N,N)\text{Cl}] + \text{L-метионин}$	4,31	4,5	[130]
$[\text{Pt}(\text{Gly-Met-S},N,N)\text{I}] + \text{S-метилглутатион}$	4,34	0,3	[a]
$[\text{Pt}(\text{Gly-Met-S},N,N)\text{I}] + \text{MeCOMet-His}$	4,40	8	[a]
$[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-}N,N',O)]^- + \text{S-метилглутатион}$	4,21	40	[a]
$[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-}N,N',O)]^- + \text{MeCOMet-His}$	4,11	70	[a]

[a] Резултати из ове дисертације публиковани у раду М. D. Živković, S. Rajković, M. I. Djuran, *Bioorganic Chemistry*, **36(3)** (2008) 161-164.

Када се реакција $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-}N,N',O)]^-$ комплекса са MeCOMet-His изводи на нижим рН вредностима ($2,0 \leq \text{pH} \leq 4,0$) елиминација Gly-Gly из Pt(II) комплекса је веома брз процес и његова супституција са MeCOMet-His дипептидом је скоро потпуна за 60 минута. Као што се са слике 44 може видети, након прва 3 сата реакције, настају два Pt(II)-пептид комплекса. Главни производ у овој реакцији, који настаје у приносу од 85%, је $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-}N,N',O)(\text{MeCOMet-His-S})]^-$ комплекс, у коме је пептид монодентатно координован преко атома сумпора метионинског остатка. Формирање $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-}N,N',O)(\text{MeCOMet-His-S})]^-$ комплекса се може пратити у ^1H NMR спектру на основу смањења интензитета синглета на 2,09 ppm, који потиче од $\text{CH}_3\text{-S-}$ протона слободног MeCOMet-His дипептида и повећањем интензитета



Слика 44. Шематски приказ реакције $[Pt(Gly-Gly-N,N',O)]^-$ комплекса са MeCOMet-His дипептидом

сигнала на 2,55 и 2,57 ppm, који одговарају CH_3-S - протонима пептида координованог преко атома сумпора за Pt(II) јон. Други производ реакције, у приносу од 15%, је $[Pt(Gly-Gly-N,N',O)(MeCOMet-His-N3)]^-$ комплекс, код кога је дипептид монодентатно координован преко N3 атома азота имидазоловог прстена хистидинског остатка. Овај комплекс је окарактерисан на основу хемијских померања сигнала за C2H и C5H протоне имидазоловог прстена. Монодентатна координација MeCOMet-His дипептида, преко N3 атома азота имидазоловог прстена, у овом комплексу помера сигнале C2H и C5H протона са 7,21 (за C5H) и 8,44 ppm (за C2H) на 7,11 (за C5H) и 8,05 ppm (за C2H). Ова хемијска померања су у сагласности са одговарајућим за N3-изомер добијен у реакцијама између различитих Pt(II) комплекса са хистидином и пептидима који садрже хистидин (Табела 10) [59,130].

Утврђено је да у реакцији $[Pt(dien)Cl]^+$ комплекса са MeCOMet-His дипептидом, монодентатна координација Pt(II) комплекса за N1 атом азота

имидазоловог прстена помера сигнале C2H и C5H протона на 7,88 и 6,85 ppm у односу на ове сигнале за слободан пептид (Табела 10) [130]. У реакцији [Pt(Gly-Gly-N,N',O)]⁻ комплекса са претходно наведеним дипептидом ови сигнали се нису појавили у ¹H NMR спектру, ни након 40 дана, на основу чега је закључено да се дипептид не координује за Pt(II) преко N1 атома азота имидазоловог прстена хистидинског остатка. Након 3 сата реакционог времена долази до веома споре миграције [Pt(Gly-Gly-N,N',O)] комплекса са тиоетарског атома сумпора на N3 атом азота имидазоловог прстена. Ова миграција се може пратити у ¹H NMR спектру на основу повећања интензитета сигнала на 2,09 ppm који одговара S-метил протонима слободне метил групе MeCOMet-His пептида и смањења интензитета сигнала на 2,55 и 2,57 ppm који потичу од S-метил протона метионинског остатка координованог за Pt(II) јон. Истовремено са променом интензитета ових сигнала долази до повећања интензитета сигнала на 8,05 и 7,11 ppm за C2H и C5H протоне имидазоловог прстена, који одговарају [Pt(Gly-Gly-N,N',O)(MeCOMet-His-N3)]⁻ комплексу. Ове промене у спектру су последица раскидања Pt(II)-S везе у [Pt(Gly-Gly-N,N',O)(MeCOMet-His-S)]⁻ комплексу и миграције [Pt(Gly-Gly-N,N',O)] на N3 атом имидазоловог прстена (Слика 44).

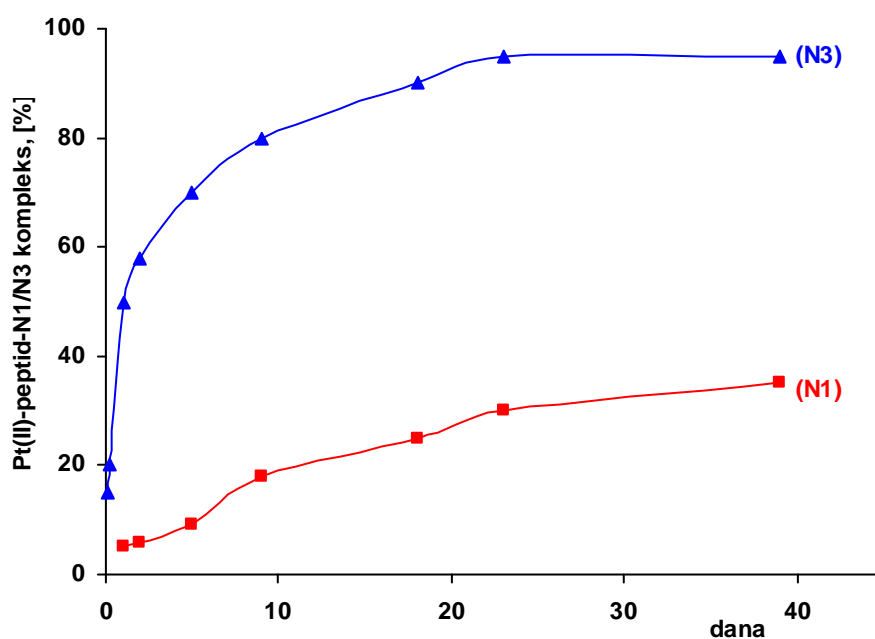
Табела 10. ¹H NMR хемијска померања C2H и C5H протона имидазоловог прстена за различите комплексе платине(II) који настају у реакцијама Pt(II) са хистидином и пептидима који садрже хистидин

Пептид/комплекс	pD	Хемијска померања (δ, ppm)	
		C2H	C5H
MeCO-Met-His	7,4	8,29	7,15
[Pt(dien)(MeCOMet-His-N3)] ^{+(a)}	7,4	8,00	7,12
[Pt(dien)(MeCOMet-His-N1)] ^{+(a)}	7,4	7,88	6,85
[Pt(Gly-Met-S,N,N')(MeCOMet-His-N3)] ^{2+(a)}	6,8	8,04	7,16
[Pt(dien)(HisH ₂ -N3)] ^{2+(b)}	6,8	8,04	7,25
[Pt(dien)(HisH ₂ -N1)] ^{2+(b)}	6,8	7,92	6,94
[Pt(Gly-Gly-N,N',O)(MeCOMet-His-N3)] ^{-(c)}	7,4	8,05	7,07

^(a)Реф. [130]; ^(b)Реф. [59]; ^(c)Резултати из ове дисертације публиковани у раду М. Д.

Živković, S. Rajković, M. I. Djuran, *Bioorganic Chemistry*, **36(3)** (2008) 161-164.

Из односа интеграла сигнала C2H и C5H протона слободног имидазола и сигнала ових протона MeCOMet-His дипептида, координованог преко N3 атома азота имидазоловог прстена за платину(II), израчунат је проценат награђеног $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})(\text{MeCOMet-His-N3})]^-$ комплекса, и након 10 дана реакције нађено је да овај комплекс настаје у приносу од 80% (Слика 45). Као што се са слике 45 може видети, реакција интрамолекуларске миграције Pt(II) комплекса са атома сумпора из метионинског остатка на N3 атом азота имидазоловог прстена је знатно бржа, у поређењу са реакцијом миграције у случају $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ комплекса и MeCOMet-His дипептида [130]. Реакција интрамолекуларске миграције је строго селективна и након 30 дана у раствору је присутан само $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})(\text{MeCOMet-His-N3})]^-$ комплекс, док у реакцији $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ комплекса са MeCOMet-His, за исти временски период, настаје мање од 40% $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-His-N1})]^+$ комплекса.



Слика 45. Временска зависност формирања Pt(II)-пептид-N1/N3 комплекса у реакцији интрамолекуларске миграције Pt(II) комплекса са атома сумпора метионинског остатка на N1 ($[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ (■)) или N3 ($[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})\text{I}]^-$ (▲)) атом азота имидазоловог прстена у реакцији $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ и $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})\text{I}]^-$ са MeCOMet-His дипептидом

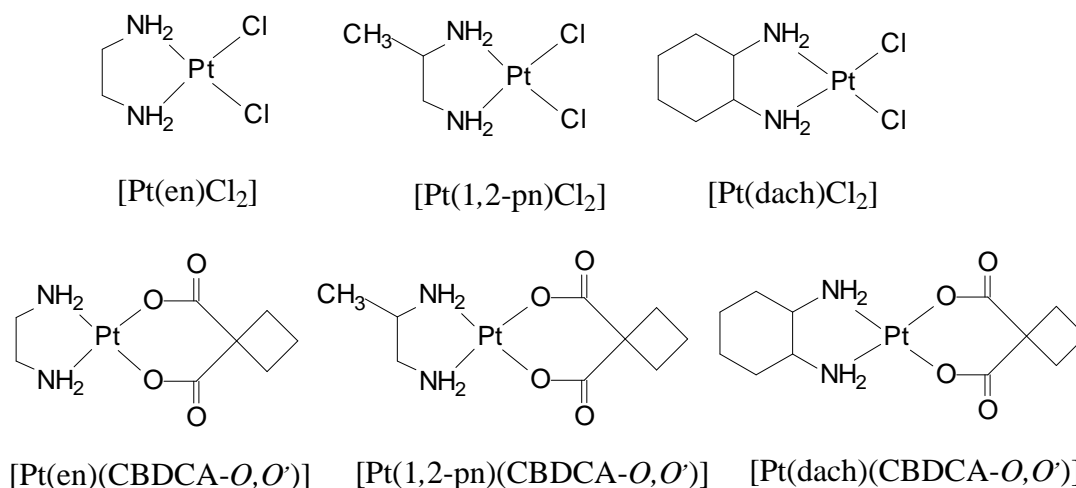
На основу добијених резултата у овом раду, као и раније објављених резултата [130-133], може се закључити да се реакција интрамолекуларске миграције Pt(II) комплекса са сумпора тиоетарског лиганда на атом азота имидазолског прстена хистидина може одвијати при физиолошким условима. У реакцијама $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ са MeCOMet-His и $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ са His-Met, His-Gly-Met и MeCOHis-Ala-Ala-Ala-MetNHPh пептидима долази до интрамолекуларске миграције $[\text{Pt}(\text{dien})]^{2+}$ комплекса, са тиоетарског атома сумпора из метионина на N1 атом азота имидазолског прстена [130-133]. У овим реакцијама интрамолекуларска миграција Pt(II) комплекса са сумпора метионинског остатка на N1 атом азота имидазолског прстена је спора и не одвија се у потпуности.

Међутим, у реакцији $[\text{Pt}(\text{Gly-Met-S,N,N}')\text{Cl}]$ комплекса и дипептида MeCOMet-His не долази до миграције Pt(II) комплекса. То је објашњено чињеницом да овај комплекс реагује са атомом сумпора метионина пет пута спорије у односу на $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ комплекс, формирајући на тај начин веома стабилну платина(II)-сумпор везу [130]. Наша истраживања су показала да $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})\text{I}]^-$ комплекс у поређењу са $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ комплексом реагује приближно два пута брже са атомом сумпора метионинског остатка дипептида MeCOMet-His (Табела 9). Реакција $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})\text{I}]^-$ комплекса је кинетички фаворизирана при чему настаје Pt(II)-S веза, која је термодинамички мање стабилна у односу на одговарајућу везу насталу у реакцији $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ са MeCOMet-His. Платина(II)-S веза лако може бити раскинута у присуству јаког нуклеофила (као на пример: тиоуреа, диетилдитиокарбамат, глутатион, биотин) при физиолошким условима. У реакцији $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})\text{I}]^-$ комплекса са MeCOMet-His долази до строго селективне интрамолекуларске миграције Pt(II) комплекса са атома сумпора метионинског остатка на N3 атом азота имидазолског прстена. У поређењу са реакцијом интрамолекуларске миграције $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ комплекса [130], испитивана реакција $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})\text{I}]^-$ комплекса са MeCOMet-His дипептидом је знатно бржа при чему долази до скоро потпуне координације N3 атома азота хистидинског остатка за Pt(II) комплекс (Слика 44). Вредности константе брзине реакција различитих комплекса платине(II) са лигандима који садрже сумпор доносни атом дате су у табели 9. На основу ових података може се закључити да испитивани комплекс $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})\text{I}]^-$ реагује знатно брже са сумпор-донорским лигандима у односу на друге Pt(II) комплексе приказане у табели 9. Поред тога, интрамолекуларска миграција овог комплекса са

атома сумпора на N3 атом азота у MeCOMet-His је знатно бржа у односу на миграцију $[Pt(dien)Cl]^+$ комплекса. Бржој реакцији миграције $[Pt(Gly-Gly-N,N',O)]$ комплекса доприноси *trans*-ефекат депротонованог пептидног азота координованог Gly-Gly дипептида, који слаби Pt-S везу. Поред тога, бржа реакција миграције овог комплекса потпомогнута је електронегативним кисеониковим атомом у $[Pt(Gly-Gly-N,N',O)(MeCOMet-His-S)]^-$ комплексу који додатно поларизује Pt-S везу (Слика 44).

Испитивање реакција хидролизе пептидне везе у MeCOMet-Gly помоћу различитих $[Pt(L)Cl_2]$ и $[Pt(L)(CBDCA-O,O')]$ комплекса

Реакције различитих платина(II) комплекса типа $[Pt(L)Cl_2]$ и $[Pt(L)(CBDCA-O,O')]$ (L је етилендиамин, en; (\pm)-*trans*-1,2-диаминоциклохексан, dach; (\pm)-1,2-пропилендиамин, 1,2-pn; CBDCA је анјон 1,1-циклобутандикарбоксилне киселине) и дипептида MeCOMet-Gly су изучаване помоћу 1H NMR спектроскопије. Све реакције су извођене у 1 : 1 молском односу одговарајућег Pt(II) комплекса и дипептида, у фосфатном пуферу при pH вредности 7,4 и на 37 °C. Структурне формуле испитиваних Pt(II) комплекса приказане су на слици 46. У овим комплексима бидентатно координовани диамински лиганд (L) не подлеже реакцијама супституције и за очекивати је да остаје координован за Pt(II) јон током



Слика 46. Структурне формуле Pt(II) комплекса који су коришћени као хидролитички агенси у реакцијама са MeCOMet-Gly

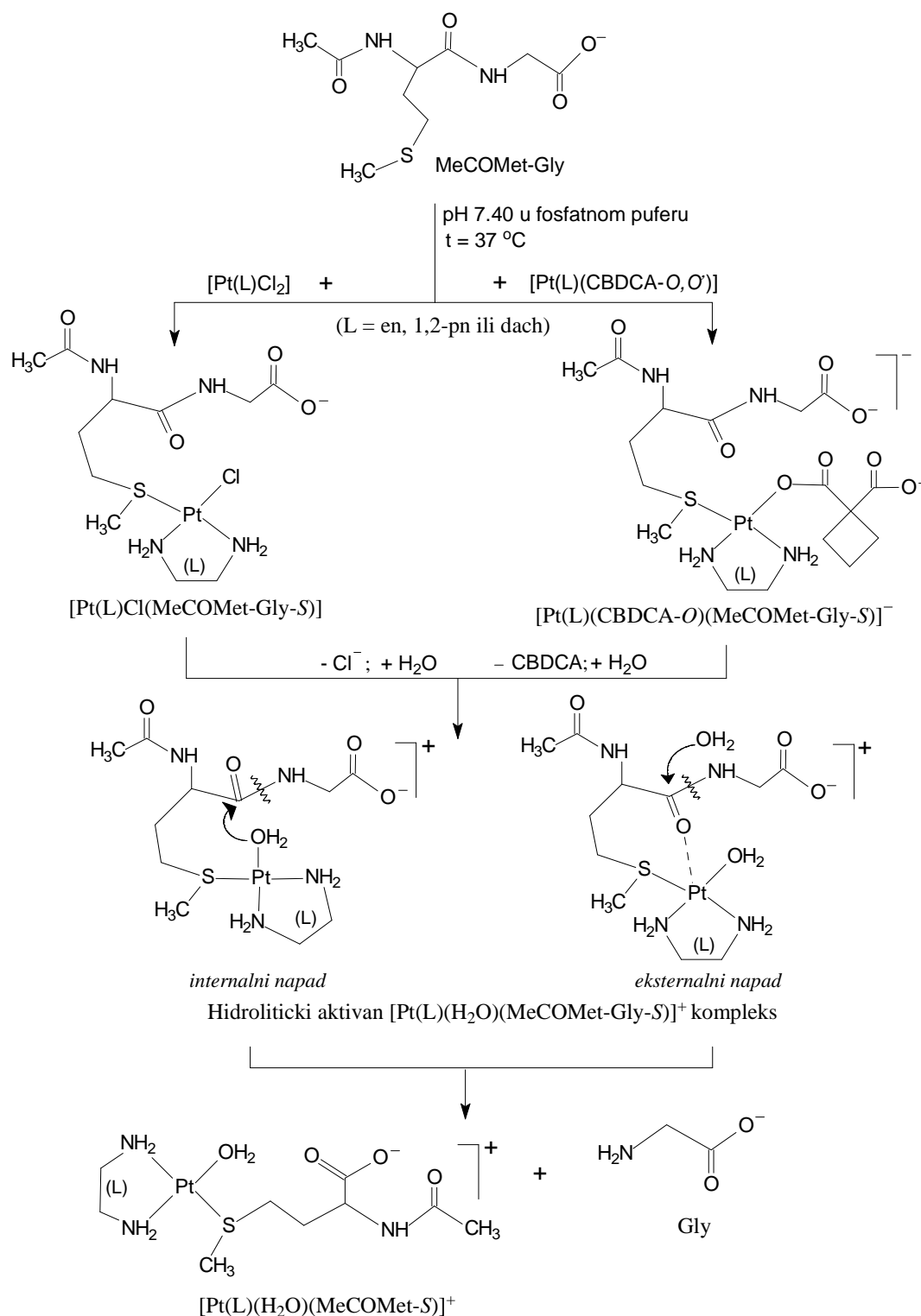
реакционог времена. Нађено је да у свим испитиваним реакцијама долази до селективне хидролизе Met-Gly пептидне везе у MeCOMet-Gly дипептиду. У овом раду испитиван је утицај Cl⁻ и CBDCA²⁻ лиганда, као и стерни утицај бидентатно координованог диаминског лиганда (L), на механизам и брзину хидролизе MeCOMet-Gly дипептида. Добијени резултати ових испитивања су повезивани са механизмом токсичног деловања антитуморских Pt(II) комплекса.

Шематски приказ хидролитичких реакција комплекса типа [Pt(L)Cl₂] и [Pt(L)(CBDCA-O,O')] са MeCOMet-Gly дипептидом дат је на слици 47. Када се одговарајући Pt(II) комплекс и MeCOMet-Gly дипептид помешају у 1 : 1 молском односу, под наведеним експерименталним условима, главни производ окарактерисан у раствору након 4 сата реакционог времена је интермедијерни Pt(II)-пептид комплекси [Pt(L)(MeCOMet-Gly-S)Cl] (за реакције са [Pt(L)Cl₂]) и [Pt(L)(CBDCA-O)(MeCOMet-Gly-S)]⁻ (за реакције са [Pt(L)(CBDCA-O,O')]). Формирање ових интермедијерних производа је брз процес и може се пратити у ¹H NMR спектру на основу смањења интензитета сигнала на 2,11 ppm који потиче од S-метил протона некоординованог MeCOMet-Gly дипептида и повећања интензитета сигнала на 2,39 - 2,56 ppm, који одговара S-метил протонима дипептида координованог за Pt(II) јон преко атома сумпора метионинског остатка. Хемијска померања ових сигнала зависе од типа Pt(II) комплекса који је употребљен у испитиваним реакцијама. Такође, формирање интермедијерног [Pt(L)(CBDCA-O)(MeCOMet-Gly-S)]⁻ комплекса се може пратити у ¹H NMR спектру на основу смањења интензитета сигнала (триплета) на 2,87 ppm за H_α и H_β метиленске протоне бидентатно координованог CBDCA лиганда у [Pt(L)(CBDCA-O,O')] комплексу и пораста интензитета новог сигнала (мултиплет) на 2,32 ppm, који одговара овим протонима за CBDCA лиганд монодентатно координован за Pt(II) јон. Мултиплети који потичу од H_γ метиленских протона, бидентатно и монодентатно координованог CBDCA лиганда, се преклапају и промене у њиховом интензитету није могуће квантификовати у току реакције. Такође, раније је нађено да у реакцијама између различитих аминокиселина, које у структури садрже атом сумпора, и [Pt(CBDCA-O,O')(NH₃)₂] комплекса (карбоплатина) долази до монодентатне координације ових аминокиселина, преко атома сумпора за Pt(II) јон и отварања CBDCA хелатног прстена [134,135]. Ранија испитивања су показала да карбоплатина споро реагује са лигандима који садрже тиолну групу и да су главни производи у овим реакцијама полинуклеарне комплексне

врсте, које садрже Pt₂S₂ хелатни прстен са атомима сумпора у мосту. Међутим, ова испитивања су показала да је реакција карбоплатине са тиоетарским лигандима знатно бржа и да константа брзине за иницијалну фазу код реакције са L-метионином износи $k = 2,7 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH = 7,0). Поред тога, нађено је да у овим реакцијама долази до формирања веома стабилног [Pt(CBDCA-O)(Met-S)(NH₃)₂]⁻ комплекса, који за време од 56 сати на 37 °C прелази у [Pt(Met-S,N)(NH₃)₂]⁺ [135]. У прилог овоме иде и чињеница да је из урина мишева, третираних карбоплатином, изолован Pt(II) комплекс који садржи монодентатно координован CBDCA лиганд и атом сумпора из тиоетарског лиганда [136].

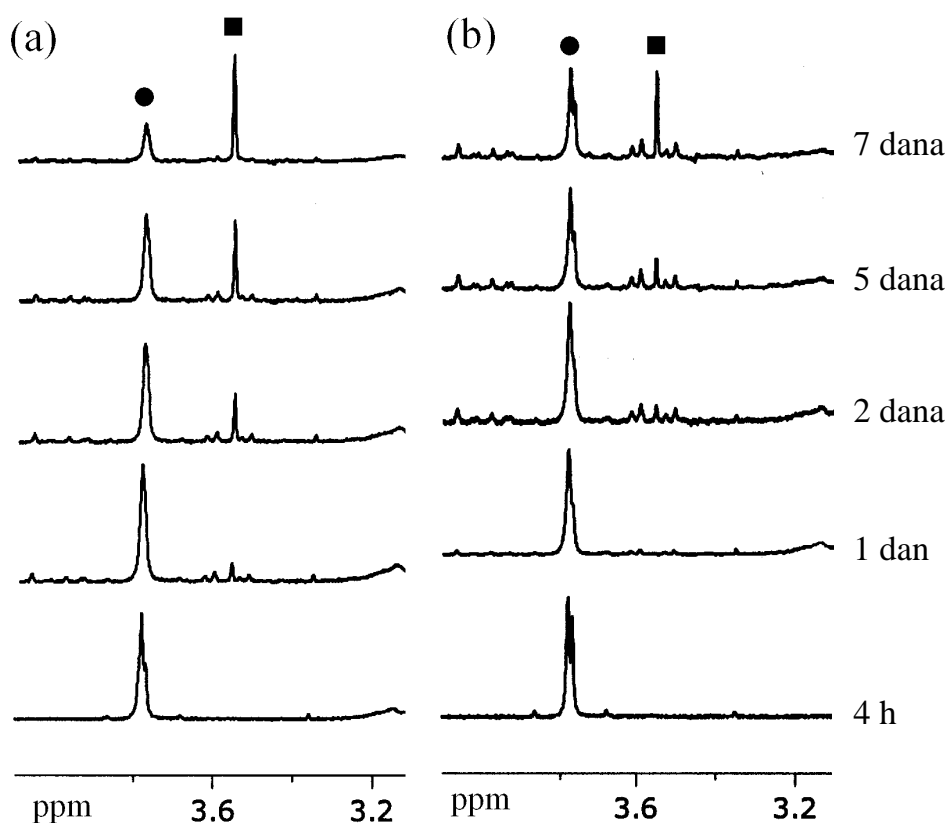
У овом раду нађено је да интермедијерни [Pt(L)(MeCOMet-Gly-S)Cl] и [Pt(L)(CBDCA-O)(MeCOMet-Gly-S)]⁻ комплекси нису хидролитички активни и да након супституције хлорида, односно монодентатно координованог CBDCA лиганда, молекулом воде ови комплекси прелазе у хидролитички активан [Pt(L)(MeCOMet-Gly-S)(H₂O)]⁺ комплекс. Ранији резултати су показали да аква лиганд у Pd(II) и Pt(II) комплексима има значајну улогу у реакцијама региоселективне хидролизе пептидне везе у пептидима који садрже аминокиселине L-метионин и L-хистидин [54,83-85,87,116]. Ова чињеница, се у случају наших испитивања, може објаснити на основу два могућа механизма хидролитичких реакција који су приказани на слици 47. По првом механизму Pt(II) јон интерреагује са атомом кисеоника пептидне везе која хидролизује и поларизује карбонилну групу, при чему карбонилни угљеник постаје парцијално позитиван и погодан за нуклеофилни напад молекула воде из растварача (*екстернални механизам*). Друга могућност је да молекул воде који је координован за Pt(II) јон интерреагује са карбонилним C-атомом суседне пептидне везе која подлеже хидролизи (*интернални механизам*). За хидролизу пептидне везе по овом механизму молекул воде координован за Pt(II) јон се мора налазити у близини карбонилног атома угљеника пептидне везе која се раскида.

У испитиваним хидролитичким реакцијама MeCOMet-Gly дипептида са [Pt(L)Cl₂] и [Pt(L)(CBDCA-O,O')] комплексима, под наведеним експерименталним условима, супституција Cl⁻ и CBDCA²⁻ лиганда са молекулима воде у [Pt(L)Cl(MeCOMet-Gly-S)] и [Pt(L)(CBDCA-O)(MeCOMet-Gly-S)]⁻ комплексима је фаза која одређује брзину реакције хидролизе Met-Gly пептидне везе. У нашем случају, ова реакција супституције се није могла пратити помоћу ¹H NMR



Слика 47. Шематски приказ хидролитичких реакција MeCOMet-Gly дипептида у присуству различитих $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA}-\text{O},\text{O}')]$ комплекса (L = en, 1,2-pn и dach). Дипептид и одговарајући Pt(II) комплекс су реаговани у 1 : 1 молском односу

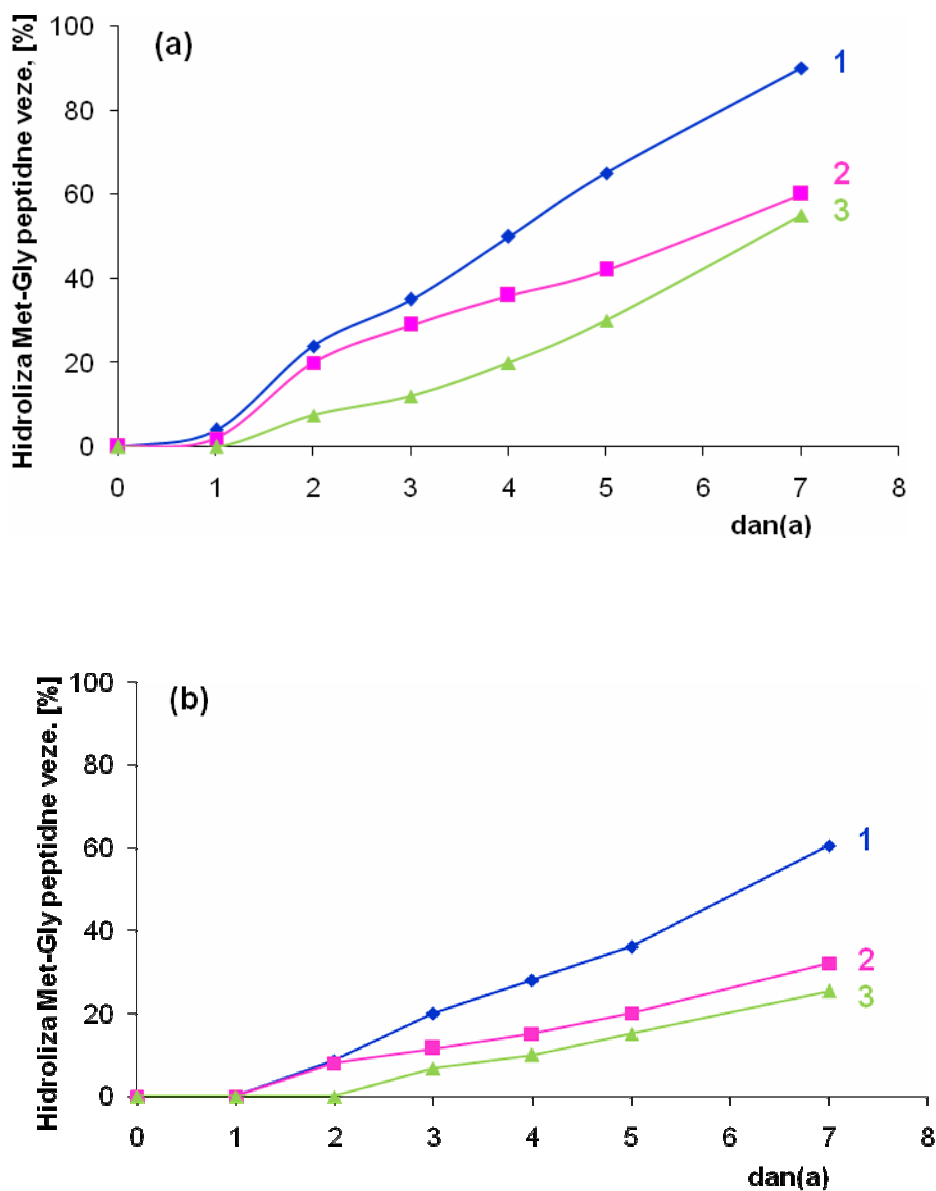
спектроскопије из разлога што се триплет на 2,50 ppm који потиче од H_α и H_β метиленских протона и мултиплет на 1,97 ppm од H_γ метиленских протона некоординованог CBDCA лиганда преклапају са сигнаlima који потичу од H_γ метиленских протона координованог лиганда. Након хидролизе $[\text{Pt}(\text{L})(\text{MeCOMet-Gly-S})\text{Cl}]$ и $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O})(\text{MeCOMet-Gly-S})]^-$ комплекса и формирања хидролитички активног $[\text{Pt}(\text{L})(\text{MeCOMet-Gly-S})(\text{H}_2\text{O})]^+$ комплекса, долази до раскидања Met-Gly пептидне везе (Слика 47). Хидролиза ове пептидне везе се може пратити у ^1H NMR спектру, тако што се интензитет сигнала на 3,75 - 3,78 ppm који одговара глицинским протонима нехидролизованог пептида смањује, док интензитет сигнала на 3,55 ppm који потиче од слободног глицина са временом расте (Слика 48).



Слика 48. Временска зависност промене сигнала у ^1H NMR спектру у реакцији $[\text{Pt}(1,2\text{-pn})\text{Cl}_2]$ (a) и $[\text{Pt}(1,2\text{-pn})(\text{CBDCA-O,O}')]$ (b) комплекса са MeCOMet-Gly дипептидом. Одговарајући Pt(II) комплекс и пептид су реаговани у 1 : 1 молском односу на pH = 7,4 у 50 mM фосфатном пуферу и D_2O као растварачу. Хемијска померања су дата у односу на TSP као референтни стандард. Припадност сигнала и њихова хемијска померања су означени на следећи начин: (●) GlyCH_2 на 3,76 ppm у MeCOMet-Gly дипептиду; (■) GlyCH_2 на 3,55 ppm слободног глицина

Додатком глицина у реакциону смешу долази до повећања интензитета сигнала на 3,55 ppm, чиме је јасно потврђено да овај сигнал потиче од слободног глицина. Други производ хидролизе у овој реакцији је $[\text{Pt}(\text{L})(\text{MeCOMet-S})(\text{H}_2\text{O})]^+$ комплекс који садржи *N*-ацетиловани L-метионин, монодентатно координован преко атома сумпора за Pt(II) јон. Такође, овај комплекс се формира када се помешају еквимоларне количине одговарајућег $[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса и *N*-ацетилованог L-метионина (MeCOMet), чиме се директно потврђује његово грађење у испитиваним реакцијама.

Из односа интеграла сигнала слободног глицина и сигнала који одговара почетној концентрацији MeCOMet-Gly израчунат је проценат хидролизе Met-Gly пептидне везе. Каталитичка способност $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O,O}')]$ комплекса у испитиваној реакцији је одређена израчунавањем процента хидролизованог MeCOMet-Gly у току времена, под наведеним експерименталним условима. Концентрација слободног и хидролизованог дипептида је одређивана сваких 4 сата и реакција је праћена у току 7 дана. Временска зависност реакције хидролизе Met-Gly пептидне везе у реакцијама MeCOMet-Gly дипептида са $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O,O}')]$ комплексима је приказана на слици 49. У реакцијама свих испитиваних хлоридо- и CBDCA-Pt(II) комплекса брзина хидролизе пептида опада у следећем низу: en > 1,2-pn > dach (Слика 49; Табела 11). Такође, у овом раду вршено је поређење вредности за брзину хидролизе MeCOMet-Gly у реакцијама са $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O,O}')]$ комплексима, који садрже исти хелатни диамински лиганд. Утврђено је да су $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ комплекси бољи катализатори хидролизе Met-Gly пептидне везе у односу на одговарајуће $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O,O}')]$ комплексе (Слика 49; Табела 11). Разлике у реактивности ових комплекса могу се приписати различитој стабилности њихових интермедијерних производа, $[\text{Pt}(\text{L})(\text{MeCOMet-Gly-S})\text{Cl}]$ и $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O})(\text{MeCOMet-Gly-S})]$. Веома стабилан интермедијерни $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O})(\text{MeCOMet-Gly-S})]$ комплекс и спора супституција монодентатно координованог CBDCA лиганда молекулима воде је фактор који доприноси споријој реакцији хидролизе у односу на одговарајући $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ комплекс. Такође, ови резултати су у сагласности са ранијим резултатима за реакције *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ комплекса са различитим *N*-ацетилованим пептидима, који садрже L-метионин, где је нађено да долази до веома споре реакције хидролизе пептидне везе када се ове реакције изводе у неутралној и слабо базној средини ($7,0 \leq \text{pH} \leq 9,5$) [26,62,64,67].



Слика 49. Временска зависност реакције хидролизе Met–Gly пептидне везе у MeCOMet–Gly дипептиду у реакцији са различитим [Pt(L)Cl₂] (a) и [Pt(L)(CBDCA-O,O')] (b) комплексима (L = етилендиамин, en (1); (±)-1,2-пропилендиамин, 1,2-pp (2); (±)-*trans*-1,2-диаминоциклохексан, dach (3); и CBDCA = ањон 1,1-циклобутандикарбоксилне киселине)

У закључку ових испитивања може се рећи да, при физиолошким условима (pH = 7,4 и 37 °C), долази до селективне хидролизе Met-Gly пептидне везе у реакцијама MeCOMet-Gly дипептида са [Pt(L)Cl₂] и [Pt(L)(CBDCA-O,O')]

Табела 11. Процент [%] хидролизе пептидне везе у MeCOMet-Gly дипептиду у току реакције са [Pt(L)Cl₂] и [Pt(L)(CBDCA-O,O')] комплексима након 2 и 7 дана реакционог времена на рН = 7,4 у 50 mM фосфатном пуферу и на 37 °C

Платина(II) комплекс	Процент [%] хидролизоване Met-Gly везе	
	Након 2 дана	Након 7 дана
[Pt(en)Cl ₂]	24,0	90,0
[Pt(en)(CBDCA-O,O')]	8,6	60,4
[Pt(1,2-pn)Cl ₂]	20,0	60,0
[Pt(1,2-pn)(CBDCA-O,O')]	8,0	32,0
[Pt(dach)Cl ₂]	7,5	55,0
[Pt(dach)(CBDCA-O,O')]	0	25,4

комплексима. Хидролиза Met-Gly пептидне везе је спор процес у коме учествује интермедијерни [Pt(L)(MeCOMet-Gly-S)(H₂O)]⁺ комплекс. Формирање интермедијерног аква комплекса од одговарајућег [Pt(L)(MeCOMet-Gly-S)Cl], односно [Pt(L)(CBDCA-O)(MeCOMet-Gly-S)]⁻ комплекса, је фаза која одређује брзину хидролитичке реакције MeCOMet-Gly дипептида. Већа стабилност интермедијерног [Pt(L)(CBDCA-O)(MeCOMet-Gly-S)]⁻ комплекса, у односу на одговарајући [Pt(L)(MeCOMet-Gly-S)Cl] комплекс, је у сагласности са чињеницом да је супституција CBDCA лиганда молекулом воде и формирање хидролитички активног [Pt(L)(MeCOMet-Gly-S)(H₂O)]⁺ комплекса веома спор процес. Резултати који показују да Pt(II) комплекси могу да хидролизују пептиде који садрже аминокиселину L-метионин, при физиолошким условима рН и температуре, могу бити од значаја за боље разумевање токсичног ефекта антитуморских Pt(II) комплекса. Такође, показано је да се стерном модификацијом комплекса платине(II) може успорити реакција хидролизе пептидне везе која укључује карбоксилну групу L-метионина. Ови резултати могу бити од значаја код синтезе нових комплекса платине који ће потенцијално имати већу антитуморску активност и мање токсично деловање.

4.2 ЗАКЉУЧАК

У реакцијама $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса са Met-Gly и His-Gly дипептидима, у рН области од 2,0 до 2,5 на собној температури, не долази до хидролизе пептидне везе. Крајњи производ ових реакција је $[\text{Pd}(\text{dpa})_2]^{2+}$ комплекс код кога су два дпа лиганда бидентатно координована за Pd(II) јон. Квадратно-планарна структура овог комплекса је потврђена помоћу рендгеноструктурне анализе. У реакцији ових комплекса са *N*-ацетилованим дериватима ових пептида (MeCOHis-Gly и MeCOMet-Gly) долази до селективне хидролизе Met-Gly пептидне везе. Одсуство хидролизе His-Gly пептидне везе у MeCOHis-Gly пептиду је последица стерног утицаја $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса.

У реакцији $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса (L је бидентатно координован дпа, pic или en лиганд) са *N*-ацетилованим пептидом MeCOMet-Gly-Gly, у рН области од 2,0 до 2,5 и на температури од 60 °C, долази до селективне хидролизе Met-Gly пептидне везе. Брзина хидролизе ове пептидне везе зависи од природе бидентатно координованог диаминског лиганда (en > pic > дпа). Међутим, испитивана реакција хидролизе MeCOGly-Met-Gly трипептида у присуству поменута три Pd(II) комплекса, при наведеним експерименталним условима, није селективна при чему хидролизују Met-Gly и MeCO-Gly пептидне везе.

У реакцијама $[\text{M}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса (M = Pd(II) или Pt(II)) са тетрапептидом MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂, у рН области од 1,5 до 2,0 и на температури од 60 °C, селективно хидролизује Met-Gly пептидна веза. У реакцији $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплекса (L је бидентатно координован дпа, pic или en лиганд) са $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ долази до хидролизе His-GlyNH₂ пептидне везе. Брзина хидролизе $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ у реакцији са

$[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексом је већа од брзине хидролизе овог супстрата у реакцији са $[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, док је у случају реакције $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ са $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ комплексом његова хидролиза потпуно инхибирана.

У реакције монофункционалног $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})\text{I}]^-$ комплекса са MeCOMet-His, при физиолошким условима рН и температуре, настаје $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})(\text{MeCOMet-His-S})]^-$ комплекс. У другој фази ове реакције долази до селективне интрамолекулске миграције $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})]$ комплекса са атома сумпора на N3 атом азота имидазоловог прстена из хистидина, при чему настаје $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})(\text{MeCOMet-His-N3})]^-$ комплекс.

У реакцији MeCOMet-Gly дипептида са $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O,O'})]$ комплексима (L је en, dach и 1,2-pn; CBDCA је анјон 1,1-циклобутандикарбоксилне киселине), при физиолошким условима рН и температуре, долази до веома споре хидролизе Met-Gly пептидне везе. Хидролизи ове везе претходи формирање хидролитички активног $[\text{Pt}(\text{L})(\text{MeCOMet-Gly-S})(\text{H}_2\text{O})]^+$ комплекса. Реакција хидролизе MeCOMet-Gly дипептида је бржа у случају Pt(II) комплекса који садрже хлоридо лиганд у односу на одговарајуће Pt(II) комплексе са CBDCA лигандом. Брзина хидролизе пептида опада са повећањем стерног ефекта комплекса Pt(II) у низу en > 1,2-pn > dach.

Добијени резултати у оквиру ове докторске дисертације представљају оригинални научни допринос изучавању механизма селективне хидролизе пептида који у бочном низу садрже аминокиселине L-метионин и L-хистидин помоћу комплекса Pt(II) и Pd(II) као каталитичких агенаса. Резултати из ове дисертације су од значаја за синтезу нових комплекса прелазних метала који се потенцијално могу применити као синтетичке металопептидазе за селективну хидролизу пептида и протеина у циљу одређивања њихове сложене структуре. Поред тога, резултати доприносе објашњењу механизма токсичног деловања антитуморских комплекса платине и у будућности могу бити од значаја за синтезу новог антитуморског комплекса платине који ће имати већу антитуморску активност и мање токсично деловање.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] T. Ran, R. van Eldik, *Metal Ions in Biological Sistem*, ed, A. Sigel and H. Sigel **32** Marcel Dekker, Inc 1996, p. 339.
- [2] E. Wong, C. M. Giandomenico, *Chem. Rev.* **99** (1999) 2451.
- [3] B. Rosenberg, L. VanCamp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature* **222** (1969) 385.
- [4] T. G. Appleton, *Coord. Chem. Rev.* **166** (1997) 313.
- [5] H. Kozlowski, L. D. Pettit, *Stud. Inorg. Chem.* **11** (1991) 530.
- [6] P. Tsiveriotis, N Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.* **190-191** (1999) 171.
- [7] A. Radzicka, R. Wolfenden, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 6105.
- [8] L. R. Croft, *Handbook of Protein Sequence Analysis*, 2nd ed.; Wiley: Chichester, U. K., 1980.
- [9] J. M. Walker, *The Protein Protocol Handbook*, Humana Press, Totowa, NJ, 1996.
- [10] P. A. Sutton, D. A. Buckingham, *Acc. Chem. Res.* **20** (1987) 357.
- [11] J. Chin, *Acc. Chem. Res.* **24** (1991) 145.
- [12] M. L. Tobe, J. Burgess, *Inorganic Reaction Mechanisms*, Addison Wasley Logman Lit, Essex 1999, p. 70.
- [13] K. B. Grant, M. Kassai, *Curr. Org. Chem.* **10** (2006) 1035.
- [14] Y. Fujii, T. Kiss, T. Gajda, X. S. Tan, T. Sato, Y. Nakano, Y. Hayashi, M. Yashiro, *J. Biol. Inorg. Chem.* **7** (2002) 843.
- [15] M. Yashiro, Y. Sonobe, A. Yamamura, T. Takarada, M. Komiyama, Y. Fujii, *Org. Biomol. Chem.* **1** (2003) 629.
- [16] M. Yashiro, A. Yamamura, T. Takarada, M. Komiyama, *J. Inorg. Biochem.* **67** (1997) 225.

- [17] M. Kassai, R. G. Ravi, S. J. Shealy, K. B. Grant, *Inorg. Chem.* **43** (2004) 6130.
- [18] M. A. Smith, M. Easton, P. Everet, G. Lewis, M. Payne, V. Riveros-Moreno, G. Allen, *Int. J. Pept. Protein Res.* **48** (1996) 48.
- [19] G. Allen, R. O. Campbell, *Int. J. Pept. Protein Res.* **48** (1996) 265.
- [20] D. P. Humphreys, B. J. Smith, L.M. King, S. M. West, D. G. Reeks, P. E. Stephens, *Protein Eng.* **12** (1999) 179.
- [21] D. P. Humphreys, L. M. King, S. M. West, A. P. Chapman, M. Sehdev, M. W. Redden, D. J. Glover, B. J. Smith, P. E. Stephens, *Protein Eng.* **13** (2000) 201.
- [22] N. M. Milović, N. M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 4759.
- [23] N. M. Milović, N. M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 781.
- [24] N. M. Milović, L.-M. Dutcă, N. M. Kostić *Inorg. Chem.* **42** (2003) 4036.
- [25] N. M. Milović, L.-M. Dutcă, N. M. Kostić, *Chem.sEur. J.*, **9** (2003) 5097.
- [26] S. Manka, F. Becker, O. Hohage, W. S. Sheldrick, *J. Inorg. Biochem.*, **98** (2004)1947.
- [27] L. Zhu, N. M. Kostić, *Inorg. Chim. Acta*, **339** (2002) 104.
- [28] N. V. Kaminskaia, T. W. Johnson, N. M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 8663.
- [29] Kaminskaia, N. V.; Kostić, N. M. *Inorg. Chem.* **40** (2001) 2368.
- [30] E. Kopera, A. Krężel, A. M. Protas, A. Belczyk, A. Bonna, A. Wyślouch-Cieszyńska, J. Poznański, W. Bal, *Inorg. Chem.* **49** (2010) 6636.
- [31] Zhang, L.; Mei, Y.; Li, S.; Sun, X.; Zhu, L. *Inorg. Chem.* **42** (2003) 492.
- [32] E. L. Hegg, J. N. Burstyn, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 7015.
- [33] de Oliviera, M. C. B.; Scarpellini, M.; Neves, A.; Terenzi, H.; Bortoluzzi, A. J.; Szponganics, B.; Greatti, A.; Mangrich, A. S.; de Souza, E. M.; Fernandez, P. M.; Soares, M. R. *Inorg. Chem.* **44** (2005) 921.
- [34] Bal, W.; Lukszo, J.; Bialkowski, K.; Kasprzak, K. S. *Chem. Res. Toxicol.* **11** (1998) 1014.
- [35] Bal, W.; Liang, R.; Lukszo, J.; Lee, S.-H.; Dizdaroglu, M.; Kasprzak, K. S. *Chem. Res. Toxicol.* **13** (2000) 616.
- [36] Mylonas, M.; Kreżel, A.; Plakatouras, J. C.; Hadjiliadis, N.; Bal, W. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2002) 4296.
- [37] Krężel, A.; Mylonas, M.; Kopera, E.; Bal, W. *Acta Biochim. Polon.* **53** (2006) 721.
- [38] T. J. Groves, R. J. Rife Chambers, *J. Am. Chem. Soc.* **106** (1984) 630.
- [39] T. H. Fife, T. J. Przystas, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 4631.
- [40] L. M. Sayre, K. V. Reddy, A. R. Jacobson, W. Tang, *Inorg. Chem.* **31** (1992) 935.
- [41] J. Chin, V. Jubian, K. Mrejen, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1990) 1326.

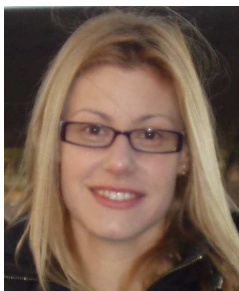
- [42] T. M. Rana, C. F. Meares, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (1991) 10578.
- [43] T. M. Rana, C. F. Meares, *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991) 1859.
- [44] T. M. Rana, C. F. Meares, *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 2457.
- [45] M. R. Ermácora, J. M. Delfino, B. Cuenoud, A. Schepartz, R. O. Fox, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1992) 6383.
- [46] I. E. Platis, M. R. Ermácora, R. O. Fox, *Biochemistry*, **32** (1993) 12761.
- [47] A. Schepartz, B. Cuenoud, *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 3249.
- [48] D. Hoyer, H. Cho, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 3249.
- [49] N. Ettner, W. Hillen, G. A. Ellestad, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 2546.
- [50] J. B. Ghaim, D. P. Greiner, C. F. Meares, R. B. Gennis, *Biochemistry* **34** (1995) 11311.
- [51] M. R. Ermácora, D. W. Ledman, R. O. Fox, *Nat. Struc. Biol.* **3** (1996) 59.
- [52] M. Yashiro, T. Takarada, S. Miyama, M. Komiyama, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1994) 1757.
- [53] I. E. Burgenson, N. M. Kostić, *Inorg. Chem.* **30** (1991) 4299.
- [54] T. N. Parac, N. M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 51.
- [55] G. Mehal, R. van Eldik, *Inorg. Chem.* **24** (1985) 4165.
- [56] S. G. Murray, F. R. Hartley, *Chem. Rev.* **81** (1981) 365.
- [57] D. D. Gummin, E. M. A. Ratila, N. M. Kostić, *Inorg. Chem.* **25** (1986) 24.
- [58] D. L. Rabenstein, A. A. Isab, M. M. Shoukry, *Inorg. Chem.* **21** (1982) 3234.
- [59] T. G. Appleton, F. J. Pesch, M. Wienken, S. Menzer, B. Lippert, *Inorg. Chem.* **31** (1992) 4410.
- [60] H. Sigel, R. B. Martin, *Chem. Rev.* **82** (1982) 385.
- [61] A. F. M. Siebert, W. S. Sheldrick, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 385.
- [62] M. Hahn, M. Kleine, W. S. Sheldrick, *J. Biol. Inorg. Chem.* **6** (2001) 556.
- [63] S. Manka, F. Becker, O. Hohage, W. S. Sheldrick, *J. Inorg. Biochem.* **98** (2004) 1947.
- [64] O. Hohage, S. Manka, W. S. Sheldrick, *Inorg. Chim. Acta* **362** (2009) 953.
- [65] M. Kleine, D. Wolters, W.S. Sheldrick, *J. Inorg. Biochem.* **97** (2003) 354.
- [66] R.B. Martin, *Met. Ions. Biol. Syst.* **38** (2001) 1.
- [67] O. Hohage, W.S. Sheldrick, *J. Inorg. Biochem.* **100** (2006) 1506.
- [68] L. Zhu, N. M. Kostić, *Inorg. Chem.* **31** (1992) 3994.
- [69] L. Zhu, N. M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 4566.
- [70] D. P. Ašanin, S. Rajković, D. Molnar-Gabor, M. I. Djuran, *Monatsh Chem.* **135** (2004) 1445.

- [71] S. A. Stoffregen, A. K. K. Griffin, N. M. Kostić, *Inorg. Chem.* **44** (2005) 8899.
- [72] L. Zhu, N. M. Kostić, *Inorg. Chim. Acta*, **217** (1994) 21.
- [73] X. Chen, X. Luo, Z. Song, S. Zhou, L. Zhu, *Polyhedron* **17** (1998) 2271.
- [74] D. E. Wilcox, *Chem. Rev.* **96** (1996) 2435.
- [75] G. B. Kater, N. M. Kostić, *Inorg. Chem.* **37** (1998) 1021.
- [76] E. W. Wilson, Jr., R. B. Martin, *Inorg. Chem.* **9** (1970) 528; *ibid.* **10** (1971) 1197.
- [77] H. Sigel, R. B. Martin, *Chem. Rev.* **74** (1974) 471.
- [78] I. Sovago, R. B. Martin, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **43** (1981) 425.
- [79] L. Menabue, M. Saladini, M. Sola, *Inorg. Chem.* **29** (1990) 1293.
- [80] S. Kasselauri, A. Garoufis, M. Hadjiliadis, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.* **104** (1990) 1.
- [81] J. P. Laussac, R. Haran, N. Hadjiliadis, *C. R. Acad. Sci. Ser. 2* **300** (1985) 137.
- [82] S. L. Best, T. K. Chattopadhyay, M. I. Djuran, R. A. Palmer, P. J. Sadler, I. Sovazo, K. Varnagy, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 2587.
- [83] S. U. Milinković, T. N. Parac, M. I. Djuran, N. M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 2771.
- [84] T. N. Parac, N. M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 5946.
- [85] M. I. Djuran, S. U. Milinković, *Polyhedron* **19** (2000) 959.
- [86] T. N. Parac, G. M. Ullmann, N. M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 3127.
- [87] M. I. Djuran, S. U. Milinković, *Polyhedron* **18** (1999) 3611.
- [88] N. M. Milović, N. M. Kostić, *Inorg. Chem.* **41** (2002) 7053.
- [89] C. D. W. Fröhling, W.S. Sheldrick, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 4411.
- [90] D. Wolters, W.S. Sheldrick, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1999) 1121.
- [91] A. W. Prestayko, in *Cisplatin, Current Status and New Developments*, eds. A. W. Prestayko, S. T. Crooke and S. K. Carter, Academic Press, London, 1980, p. 2.
- [92] T. N. Parac, N. M. Kostić, *Inorg. Chem.* **37** (1998) 2141.
- [93] M. R. Ghadiri, C. J. Choi, *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 1630.
- [94] L. Zhu, L. Qin, T. N. Parac, N. M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 5218.
- [95] G. R. Moore, G. W. Pettigrew, *Cytochromes c-Evolutionary Structural and Physicochemical Aspects*, Springer-Verlag, Berlin (1990)
- [96] L. M. Dutcă, K. S. Ko, N. L. Pohl, N. M. Kostić, *Inorg. Chem.* **44** (2005) 5141.
- [97] L. Zhu, R. Bakhtiar, N. M. Kostić, *J. Biol. Inorg. Chem.* **3** (1998) 383.
- [98] E. M. A. Ratilla, N. M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 4427.

- [99] E. M. A. Ratilla, B. K. Scott, M. S. Moxness, N. M. Kostić, *Inorg. Chem.* **29** (1990) 918.
- [100] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **85** (1963) 2149.
- [101] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R. C. Sheppard and B. J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1978) 537.
- [102] H. Hohmann, R. van Eldik, *Inorg. Chum. Acta* **174** (1990) 87.
- [103] A. Caubet, V. Moreno, E. Molins, C. Miravittles, *J. Inorg. Biochem.* **48** (1992) 135.
- [104] R.C. Warren, J.F. McConnell, N.C. Stephenson, *Acta Cryst. Secm. B* **26** (1970) 1402.
- [105] M. I. Djuran, E. L. M. Lempers, J. Reedijk, *Inorg. Chem.* **30** (1991) 2648.
- [106] M. Watabe, M. Kai, M. Hayashi, K. Kamiyama, H. Okada, T. Takayama, *J. Inorg. Biochem.*, **81** (2000) 49.
- [107] H. M. N. H. Irving, M. G. Miles, L. D. Pettit, *Anal. Chim. Acta*, **38** (1967) 475.
- [108] L. Zékány, I. Nagypál, in: D. Leggett (Ed.), *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, Plenum Press, New York, 1985, p. 291.
- [109] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1985) 1195.
- [110] Wen-Rui Yao, Ze-Hua Liu, Qian-Feng Zhang, *Acta Cryst.* **C59** (2003) m139.
- [111] M.J. Rauterkus, S. Fakih, C. Mock, I. Puscasu, B. Krebs, *Inorg. Chum. Acta* **350** (2003) 355.
- [112] Yue Wang, Y. Mizubayashi, M. Odoko, N. Okabe, *Acta Cryst.* **C61** (2005) m67.
- [113] E.N. Korneeva, M.V. Ovchinnikov, N.M. Kostić, *Inorg. Chim. Acta* **243** (1996) 9.
- [114] X. Chen, L. Zhu, H. Yan, X. You, N.M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1996) 2653.
- [115] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Monatsh Chem.* **130** (1999) 613.
- [116] Z.D. Petrović, M.I. Djuran, F.W. Heinemann, S. Rajković, S.R. Trifunović, *Bioorg. Chem.* **34** (2006) 225.
- [117] A.F. M. Siebert, Ph.D. Dissertation, University of Bochum, Germany, 1995, p. 166.
- [118] N.M. Milović, N M. Kostić, in: A. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems, Palladium(II) and Platinum(II) Complexes as Synthetic Peptidases*, Vol. XXXVIII, Marcel Dekker Inc, 2001, pp. 145.
- [119] T. Soldatović, Ž.D. Bugarčić, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 1472.
- [120] M.R. Buchmeiser, K. Wurst, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 11101.
- [121] C. Seward, Wen-li Jia, Rui-Yao Wang, Suning Wang, *Inorg. Chem.* **43** (2004) 978.

- [122] M.R. Buchmeiser, S. Lubbad, M. Mayr, K. Wurst, *Inorg. Chim. Acta* **345** (2003) 145.
- [123] J. Silberg, T. Schareina, R. Kempe, K. Wurst, M.R. Buchmeiser, *J. Organomet. Chem.*, **622** (2001) 6.
- [124] T. Schareina, G. Hillebrand, H. Fuhrmann, R. Kempe, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2001) 2421.
- [125] S. Fakih, Wing Chau Tung, D. Eierhoff, C. Mock, B. Krebs, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **631** (2005) 1397.
- [126] (a) F.H. Allen, O. Kennard, *Chem. Des. Autom. News* **8** (1993) 1 & 31; (b) F. H. Allen, *Acta Cryst.* **B58** (2002) 380.
- [127] Z. Nagy, I. Sóvágó, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2001) 2467.
- [128] A. Kiss, E. Farkas, I. Sóvágó, B. Thormann, B. Lippert, *J. Inorg. Biochem.*, **68** (1997) 85.
- [129] Z. Nagy, I. Fábián, I. Sóvágó, *J. Inorg. Biochem.*, **79** (2000) 129.
- [130] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Aust. J. Chem.*, **53** (2000) 645.
- [131] K.J. Barnham, M.I. Djuran, P. del S. Murdoch, P.J. Sadler, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1994) 721.
- [132] C.D.W. Fröhling, W.S. Sheldrick, *Chem. Commun.*, (1997) 1737.
- [133] M. Hahn, D. Wolters, W.S. Sheldrick, F.B. Hulsbergen, J. Reedijk, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **4** (1999) 412.
- [134] U. Frey, J.D. Ranford, P.J. Sadler, *Inorg. Chem.* **32** (1993) 1333.
- [135] K.J. Barnham, M.I. Djuran, P. del S. Murdoch, J.D. Ranford, P.J. Sadler, *Inorg. Chem.* **35** (1996) 1065.
- [136] K.J. Barnham, U. Frey, P. del S. Murdoch, J.D. Ranford, P.J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 11175.

БИОГРАФИЈА



Марија Д. Живковић рођена је 10. 04. 1979. године у Крагујевцу. Основну школу и Прву крагујевачку гимназију завршила је у Крагујевцу. На Природно-математички факултет у Крагујевцу, група Хемија, смер истраживање и развој, уписала се школске 1998/99. године, где је и дипломирала, јула 2004. године, са просечном оценом 8,79. На последипломске студије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу (смер Неорганска хемија) уписала се 2004. године, а магистарску тезу под насловом *”Испитивање реакција метионил-глицина и хистидил-глицина са неким паладијум(II) комплексима”* одбранила је 2007. године, под менторством професора др Милоша И. Ђурана.

Бави се истраживачким радом у области испитивања интеракција комплекса паладијума(II) и платине(II) са различитим биолошки значајним лигандима. У звање асистента за ужу научну област Неорганска хемија, у Институту за хемију на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, изабрана је 2009. године, и до сада је са успехом изводила експерименталну наставу из више предмета на основним студијама хемије. Ангажована је на пројекту (Пројекат 172036) који финансира Министарство просвете и науке Републике Србије.

У току докторских студија, октобра 2011. године, боравила је месец дана у Институту за биохемију и биофизику Пољске академије наука и уметности у Варшави (Пољска).

ПРИЛОГ

A study of the reactions of methionine- and histidine-containing peptides with palladium(II) complexes: The key role of steric crowding on palladium(II) in the selective cleavage of the peptide bond

Marija D. Živković^a, Snežana Rajković^a, Urszula Rychlewska^b, Beata Warzajtis^b, Miloš I. Djuran^{a,*}

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovica 12, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

^b Faculty of Chemistry, A. Mickiewicz University, Grunwaldzka 6, Poznan 60-780, Poland

Received 20 October 2006; accepted 26 November 2006

Available online 8 December 2006

Abstract

¹H NMR spectroscopy was applied to study the reactions of palladium(II) complexes, *cis*-[Pd(dpa)Cl₂] and *cis*-[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ (dpa is 2,2'-dipyridylamine acting as a bidentate ligand) with the dipeptides methionylglycine (Met-Gly) and histidylglycine (His-Gly), and the *N*-acetylated derivatives of these dipeptides, MeCOMet-Gly and MeCOHis-Gly. All reactions were carried out in the pH range 2.0–2.5 with equimolar amounts of the palladium(II) complex and the peptide at two different temperatures, 25 and 60 °C. In the reactions of *cis*-[Pd(dpa)Cl₂] and *cis*-[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ with Met-Gly and His-Gly, no hydrolysis of the peptide bond was observed. The final product in these reactions was the [Pd(dpa)₂]²⁺ complex. The square-planar structure of this complex was confirmed by X-ray analysis. The reaction of the *cis*-[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ complex with the MeCOHis-Gly and MeCOMet-Gly peptides under the previously mentioned experimental conditions was remarkably selective in the cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine in the side chain. The modes of coordination of *cis*-[Pd(dpa)Cl₂] and *cis*-[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ in the reactions with the non-acetylated peptides and the total steric inhibition of the hydrolytic reaction between *cis*-[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ and MeCOHis-Gly can be attributed to the steric bulk of the palladium(II) complex. This finding should be taken into consideration in designing new palladium(II) complexes for the regioselective cleavage of peptides and proteins.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Methionine; Histidine; Peptides; Palladium(II); Catalyst; Hydrolysis

1. Introduction

During the last 10 years, hydrolytic reactions between various palladium(II) complexes of the type *cis*-[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺, in which L is a bidentate ligand, preferably a diamine ligand, and methionine- and histidine-containing peptides have been extensively investigated [1–8]. It was found that these Pd(II) complexes spontaneously bind to

the side chains of the methionine and histidine residues and effect hydrolytic cleavage of short peptides with half-lives ranging from several hours to several minutes. Additionally, it was also found that the *cis* configuration of two water molecules and a very stable chelating diamine ligand (L) in *cis*-[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺ complexes are very suitable for the study of the mechanism of these regioselective hydrolytic reactions. In spite of the numerous results obtained recently, the very complicated mechanism of these hydrolytic reactions has yet to be completely understood. For clarification of this mechanism, investigations on the

* Corresponding author. Tel.: +381 34 300 251; fax: +381 34 335 040.
E-mail address: djuran@kg.ac.yu (M.I. Djuran).

influence of different factors, such as pH, temperature, solvent, catalyst and the steric effects of the substrate, on this hydrolytic reaction were shown to be necessary.

In recent years, the steric influence of the palladium(II) catalyst on the rate of hydrolytic cleavage of the amide bond in histidine- and methionine-containing peptides has been the subject of very broad investigations [3,5,6,8]. It was found that in the reaction between MeCOHis-Gly and different *cis*-[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺ complexes (L is ethylenediamine, en; 1,2-propylenediamine, 1,2-pn; *N*-methylethylenediamine, Meen; isobutylenediamine, ibn; or *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine, Me₄en, acting as a bidentate ligand) in the pH range 2.0–2.5 and at 60 °C, the rate of the regioselective cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of histidine decreases as the steric bulk of the palladium(II) complex increases (en > 1,2-pn > Meen > ibn > Me₄en) [5]. The observed rates of hydrolytic reaction were investigated in terms of steric hindrance of the chelating diamine on the palladium(II) complexes and the results showed that with increasing number of methyl groups at the nitrogen or carbon atom of the chelated diamine ligand, the number of hydrolyzed His-Gly peptide bonds in MeCOHis-Gly decreased. For example, the reaction between *cis*-[Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ and this peptide after 48 h at 60 °C was two times faster in comparison with *cis*-[Pd(Me₄en)(H₂O)₂]²⁺, and one and a half times faster in relation to *cis*-[Pd(ibn)(H₂O)₂]²⁺. The results for MeCOHis-Gly peptide are not in accordance with those obtained for MeCOMet-Gly peptide and palladium(II) complexes containing different chelated diamine ligands (en, 1,2-pn, ibn, 1,2-dach, Meen and Me₄en) [8]. The rate of the hydrolysis of the Met-Gly amide bond was approximately the same and the amount of the hydrolyzed MeCOMet-Gly peptide was between 80% and 88% after 4 h. This was explained by the existence of the same catalytically active form in the reaction of *cis*-[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺ complexes with MeCOMet-Gly peptide complex obtained by the replacement of the chelated diamine ligand from the initially formed binuclear palladium(II)–peptide complex. Giving importance to recent results with sterically crowded *cis*-[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺ complexes and histidine- and methionine-containing peptides and the different effects of these complexes on the rate of hydrolytic cleavage of the amide bonds in these peptides, it seemed reasonable to further investigate the reactions of these peptides with new *cis*-[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺ type complexes. The main aim of these investigations was to design a new palladium(II) complex capable of the regioselective cleavage of the amide bond in peptides containing both methionine and histidine amino acids in the side chains.

In the present study, *cis*-[Pd(dpa)Cl₂] and *cis*-[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ complexes (dpa is 2,2'-dipyridylamine) were synthesized and employed to investigate their reactions with the dipeptides Met-Gly and His-Gly, and also the reactions of the *cis*-[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ complex with the *N*-acetylated derivatives of these peptides, MeCOMet-Gly and MeCOHis-Gly. ¹H NMR study of the regioselective

hydrolytic cleavage of the amide bond in only the MeCOMet-Gly peptide and the absence of this hydrolytic reaction with the other investigated peptides are promising and may help in the development of new palladium(II) complexes as artificial metallopeptidases.

2. Experimental

2.1. Reagents

Distilled water was demineralized and purified to a resistance greater than 10 MΩ cm⁻¹. The compounds D₂O, DNO₃, NaOD, (CD₃)₂SO, 2,2'-dipyridylamine (dpa), K₂PdCl₄ were obtained from the Aldrich Chemical Co. All common chemicals were of reagent grade. The dipeptides methionylglycine (Met-Gly) and histidylglycine (His-Gly) were obtained from the Sigma Chemical Co. The terminal amino group in the peptides was acetylated by standard methods [9].

2.2. Synthesis of *cis*-dichloro(2,2'-dipyridylamine)palladium(II), *cis*-[Pd(dpa)Cl₂]

The *cis*-[Pd(dpa)Cl₂] complex was prepared by a modification of a method described in the literature [10]. K₂PdCl₄ (0.2000 g, 0.61 × 10⁻⁴ mol) was dissolved in 25 cm³ of water, and to this solution an equivalent amount of 2,2'-dipyridylamine (0.1049 g; 0.61 × 10⁻⁴ mol) was added. The pH of the solution was adjusted to ca. 3 by the addition of 1 M HCl, which was followed by refluxing for 5 h. If the pH was carefully controlled, a clear color change from brown to yellow was observed during this time. The obtained yellow solution was left overnight at room temperature. The crystals of *cis*-[Pd(dpa)Cl₂] were removed by filtration, washed with a small amount of water, and air dried. Yield 0.1922 g (90%). *Anal.* Calc. for *cis*-[Pd(dpa)Cl₂]=C₁₀H₉Cl₂N₃Pd (FW = 348.52): C, 34.46; H, 2.60; N, 12.06%. Found: C, 34.35; H, 2.70; N, 12.02%. ¹H NMR ((CD₃)₂SO, 200 MHz); δ 7.15 (t, H5); δ 7.27 (d, H3); δ 7.96 (t, H4); δ 8.58 (dd, H6); δ 11.12 (s, H–N); ¹³C NMR ((CD₃)₂SO, 200 MHz); δ 114.09 (C4); δ 119.01 (C5); δ 141.33 (C3); δ 149.44 (C6); δ 150.83 (C2).

2.3. Synthesis of *cis*-diaqua(2,2'-dipyridylamine)palladium(II), *cis*-[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺

Because all the solutions were made in D₂O, all the aqua ligands actually were D₂O. However, for simplicity and consistency with our previous publications, we show the D₂O ligands as H₂O. The *cis*-[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ was prepared from the corresponding chloro complex in the same manner as described in the literature for the preparation of similar Pd(II) aqua complexes [11,12]. The *cis*-[Pd(dpa)Cl₂] complex was treated in D₂O solution with the appropriate amount of AgNO₃. The Pd(II) complex and AgNO₃ were mixed in a molar ratio of 1:1.95. The mixture was stirred at room temperature in the dark for up to 24 h. The precip-

itated AgCl was removed and the filtrate containing *cis*-[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ was stored in a refrigerator until used for reaction with the dipeptides.

2.4. Synthesis of bis(2,2'-dipyridylamine)palladium(II) dichloride tetrahydrate, [Pd(dpa)₂]Cl₂ · 4H₂O

The schematic presentation of the reaction for the synthesis of the *cis*-[Pd(dpa)₂]Cl₂ · 4H₂O complex is given in Fig. 1. The dipeptide Met-Gly (0.0300 g, 1.45 × 10⁻⁴ mol) was dissolved in 4 cm³ of water and solid *cis*-[Pd(dpa)Cl₂] (0.0507 g, 1.45 × 10⁻⁴ mol) was added to this solution. The pH of the solution was adjusted to ca. 2.4 by the addition of 1 M HCl and then mixture was stirred at 60 °C for 4 h. The precipitate of the unreacted *cis*-[Pd(dpa)Cl₂] was removed, and the filtrate was left in a refrigerator for sev-

eral days. The light yellow crystals of [Pd(dpa)₂]Cl₂ · 4H₂O were removed by filtration, washed with a small amount of ethanol, and air-dried. Yield 0.0343 g (40%). *Anal.* Calc. for [Pd(dpa)₂]Cl₂ · 4H₂O = C₂₀H₂₆Cl₂N₆O₄Pd (FW = 591.77): C, 40.59; H, 4.43; N, 14.20%. Found: C, 40.06; H, 4.54; N, 14.12%. Spectral characterization: ¹H NMR (D₂O, 200 MHz); δ 7.13 (t, H5), δ 7.46 (d, H3); δ 7.61 (d, H4), δ 8.05 (m, H6); ¹³C NMR (D₂O, 200 MHz); δ 119.41 (C4); δ 125.10 (C5); δ 146.59 (C3); δ 153.48 (C6); δ 155.58 (C2).

2.5. Measurements

All pH measurements were made at 25 °C. The pH meter (Iskra MA 5704) was calibrated with Fischer certified buffer solutions of pH 4.00. The results were not cor-

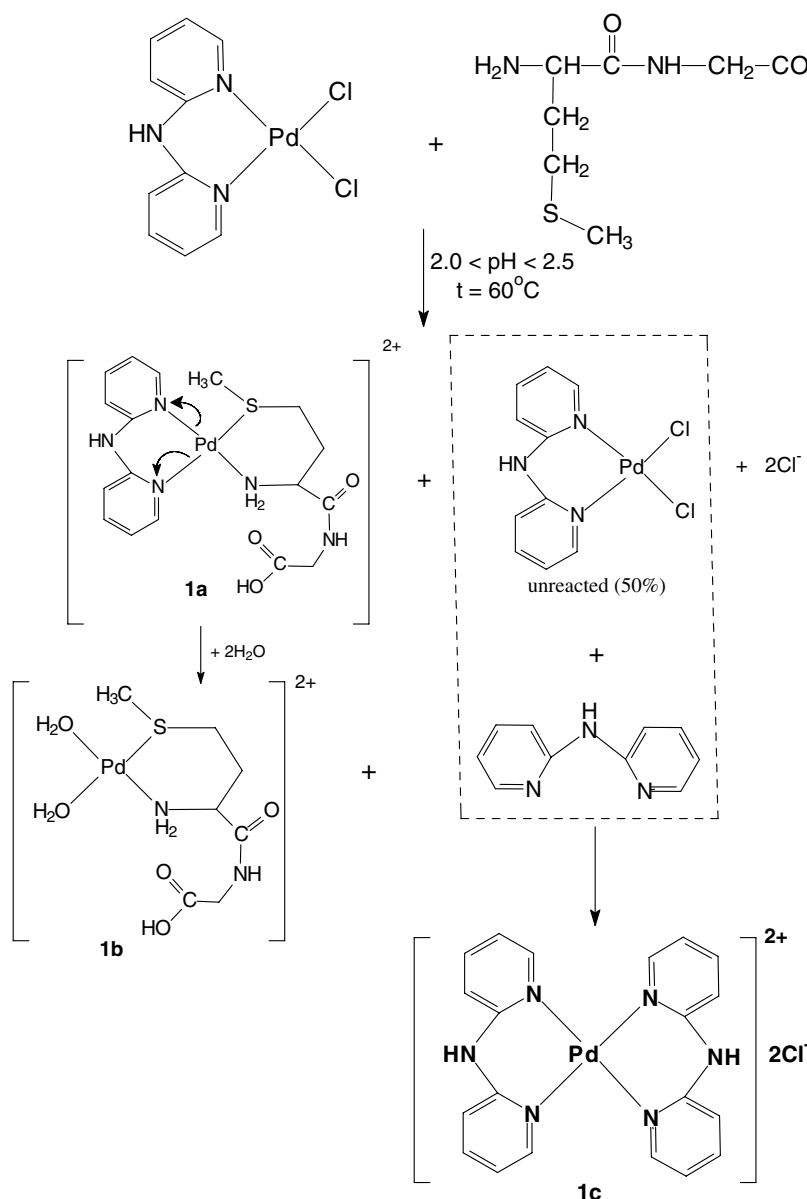


Fig. 1. The reaction scheme between *cis*-[Pd(dpa)Cl₂] and the Met-Gly peptide in the pH range 2.0 < pH < 2.5 and at 60 °C with the [Pd(dpa)₂]Cl₂ · 4H₂O complex as the final product.

rected for the deuterium isotope effect. The ^1H NMR spectra of D_2O solutions containing TSP (3-trimethylsilylpropane-1-sulfonate) as the internal reference were recorded with a Varian Gemini 200 spectrometer. Elemental microanalyses for carbon, hydrogen, and nitrogen were done at the Faculty of Chemistry, University of Belgrade.

2.6. Crystal structure determination of the $[\text{Pd}(\text{dpa})_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ complex

The crystal data of the $[\text{Pd}(\text{dpa})_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ complex, and the parameters of data collection are summarized in Table 1. The intensity data were measured on a light yellow, plate-like crystal of dimensions $0.25 \times 0.15 \times 0.05$ mm with a KM4CCD kappa-geometry diffractometer [13] using graphite-monochromated Mo $\text{K}\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) at ambient temperature, up to the θ value of 25° . The structure was solved by direct methods using SHELXS-86 [14] and refined by least-squares techniques with SHELXL-97 [15]. The intensity data were corrected for Lp effects as well as for absorption. Anisotropic thermal parameters were employed for the non-hydrogen atoms. The hydrogen atoms connected to carbon atoms were placed at the calculated positions while those attached to the water oxygen atoms and the nitrogen atom were located on the subsequent difference Fourier maps. The O–H and N–H bond lengths were standardized to values of 0.85 and 0.90 Å , respectively. All hydrogen atoms were allowed to ride on the atoms to which they were attached and their isotropic displacement parameters were given values 30% higher than the isotropic equivalent for the atom to which the H-atom was bonded. A Siemens Stereochemical Workstation was used to prepare the drawings [16].

Table 1
Crystallographic data collection and structure refinement information

Compound	$[\text{Pd}(\text{dpa})_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Chemical formula	$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{Pd}$
Chemical formula weight	591.77
Crystal system	monoclinic
Space group	$C2/c$
a (Å)	15.8539(11)
b (Å)	7.7580(6)
c (Å)	20.5302(12)
β ($^\circ$)	107.563(6)
V (Å^3)	2407.4(3)
Z	4
D_{calc} (Mg m^{-3})	1.633
Absorption coefficient (mm^{-1})	1.032
Number of measured reflections	12 500
Number of independent reflections	2137
Number of observed reflections	1705
R [$F^2 > 2\sigma(F_2)$]	0.0360
wR (F^2)	0.0852
S	1.096
$\Delta\rho_{\text{max}}$ (e \AA^{-3})	1.125
$\Delta\rho_{\text{min}}$ (e \AA^{-3})	-0.426

3. Results and discussion

^1H NMR spectroscopy was applied to study the reactions of the palladium(II) complexes, $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ and $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (dpa is a bidentate 2,2'-dipyridylamine) with the dipeptides methionylglycine (Met-Gly) and histidylglycine (His-Gly), and the reactions of $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ with the *N*-acetylated derivatives of these dipeptides, MeCOMet-Gly and MeCOHis-Gly. All reactions were carried out with equimolar amounts of the palladium(II) complex and the peptide in the pH range 2.0–2.5 and at two different temperatures, 25 and 60 $^\circ\text{C}$. As was shown in previous studies [1–3,17], acidic solutions are needed to suppress the formation of hydroxo-bridged oligomeric palladium(II) complexes, which are catalytically inactive.

3.1. Reactions of the $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ and $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complexes with Met-Gly and His-Gly

In the reactions between $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ and $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and the peptides Met-Gly or His-Gly, no hydrolysis of the peptide bond was observed in the pH range 2.0–2.5, neither at 25 $^\circ\text{C}$, nor at 60 $^\circ\text{C}$. The signal at 3.80 ppm for the methylene protons of the free glycine did not appear in the ^1H NMR spectrum even after the reaction mixture had been kept at 60 $^\circ\text{C}$ for 7 days. Upon addition of glycine to the reaction mixture, its resonance at the above mentioned chemical shift appeared immediately. The reaction scheme between $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ and Met-Gly is given in Fig. 1. A similar reaction pathway can be presumed for the reaction of $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ with this peptide, or any of these two palladium(II) complexes with the His-Gly peptide. As can be seen from Fig. 1, one of the final products in these reactions is the square-planar $[\text{Pd}(\text{dpa})_2]^{2+}$ complex (**1c**). The preparation of this complex starting from $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ and the Met-Gly peptide has been described in the experimental part of this paper and the crystal structure of $[\text{Pd}(\text{dpa})_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ was confirmed by X-ray diffraction. The absence of hydrolysis of the peptide bond in the reactions between the Pd(II) complexes and Met-Gly, or His-Gly peptides is in accordance with previous results obtained for the Pd(II) complexes and Met-X or His-X peptides (X is an aliphatic amino acid) containing a non-acetylated N-terminal amino group [7]. The final product in these reactions was an extremely stable palladium(II)–peptide complex in which the Pd(II) ion is bound through the sulfur donor atom of methionine, or the N3 imidazole nitrogen atom of histidine, and the nitrogen atom of the N-terminal amino group [18]. This mode of coordination holds the Pd(II) complex away from the downstream peptide bond and prevents its cleavage. It is well established that for the cleavage of the peptide bond involving the carboxylic group of histidine, or methionine, in the His-X and Met-X peptides, it is always necessary to protect their N-terminus amino group [1–3,7].

When an equimolar amount of *cis*-[Pd(dpa)Cl₂] was incubated with Met-Gly at 2.0 < pH < 2.5 and at 60 °C, the intermediate palladium(II)–peptide complex **1a** was formed (Fig. 1). In this complex, the peptide is bidentate coordinated to the Pd(II) ion via the methionine sulfur atom and the N-terminal amino group. In the reaction with His-Gly, the bidentate coordination of this peptide occurs through the N3 imidazole nitrogen atom and the N-terminal amino group. The coordination of the Pd(II) ion to the methionine sulfur atom can easily be detected in the ¹H NMR spectrum. The signal at 2.14 ppm for the CH₃–S protons of the free Met-Gly was decreased, while the signal at 2.54 ppm, corresponding to these protons of the peptide bound to Pd(II) ion through the sulfur atom, appeared in the spectrum. The amount of the palladium(II)–peptide complex **1a** formed in this reaction was calculated by integration of these two signals. This reaction was rather slow, what is opposed to previous results and the well established high affinity of Pt(II) and Pd(II) ions for sulfur-containing ligands [19,20]. The inhibition of this reaction is additionally supported by the steric hindrance between the dpa ligand and the entering Met-Gly peptide in the square-planar [Pd(dpa)(Met-Gly-*S,N*)]²⁺ complex **1a**. Approximately 50% of the *cis*-[Pd(dpa)Cl₂] complex had reacted after 2 h at 60 °C. When this reaction was carried out at 25 °C, less than 50% of the complex had reacted after more than 12 h. The next step after the formation of the complex **1a** is the release of the dpa ligand from palladium(II) and its displacement by water molecules, whereby complex **1b** is formed (Fig. 1). The conversion of **1a** into **1b** was very fast and owing to the overlap of the signals corresponding to the protons in free dpa and in the palladium(II)–peptide complex **1a**, multiplet in the region 7.00–8.50 ppm, the displacement of the dpa ligand by water molecules could not be followed by ¹H NMR spectroscopy. The fast release of the dpa ligand is also supported by the acidic medium and by the *trans* effect of the coordinated sulfur atom [21]. The liberated dpa ligand further reacts with unreacted *cis*-[Pd(dpa)Cl₂] complex producing the [Pd(dpa)₂]Cl₂ · 4H₂O complex **1c**, as one of the final products of the investigated reaction. The latter complex was also obtained in a separate experiment starting from *cis*-[Pd(dpa)Cl₂] and the dpa ligand. The reaction of *cis*-[Pd(dpa)Cl₂] complex with His-Gly was three times slower than that with the Met-Gly peptide, finally resulting in a very small yield of the [Pd(dpa)₂]Cl₂ · 4H₂O complex.

3.2. Description of the crystal structure of [Pd(dpa)₂]Cl₂ · 4H₂O

The title compound consists of a square-planar-coordinated [Pd(dpa)₂]²⁺ cation, chloride anions and water molecules (Fig. 2). It represents one of the five Pd(dpa) complexes hitherto investigated by X-ray diffraction [22–24]. The asymmetric unit contains half of the Pd(dpa)₂ cation located on an inversion center, two independent Cl[−] counterions and two independent solvent water mole-

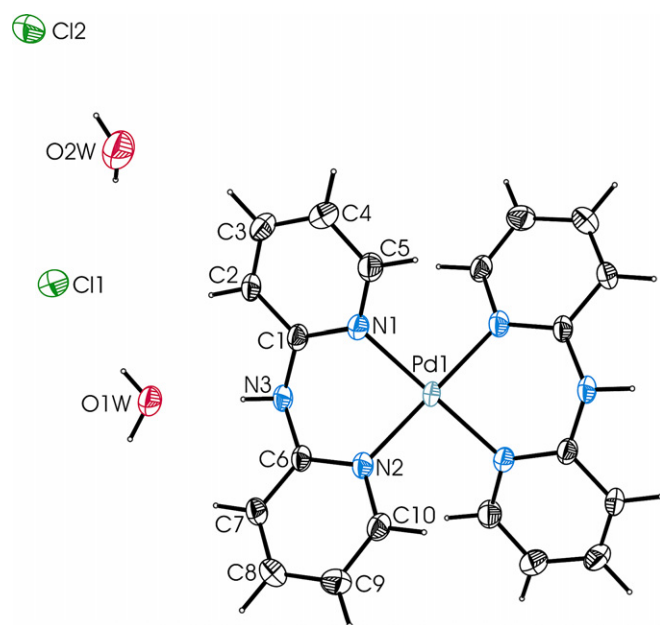


Fig. 2. View of the complex cation with accompanying chloride counterions and water molecules. Displacement ellipsoids for non-H atoms are shown at the 40% probability level. Only symmetry independent atoms are labeled. Generation of the second half of the complex cation requires the symmetry operation $-x, -y, 1-z$.

cles. The Pd(II) ion is four coordinated and bonded in a bidentate fashion to two pyridine rings of the two dpa ligands (Fig. 2). The values of bond lengths and angles, describing the geometry of the complex are presented in Table 2. The distances between the metal center and the N-donor atoms (2.017(3) and 2.024(3) Å) correspond to the mean value of 2.017(4) Å calculated for the variously substituted Pd(dpa) units [23,25–30] (28 observations in the CSD [31]), and the dpa ligand bite angle is 86.16(12)°, rather small in relation to the Pd(II) center, smaller than in the other four Pd(dpa) complexes investigated by X-ray diffraction [22–24], where this value is in the range 87.8–91.8°. The two pyridine rings of the dpa moiety are twisted with respect to each other with a dihedral angle of 42.8(1)°. Again this angle is much larger than the values found in the CSD for Pd(dpa) complexes, which range from 16.2° to 31.3°. There seems to be an inverse relationship between the dpa ligand bite angle and the degree of mutual bending of the pyridine rings of the

Table 2
Selected bond distances (Å) and angles (°)

Bond distance (Å)	Bond angle (°)		
Pd(1)–N(2)	2.017(3)	N(2) ^a –Pd(1)–N(1)	93.84(12)
Pd(1)–N(1)	2.024(3)	N(2)–Pd(1)–N(1)	86.16(12)
N(1)–C(1)	1.341(4)	C(1)–N(1)–Pd(1)	121.1(2)
C(1)–N(3)	1.391(4)	N(1)–C(1)–N(3)	119.2(3)
N(2)–C(6)	1.342(4)	C(6)–N(2)–Pd(1)	121.2(2)
C(6)–N(3)	1.391(4)	N(2)–C(6)–N(3)	119.4(3)
		C(1)–N(3)–C(6)	123.4(3)

^a Atom was generated by inversion.

dpa. The chelate six-membered ring adopts a boat conformation with Pd1 and N3 in the flagpole positions, pointing in the same direction, although the deviation of N3 from the plane of the chelate is smaller than that of Pd1 (0.374(4) versus 0.842(4) Å, respectively). Two chloride anions (Cl2 and its translational equivalent along *b*) are located above and below the PdN₄ plane but the value of the Pd···Cl⁻ distance (3.879(2) Å) excludes any bonded interaction.

The solvent water molecules act as double donors to the chloride atoms and either do not accept hydrogen bonds (O2w) or act as single acceptor (O1w) from N–H group of the ligand. Each chloride anion accepts four hydrogen bonds from four neighboring water molecules, with an average O(H)···Cl distance of 3.203(30) Å. The water molecules and the chloride ions form hydrogen bonded tapes oriented along the *c* axis and consisting of R₄²(8) synthons, as shown in Fig. 3. A search of the CSD [31] affords 534 structures with the water–chloride R₄²(8) motif, neverthe-

less, this type of water–chloride cluster seems to have been overlooked in studies on halide ion hydration [32,33]. The hydrogen bond parameters are listed in Table 3. Uninterrupted tapes formed by R₄²(8) synthons connected in a spiro fashion bind together the columns of Pd(II) cations complexed by the organic ligand. Within the columns, weak off-face stacking interactions between one of the pyridine rings (N2, C6, C7, C8, C9 and C10) and its symmetry equivalent ($-1/2 - x, 1/2 - y, 1 - z$) are observed with the distance between the centroids equal to 4.135(3) Å (Fig. 4).

3.3. Reactions of *cis*-[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ with MeCOMet-Gly and MeCOHis-Gly

The reactions between *cis*-[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ and the *N*-acetylated dipeptides, MeCOMet-Gly and MeCOHis-Gly, were carried out at 2.0 < pH < 2.5 and at two different temperature, 25 and 60 °C. The schematic presentations of the investigated reactions are given in Fig. 5. In the reaction between this Pd(II) complex and the MeCOMet-Gly peptide, regioselective cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine was observed. This hydrolytic reaction can be followed successfully using ¹H NMR spectroscopy. The mixing of the palladium(II) complex with an equimolar amount of MeCOMet-Gly resulted in the spontaneous coordination of the palladium(II) com-

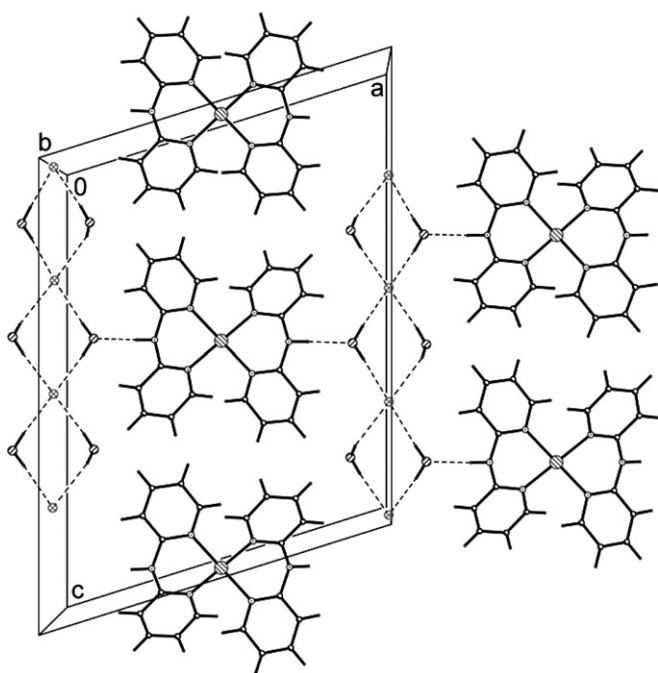


Fig. 3. Supramolecular R₄²(8) motifs consisting of hydrogen bonded chloride anions and water molecules join together into tapes in a spiro mode. The tapes bind to the metal–organic regions via water molecules acting as acceptors of protons from the N–H groups of the ligand.

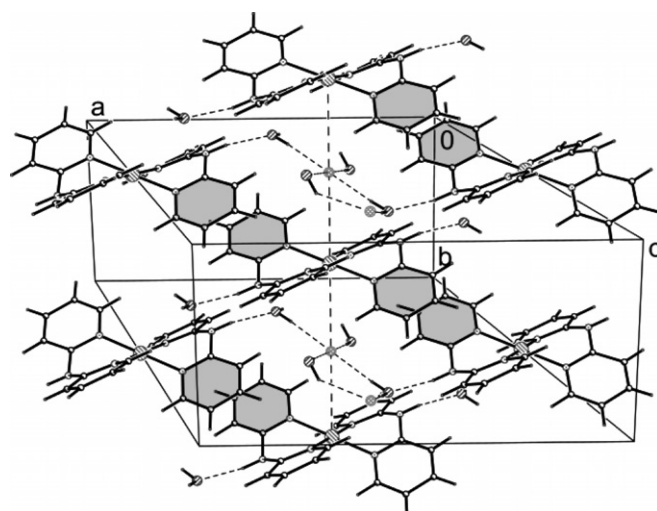


Fig. 4. Off-face stacking of the ligands.

Table 3
Intermolecular hydrogen bond geometry in the crystal of [Pd(dpa)₂]Cl₂ · 4H₂O

	D–H (Å)	D···A (Å)	H···A (Å)	D–H···A (°)	Symmetry operations on A
N3–H3N···O1W	0.90	2.901(4)	2.01	168	$-1 - x, y, 0.5 - z$
O1W–H1W···Cl2	0.85	3.196(3)	2.35	173	
O1W–H2W···Cl1	0.85	3.224(2)	2.38	173	
O2W–H3W···Cl1	0.85	3.237(4)	2.53	141	
O2W–H4W···Cl2	0.85	3.159(3)	2.31	175	

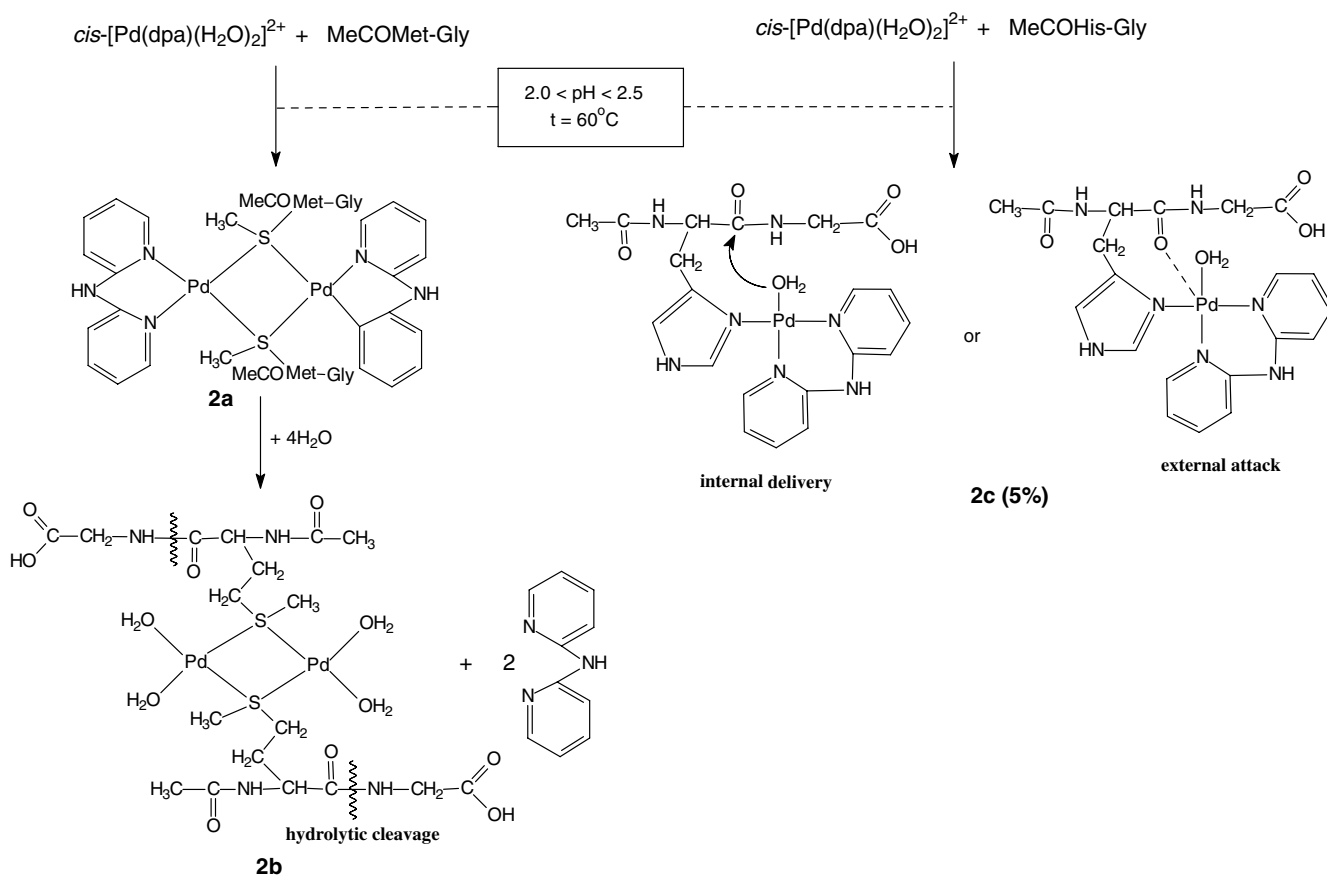


Fig. 5. Different pathways of the hydrolytic reactions between $cis\text{-[Pd(dpa)(H}_2\text{O)}_2]^{2+}$ and the *N*-acetylated dipeptides, MeCOMet-Gly and MeCOHis-Gly, in the pH range $2.0 < \text{pH} < 2.5$ and at 60°C . The regioselective cleavage of the amide bond in the peptide containing a methionine residue.

plex to the sulfur atom of the methionine residue. The binding of palladium(II) to the methionine side chain is very fast and can be easily detected in the ^1H NMR spectrum, as was already explained for the reaction of the Pd(II) complexes with the Met-Gly peptide. The resonance at 3.94 ppm corresponding to the glycine protons of the non-hydrolyzed MeCOMet-Gly decreased while that at 3.60 ppm for free glycine increased. Upon addition of glycine to the reaction mixture, its resonance was enhanced. The amounts of the non-hydrolyzed peptide and the hydrolysis products were determined from the known initial concentration of MeCOMet-Gly and from the integrated resonance of the free glycine. Some of the liberated glycine reacts with the catalyst to form a small amount of the $cis\text{-[Pd(dpa)(Gly-N,O)]}^+$ complex, which is easily detected by ^1H NMR spectroscopy by the resonance at 3.52 ppm. Indeed, the same complex is formed upon the mixing of equimolar amounts of $cis\text{-[Pd(dpa)(H}_2\text{O)}_2]^{2+}$ and glycine. The catalytic ability of the $cis\text{-[Pd(dpa)(H}_2\text{O)}_2]^{2+}$ complex in the investigated reaction was determined by measuring the amount of the hydrolyzed MeCOMet-Gly with time under the same experimental conditions. The concentrations of the free and the hydrolyzed MeCOMet-Gly were determined every 30 min and the reaction was followed for 72 h. It was found that 25% of the MeCOMet-Gly had hydrolyzed at 60°C after 2 h, and 90% when the reac-

tion was carried out for 72 h. When the reaction was performed at 25°C , only 40% of the MeCOMet-Gly had hydrolyzed after 10 days of reaction.

The hydrolytic reactions of methionine-containing peptides with palladium(II) complexes have been studied in great detail by Milović and Kostić [7]. From the NMR spectra, it was concluded that different promoters produce different hydrolytically active palladium(II)–peptide complexes. When the promoter was $[\text{PdCl}_4]^{2-}$, the active form is a mononuclear palladium(II)–peptide complex, whereas with $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ as promoter, a binuclear complex was formed, with the two sulfur atoms of the two methionine side chains as bridges and water molecules in unspecified terminal positions. It was shown that this binuclear complex was more efficient than the corresponding mononuclear complex in promoting the hydrolysis of the scissile amide bond. Additionally, it was found that with methionine-containing peptides and $cis\text{-[Pd(en)(H}_2\text{O)}_2]^{2+}$ (en is ethylenediamine), $cis\text{-[Pd}(\text{Me}_4\text{en})(\text{H}_2\text{O)}_2]^{2+}$ (Me_4en is *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine), and $trans\text{-[Pd}(\text{py})_2(\text{H}_2\text{O)}_2]^{2+}$ (py is pyridine) complexes, the nitrogen coordinated ligands were replaced with water molecules, and presumably the same active complex was formed as from $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ [34]. These results are in agreement with results recently obtained in the reactions of MeCOMet-Gly with the series palladium(II) complexes of the type $cis\text{-[Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$.

$[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (L is 1,2-propylenediamine, isobutylenediamine, 1,2-diaminocyclohexane, *N*-methylethylenediamine) [8]. As is shown in Fig. 5, from the intermediate binuclear palladium(II)–peptide complex **2a**, the a bidentate dpa ligand had been displaced by water molecules, forming the catalytically active palladium(II)–peptide complex **2b**. The replacement of the chelated dpa ligand by water molecules is very fast and this reaction is additionally supported by the *trans*-effect of the bridged sulfur atom of the methionine side chain and the acidic medium. The binuclear complex **2b** was also observed by Chen et al. in the reaction of *cis*- $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and *trans*- $[\text{Pd}(\text{py})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ with MeCOMet-Gly [34]. As all the aqua ligands in complex **2b** are in the *cis* position to the substrate, any one of them can be delivered to the scissile peptide bond.

In the reaction between *cis*- $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and MeCOHis-Gly at $2.0 < \text{pH} < 2.5$ and at 60°C , cleavage the amide bond of neither His-Gly nor MeCO-His was observed. The intensities of the resonances at 3.94 ppm for the glycine protons and 2.00 ppm for the methyl protons of free MeCOHis-Gly remained unchanged under these experimental conditions even when the reaction was prolonged to 7 days. During this time, the resonances at 3.60 ppm for free glycine and 2.08 ppm for the methyl protons of acetic acid, both possible hydrolytic products if cleavage of the amide bonds occurs, did not appear in the ^1H NMR spectrum. The schematic presentation of this reaction is given in Fig. 5. MeCOHis-Gly was used as a model peptide for the study of the mechanism of the regioselective cleavage of the amide bond catalyzed by *cis*- $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ type complexes (L is a bidentate diamine ligand) [1–3,5,7,35]. It was shown that in the reaction between this peptide and *cis*- $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complexes at $\text{pH} < 3$, five palladium(II)–peptide products were formed [1]. These complexes were distinguished on the basis of the chemical shifts of two imidazole protons, H-2 and H-5. Experiments with MeCOHis-Gly selectively methylated at the N-1 or N-3 atom of imidazole and *cis*- $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ showed that only the palladium(II) complex with monodentate coordination to the N-3 atom of imidazole can affect the cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of histidine; none of the four other modes of coordination is effective [2]. These findings were explained in terms of two possible limiting mechanisms, external and internal, for the hydrolytic cleavage of the peptide bond promoted by palladium(II) [1–3]. As can be seen from Fig. 5, both of these mechanisms presented for the palladium(II)–peptide complex **2c** require the close approach of the pendant catalyst to the adjacent peptide bond, and in both cases the steric bulk of the palladium(II) complex hinders this crucial interaction. The *cis*- $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex is sterically very demanding because the two bulky pyridine rings in the dpa ligand, contain a large π -electron density and are close to the palladium(II) center and thus hinder its approach to the MeCOHis-Gly. It has been shown that in the reaction with this peptide in the pH range 2.0–2.5 and at 60°C only 5%

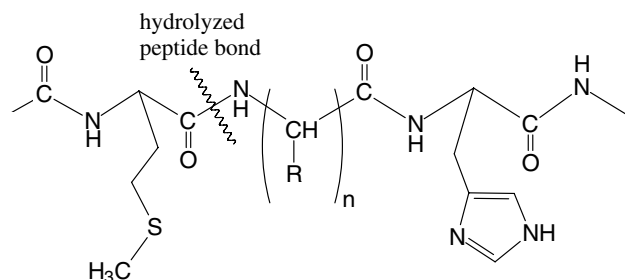


Fig. 6. Schematic presentation of the possible regioselective cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine in the proposed polypeptide containing both methionine and histidine residues promoted by the *cis*- $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex.

of the *cis*- $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ had reacted after 7 days of reaction. The very slow reaction of this complex with the MeCOHis-Gly peptide can be attributed to the large steric hindrance between the dpa ligand of the palladium(II) complex and the entering imidazole ring of the histidine side chain, finally resulting in the total inhibition of the investigated hydrolytic reaction.

4. Conclusions and prospects

Summing up, the sole product of the reaction between *cis*- $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ or *cis*- $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and the peptides Met-Gly or His-Gly is the square-planar $[\text{Pd}(\text{dpa})_2]^{2+}$ complex, indicating that no hydrolysis of the peptide bond occurs in the pH range 2.0–2.5, neither at 25°C nor at 60°C . On the other hand, the reaction of the *cis*- $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex with the MeCOHis-Gly or MeCOMet-Gly peptides under the same experimental conditions is remarkably selective in the cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine. The schematic representation of the regioselective hydrolytic cleavage of the amide bond in the theoretically proposed polypeptide containing both methionine and histidine residues is given in Fig. 6. The modes of coordination of *cis*- $[\text{Pd}(\text{dpa})\text{Cl}_2]$ in the reactions with the non-acetylated Met-Gly and His-Gly peptides and the total steric inhibition of the hydrolytic reaction of MeCOHis-Gly peptide with the *cis*- $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex can be attributed to the steric bulk of the palladium(II) complex. This finding should be taken into consideration in designing new palladium(II) complexes for the regioselective cleavage of peptides and proteins. Studies aimed at investigating these new possible synthetic metalpeptidases are in progress.

5. Supplementary material

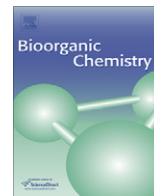
CCDC 622748 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

Acknowledgements

This work was funded in part by the Ministry of Science and Environmental Protection of the Republic of Serbia (Project No. 142008B). Also part of the financial support was obtained from the Polish Ministry of Education and Science Grant 4T09A18525.

References

- [1] T.N. Parac, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 51.
- [2] T.N. Parac, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 5946.
- [3] S.U. Milinković, T.N. Parac, M.I. Djuran, N.M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 2771.
- [4] X. Chen, L. Zhu, H. Yan, X. You, N.M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1996) 2653.
- [5] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Polyhedron* 19 (2000) 959.
- [6] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Monatsh. Chem.* 130 (1999) 613.
- [7] N.M. Milović, N.M. Kostić, in: A. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems, Palladium(II) and Platinum(II) Complexes as Synthetic Peptidases*, vol. XXXVIII, Marcel Dekker, New York, 2001, p. 145.
- [8] D.P. Ašanin, S. Rajković, D. Molnar-Gabor, M.I. Djuran, *Monatsh. Chem.* 135 (2004) 1445.
- [9] L. Zhu, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.* 31 (1992) 3994.
- [10] M.I. Rauterkus, S. Fakih, C. Mock, I. Puscasu, B. Krebs, *Inorg. Chim. Acta* 350 (2003) 355.
- [11] G. Mehal, R. van Eldik, *Inorg. Chem.* 24 (1985) 4165.
- [12] M.I. Djuran, E.L.M. Lempers, J. Reedijk, *Inorg. Chem.* 30 (1991) 2648.
- [13] CrystAlis CCD software. Version 1.171 Oxford Diffraction, Oxfordshire, England, 2000.
- [14] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A* 46 (1990) 467.
- [15] G.M. Sheldrick, *SHELXL-97: Program for the Refinement of Crystal Structures*, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.
- [16] *Stereochemical Workstation Operation Manual*, Release 3.4. Siemens Analytical X-ray Instruments, Inc., Madison, WI, 1989.
- [17] A.F.M. Siebert, Ph.D. Dissertation, University of Bochum, Germany, 1995, p. 166.
- [18] S.L. Best, T.K. Chattopadhyay, M.I. Djuran, R.A. Palmer, P.J. Sadler, I. Sovago, K. Varnagy, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 2587.
- [19] T.G. Appleton, *Coord. Chem. Rev.* 166 (1997) 313.
- [20] T. Soldatović, Ž.D. Bugarčić, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 1472.
- [21] M.L. Tobe, J. Burgess, *Inorganic Reaction Mechanisms*, Addison-Wesley/Longman, Essex, 1999.
- [22] Wen-Rui Yao, Ze-Hua Liu, Qian-Feng Zhang, *Acta Crystallogr., Sect. C* 59 (2003) m139.
- [23] M.J. Rauterkus, S. Fakih, C. Mock, I. Puscasu, B. Krebs, *Inorg. Chim. Acta* 350 (2003) 355.
- [24] Yue Wang, Y. Mizubayashi, M. Odoko, N. Okabe, *Acta Crystallogr., Sect. C* 61 (2005) m67.
- [25] M.R. Buchmeiser, K. Wurst, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 11101.
- [26] C. Seward, Wen-li Jia, Rui-Yao Wang, Suning Wang, *Inorg. Chem.* 43 (2004) 978.
- [27] M.R. Buchmeiser, S. Lubbad, M. Mayr, K. Wurst, *Inorg. Chim. Acta* 345 (2003) 145.
- [28] J. Silberg, T. Schareina, R. Kempe, K. Wurst, M.R. Buchmeiser, *J. Organomet. Chem.* 622 (2001) 6.
- [29] T. Schareina, G. Hillebrand, H. Fuhrmann, R. Kempe, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2001) 2421.
- [30] S. Fakih, Wing Chau Tung, D. Eierhoff, C. Mock, B. Krebs, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 631 (2005) 1397.
- [31] (a) F.H. Allen, O. Kennard, *Chem. Des. Autom. News* 8 (1993) 1; (b) F.H. Allen, *Acta Crystallogr., Sect. B* 58 (2002) 380.
- [32] W.H. Robertson, M.A. Johnson, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 54 (2003) 173.
- [33] S.S. Xantheas, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 9703.
- [34] X. Chen, X. Luo, Y. Song, S. Zhou, L. Zhu, *Polyhedron* 17 (1998) 2271.
- [35] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Polyhedron* 18 (1999) 3611.



Reaction of $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})]^-$ with the *N*-acetylated dipeptide *L*-methionyl-*L*-histidine: Selective platination of the histidine side chain by intramolecular migration of the platinum(II) complex

Marija D. Živković, Snežana Rajković, Miloš I. Djuran *

Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 January 2008

Available online 8 April 2008

Keywords:

Platinum(II) complex

Peptides

Methionine

Histidine

Intramolecular migration

ABSTRACT

The reaction of the monofunctional $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})]^-$ complex, in which Gly-Gly is the dipeptide glycyl-glycine coordinated through two nitrogen and oxygen atoms, with the *N*-acetylated dipeptide *L*-methionyl-*L*-histidine (MeCOMet-His) studied by ^1H NMR spectroscopy. All reactions were carried out in 50 mM phosphate buffer at pD 7.4 and at 25 °C. In the initial stage of the reaction, the platinum(II) complex forms the kinetically favored $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})(\text{MeCOMet-His-S})]^-$ complex, with unidentate coordination of the MeCOMet-His dipeptide through the sulfur atom of the methionine residue. In the second stage of the reaction, complete intramolecular migration of the $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})]$ unit from the sulfur to the N3 nitrogen atom of imidazole was observed and a new platinum(II)-peptide complex, $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})(\text{MeCOMet-His-N3})]^-$ was formed. In comparison with previous results obtained for the reaction of $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ with different methionine- and histidine-containing peptides, this migration reaction was sufficiently fast and strongly selective to the N3 atom of the imidazole ring of the histidine side chain. This study is an important step in the development of new platinum(II) complexes for selective covalent modification of peptides and proteins.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, there has been an increasing interest in the interactions between platinum complexes and sulfur-containing biomolecules [1]. These interactions are thought to be responsible for a variety of biological effects, such as the inactivation of Pt(II) antitumor complexes, the development of cellular resistance to platinum drugs and toxic side effects, such as nephrotoxicity [2]. The thioether-containing amino acid methionine plays an important role in the metabolism of platinum anticancer drugs.

On the other hand, the presence of histidine has been established in a large number of the active centers of enzymes [3] and the histidyl residue is probably the most important metal-binding site in biological systems [4,5]. The heterocyclic imidazole ring system in the histidine side chain provides an ambidentate ligand with two competitive N3 and N1 donor atoms. In most metal complexes with histidine-containing ligands, the imidazole ring of histidine is coordinated through the N3 nitrogen [6–8] but relatively few complexes in which histidine is coordinated only through the N1 atom have been well characterized [9]. In biological systems, there are numerous metalloproteins in which a metal ion

is bound to a histidine imidazole nitrogen only through N1 [10] (e.g. hemoglobin) but there are also metalloproteins in which a metal at the active site is bound through N3 of histidine [11] (e.g. Zn in superoxide dismutase) or has a mixed donor site sphere [11] [e.g. Cu in superoxide dismutase: (N3)₂, N1_{term}, N1_{bridge}] or where identical metals display different environments [12] [e.g. Cu₁-(N3)₂ and Cu₃(N1)₈ in ascorbate oxidase].

Peptides containing both methionine and histidine amino acids in the side chains have been shown to be good model molecules for the study their interactions with different platinum(II) complexes. Recently, it was found that platinum(II) complexes in the reactions with different methionine- and histidine-containing peptides initially react with the methionine sulfur atom while in the later stages, an intramolecular migration of the platinum(II) complex from a kinetically favored methionine side chain to a thermodynamically preferred imidazole N1 atom was observed [13–15]. Later results were surprising and in disagreement with those previously reported that nitrogen atoms from the imidazole ring of the amino acid histidine can not displace *S*-bound *L*-Met on a Pt(II) complex [16]. The discovering that an *S*-bound thioether ligand can be selectively displaced by one of the nitrogen atoms of the imidazole ring in the histidine side chain opens the possibility of designing new platinum complexes for selective covalent modification of proteins. In this work, an attempt was made to gain

* Corresponding author. Fax: +381 34 335040.

E-mail address: djuran@kg.ac.yu (M.I. Djuran).

further insight into sulfur–nitrogen migration from a ^1H NMR spectroscopic study of the reaction of $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})]^-$ with *N*-acetylated l -methionyl- l -histidine.

2. Experimental

2.1. Reagents

Distilled water was demineralized and purified to a resistance greater than $10\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$. The compounds D_2O , DNO_3 , NaOD and $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ were obtained from the Aldrich Chemical Co. The dipeptides, glycyl-glycine (Gly-Gly), *S*-methylglutathione and l -methionyl- l -histidine (Met-His), were obtained from the Sigma Chemical Co. All common chemicals were of reagent grade. The terminal amino group in Met-His was acetylated by standard methods [17].

2.2. Syntheses of the platinum(II) complex

The complex $\text{K}[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})\text{I}]$ was prepared by a modification of a literature method [18]. To $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ (0.2076 g , $5.00 \times 10^{-4}\text{ mol}$) dissolved in 5 cm^3 of water was added 0.3320 g ($2.00 \times 10^{-4}\text{ mol}$) of KI and the mixture was heated at $60\text{ }^\circ\text{C}$ for 5 min. Subsequently, an aqueous solution (5 cm^3) of the peptide glycyl-glycine (0.0660 g , 0.5 mM) was added to the obtained reaction mixture and the heating ($60\text{ }^\circ\text{C}$) with stirring was continued for 30 min. During this time, the pH of the reaction mixture was controlled every 5 min and adjusted to about 6.5 with 1 M KHCO_3 solution. The obtained solution was concentrated to 5 cm^3 under vacuum and then left at room temperature over night. The obtained yellow crystals were filtered off, washed with ethanol and air dried. Yield 0.098 g (40%). Calculated for $\text{K}[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})\text{I}] = \text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3\text{IKPt}$ (FW = 491.18): C, 9.78; N, 5.70; H, 1.23%; found: C, 9.63; N, 5.81; H, 1.34%. ^1H NMR (D_2O , 200 MHz); $\delta = 3.99$ (s, 2H, CH_2) and $\delta = 3.62$ (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (D_2O , 200 MHz); $\delta = 51.72$ (CH_2); $\delta = 53.37$ (CH_2); $\delta = 182.55$ ($\text{C}=\text{O}$) and $\delta = 194.00$ (COO).

2.3. pH measurements

All pH measurements were made at room temperature. The pH meter (Iskra MA 5704) was calibrated with Fischer certified buffer solutions of pH 4.00 and 7.00. The results were converted into pD by the standard formula: $\text{pD} = \text{pH} + 0.41$ [19]. However, in conceptual references to acidity and basicity, the common symbol pH is used.

Elemental microanalyses for carbon, hydrogen, and nitrogen were performed at the Faculty of Chemistry of the University of Belgrade.

Table 1

Kinetic data for the reactions of Pt(II) complexes with thioether-containing ligands at $25\text{ }^\circ\text{C}$, where k_2 is the second-order rate constant

Reactants [complex + ligand]	pD value	$10^3 k_2/\text{M}^{-1}\text{ s}^{-1}$	Ref.
$[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+ + \text{l}$ -Methionine	4.31	14	[16]
$[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+ + \text{S}$ -Methylglutathione	5.41	33	[21]
$[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+ + \text{MeCOMet-His}^*$	4.40	44	[13]
$[\text{Pt}(\text{Gly-Met-S,N,N'})\text{I}] + \text{l}$ -Methionine	4.31	4.5	[13]
$[\text{Pt}(\text{Gly-Met-S,N,N'})\text{I}] + \text{S}$ -Methylglutathione	4.34	0.3	This work
$[\text{Pt}(\text{Gly-Met-S,N,N'})\text{I}] + \text{MeCOMet-His}$	4.40	8	This work
$[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})\text{I}]^- + \text{S}$ -methylglutathione	4.21	40	This work
$[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})\text{I}]^- + \text{MeCOMet-His}$	4.11	70	This work

* MeCOMet-His is *N*-acetylated l -methionyl- l -histidine.

2.4. ^1H NMR measurements

The rate constants presented in Table 1 were obtained from ^1H NMR data measured using a Varian Gemini 200 spectrometer. The reactions were carried out in NMR tubes at $25\text{ }^\circ\text{C}$ in 50 mM phosphate buffer at pD 7.4 in D_2O as the solvent. The platinum(II) complex and the peptide were mixed in a 1:1 molar ratio with 20 mM initial concentrations of both reactants and a final volume of 0.6 cm^3 in the NMR tube. The internal reference was TSP (sodium trimethylsilylpropane-3-sulfonate). The values of the rate constants for these reactions were determined when the data from the early part of the reactions (up to 2 h) were fitted to a second-order process [20] by plotting $x/a_0(a_0-x)$ against t (a_0 is the initial concentration of the thioether ligand and x is the concentration of the Pt(II) complex with a *S*-bound thioether ligand at time t).

3. Results and discussion

The reaction of the monofunctional $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})\text{I}]^-$ complex, in which Gly-Gly is the dipeptide glycyl-glycine coordinated through two nitrogen and oxygen atoms, with the *N*-acetylated dipeptide l -methionyl- l -histidine (MeCOMet-His) was studied by ^1H NMR spectroscopy. This reaction was performed with equimolar amounts of the reactants in 50 mM phosphate buffer at pD 7.4 and at $25\text{ }^\circ\text{C}$. In the dipeptide MeCOMet-His, the terminal amino group had been acetylated to protect its coordination with platinum(II). The formation of the products in this reaction was monitored by ^1H NMR spectroscopic measurements of the chemical shifts of protons H2 and H5 of the imidazole ring in the histidine residue and the chemical shifts of the methyl protons in the methionine side chain. In the reaction with dipeptide MeCOMet-His the platinum(II) complex was stable under the above mentioned experimental conditions and release of chelated Gly-Gly ligand from Pt(II) first time was observed after 34 days. Two new signals at 3.82 and 3.86 ppm due to methylene glycine protons of the free Gly-Gly ligand were observed in the ^1H NMR spectrum. Addition of the dipeptide Gly-Gly to the reaction mixture caused an increase of these two signals. When the reaction of $[\text{Pt}(\text{Gly-Gly-N,N',O})\text{I}]^-$ with MeCOMet-His was carried out at a lower pD value ($2.0 \leq \text{pD} \leq 4.0$) release of Gly-Gly from Pt(II) was very fast and the replacement of this ligand with MeCOMet-His dipeptide almost finished within 1 h.

3.1. Selective intramolecular migration of platinum(II) complex

Recently, a selective intramolecular migration of a platinum(II) complex from the methionine sulfur to the imidazole N1 atom was observed in the reaction between $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$, in which dien is diethylenetriamine, with the *N*-acetylated dipeptide l -methionyl- l -histidine (MeCOMet-His) [13]. It was found that in the initial stages of this reaction, the $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ complex forms the kinetically favored $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-His-S})]^+$ complex with unidentate coordination of MeCOMet-His through the sulfur atom of the methionine residue. In the second stage of the reaction, an intramolecular migration of a $[\text{Pt}(\text{dien})]^{2+}$ unit from the sulfur to the nitrogen atom of imidazole was observed. By ^1H NMR measurements, it was shown that this migration reaction is very slow and strongly selective to the N1 atom of the imidazole ring of the histidine side chain. No migration reaction of the platinum(II) complex was observed in the reaction between $[\text{Pt}(\text{Gly-Met-S,N,N'})\text{Cl}]$ (Gly-Met is the dipeptide glycyl- l -methionine coordinated through the sulfur and two nitrogen atoms) and the dipeptide MeCOMet-His [13]. It was found that the $[\text{Pt}(\text{Gly-Met-S,N,N'})\text{Cl}]$ complex, with a more sterically hindered Gly-Met ligand, reacts slower with thioether-containing molecules than $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ and forms a more stable platinum–sulfur bond (Table 1) [13,16,21].

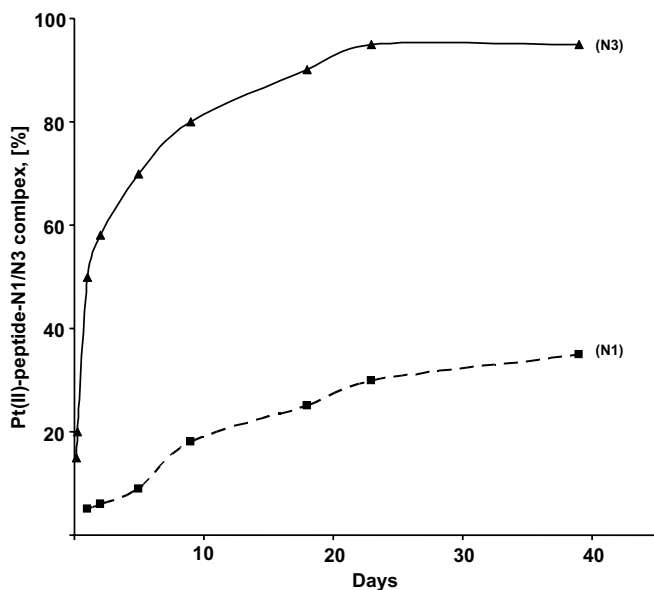


Fig. 1. Time dependence of Pt(II)-peptide-N1/N3 complex formation through the intramolecular migration of the Pt(II) complex from the methionine sulfur to the imidazole N1 ([Pt(dien)Cl]⁺ (■)) or N3 ([Pt(Gly-Gly-N,N',O)]⁻ (▲)) nitrogen atom in the reactions between [Pt(dien)Cl]⁺ and [Pt(Gly-Gly-N,N',O)]⁻ with the MeCOMet-His dipeptide.

consequence of the cleavage of the platinum(II)-sulfur bond, the platinum(II)-peptide complex [Pt(Gly-Gly-N,N',O)(MeCOMet-His-N3)]⁻ was formed (see Scheme 1). The total amount of [Pt(Gly-Gly-N,N',O)(MeCOMet-His-N3)]⁻ formed in the latter stages of the reaction between [Pt(Gly-Gly-N,N',O)]⁻ and MeCOMet-His can be calculated from the integral values of the signals for the protons H2 and H5 for free imidazole and the corresponding values of these protons due to the N3 platinum(II) bound imidazole ring. The total concentration of [Pt(Gly-Gly-N,N',O)(MeCOMet-His-N3)]⁻ formed after 10 days of reaction was ca. 80% (see Fig. 1). As can also be seen from Fig. 1, the intramolecular migration of the Pt(II) complex from the methionine sulfur to the imidazole N3 in the reaction of [Pt(Gly-Gly-N,N',O)]⁻ with the dipeptide MeCOMet-His was much faster in comparison with this process in the reaction of [Pt(dien)Cl]⁺ with the MeCOMet-His dipeptide [13]. The intramolecular migration reaction displaced through the N3 imidazole nitrogen atom proceeds to almost complete platination of the MeCOMet-His dipeptide in the case of [Pt(Gly-Gly-N,N',O)]⁻, while in the case of the [Pt(dien)Cl]⁺ complex, this platination reaction almost ceased with less than 40% coordinated to the N1 imidazole nitrogen atom (Fig. 1) [13].

3.2. Conclusions and prospects

The results from this study together with those obtained in previous studies [13–15] show that intramolecular migration of a platinum(II) complex from the S-bound thioether ligand to the nitrogen atom of the imidazole ring in histidine can occur under physiological pH conditions. In the reactions of [Pt(dien)Cl]⁺ with MeCOMet-His and [Pt(dien)(H₂O)]²⁺ with His-Met, His-Gly-Met and MeCOHis-Ala-Ala-Ala-MetNHPH peptides, intramolecular migration of the [Pt(dien)]²⁺ unit from the methionine sulfur to the imidazole N1 atom was observed [13–15]. This migration process proceeded very slowly with incomplete platination of the histidine side chain in the investigated peptides. However, no migration of the platinum(II) complex was observed in the reaction between [Pt(Gly-Met-S,N,N')Cl] and the dipeptide MeCOMet-His. This was explained through the fact that the latter complex reacts with the methionine sulfur atom five times slower than the

[Pt(dien)Cl]⁺ complex, forming thereby an extremely stable platinum(II)-sulfur bond [13].

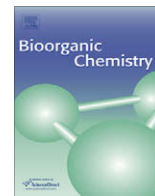
The present investigation shows that [Pt(Gly-Gly-N,N',O)]⁻ in comparison with the [Pt(dien)Cl]⁺ complex reacts approximately two times faster with the methionine sulfur atom from the dipeptide MeCOMet-His (see Table 1). This kinetically favored reaction forms thermodynamically labile platinum(II)-thioether bonds, which can be easily cleaved in the presence of a strong nucleophile at physiological pH values. In the reaction of [Pt(Gly-Gly-N,N',O)]⁻ with MeCOMet-His, an intramolecular migration of the platinum(II) complex from the S-bound thioether ligand to the imidazole ring in the histidine side chain was observed. This migration reaction is strongly selective to the N3 nitrogen atom of imidazole. In comparison with [Pt(dien)Cl]⁺ [13], the intramolecular migration reaction observed in the present study was much faster and proceeded to almost complete platination of the histidine side chain (see Fig. 1). The highest rate constant for [Pt(Gly-Gly-N,N',O)]⁻ in comparison with those of other platinum(II) complexes observed for reactions with sulfur-containing donors (Table 1) and the very rapid intramolecular migration of this complex in the reaction with MeCOMet-His can be attributed to the *trans*-effect of the deprotonated peptide nitrogen and the large electronegativity value of the coordinated oxygen atom in the *cis*-position to the Pt–X bond (X is I⁻ or –S–CH₃). Both these factors contribute to the weakness of the Pt–X bond and together with the large size of the iodido ligand should obviously be taken in consideration when explaining the very fast reactivity of [Pt(Gly-Gly-N,N',O)]⁻ with the MeCOMet-His dipeptide. These latest results for the selective platination of the imidazole ring in dipeptides containing both methionine and histidine amino acids displaced through the intramolecular migration of a platinum(II) complex from the S-bound thioether ligand to the nitrogen atoms of imidazole can be employed in the design of new platinum(II) complexes for both the complete and selective covalent modification of proteins. Studies aimed at investigating these hypotheses are in progress.

Acknowledgment

This work was funded in part by the Ministry of Science of the Republic Serbia (Project No.: 142008B).

References

- [1] P.J. Sadler, *Adv. Inorg. Chem.* 36 (1991) 1–48.
- [2] E.L.M. Lempers, J. Reedijk, *Adv. Inorg. Chem.* 37 (1991) 175–217.
- [3] F. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 17 (1978) 583–592.
- [4] R.J. Sundberg, R.B. Martin, *Chem. Rev.* 74 (1974) 471–517.
- [5] A.S. Brill, *Transition Metals in Biochemistry*, Springer-Verlag, New York, 1977, Chapt. 2.
- [6] K.A. Fraser, M.M. Harding, *J. Chem. Soc. A* (1967) 415–420.
- [7] I.A. Baidina, O.P. Slyudkin, S.V. Borisov, *Zh. Strukt. Khim.* 26 (1985) 139–142.
- [8] B. Evertsson, C. Lundgren, *Acta Chem. Scand.* 20 (1966) 2310–2311.
- [9] K. Krogh-Jespersen, J.D. Westbrook, J.A. Potenza, H.J. Schugar, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 7025–7031.
- [10] M. Perutz, *Nature (London)* 228 (1970) 726–734.
- [11] J.A. Tainer, E.D. Getzoff, K.M. Beem, J.S. Richardson, D.C. Richardson, *J. Mol. Biol.* 160 (1982) 181–217.
- [12] A. Messerschmidt, A. Rossi, R. Ladenstein, R. Huber, M. Bolognesi, G. Gatti, A. Marchesini, R. Petruzzelli, A. Finazzi-Agró, *J. Mol. Biol.* 206 (1989) 513–529.
- [13] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Aust. J. Chem.* 53 (2000) 645–649.
- [14] C.D.W. Fröhling, W.S. Sheldrick, *Chem. Commun.* (1997) 1737–1738.
- [15] M. Hahn, D. Wolters, W.S. Sheldrick, F.B. Hulsbergen, J. Reedijk, *J. Boil. Inorg. Chem.* 4 (1999) 412–420.
- [16] K.J. Barnham, M.I. Djuran, P. del S. Murdoch, P.J. Sadler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1994) 721–722.
- [17] L. Zhu, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.* 31 (1992) 3994–4001.
- [18] M. Watabe, M. Kai, M. Hayashi, K. Kamiyama, H. Okada, T. Takayama, *Journal of Inorganic Biochemistry* 81 (2000) 49–55.
- [19] A.K. Covington, M. Paabo, R.A. Robinson, R.G. Bates, *Anal. Chem.* 40 (1968) 700–706.
- [20] K.J. Laidler, *Chemical Kinetics*, 3rd ed., Harper & Row, New York, 1987, p. 22.
- [21] M.I. Djuran, E.L.M. Lempers, J. Reedijk, *Inorg. Chem.* 30 (1991) 2648–2652.
- [22] T.G. Appleton, F.J. Pesch, M. Wienken, S. Menzer, B. Lippert, *Inorg. Chem.* 31 (1992) 4410–4419.



Hydrolysis of the amide bond in methionine-containing peptides catalyzed by various palladium(II) complexes: Dependence of the hydrolysis rate on the steric bulk of the catalyst

Snežana Rajković, Biljana Đ. Glišić, Marija D. Živković, Miloš I. Djuran *

Department of Chemistry, University of Kragujevac, Faculty of Science, R. Domanovića 12, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 June 2009

Available online 17 July 2009

Keywords:

Methionine
Peptides
Palladium(II)
Catalyst
Hydrolysis

ABSTRACT

¹H NMR spectroscopy was applied to study the reactions of *cis*-[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺ complexes (L is en, pic and dpa) with the *N*-acetylated tripeptides L-methionylglycylglycine, MeCOMet–Gly–Gly, and glycyl–L-methionyl–glycine, MeCOGly–Met–Gly. All reactions were performed in the pH range 2.0–2.5 with equimolar amounts of the *cis*-[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺ complex and the tripeptide at 60 °C. The hydrolytic reactions of the *cis*-[Pd(en)(H₂O)₂]²⁺, *cis*-[Pd(pic)(H₂O)₂]²⁺ and *cis*-[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ complexes with MeCOMet–Gly–Gly were regioselective and only the amide bond involving the carboxylic group of methionine was cleaved. However, in the reactions of these three Pd(II) complexes with MeCOGly–Met–Gly, two amide bonds, Met–Gly and MeCO–Gly, were cleaved. From UV–Vis spectrophotometry studies, it was found that the rate-determining step of these hydrolytic reactions is the monodentate coordination of the corresponding Pd(II) complex to the sulfur atom of the methionine side chain. The rate of the cleavage of these amide bonds is dependent on the nature of the bidentate coordinated diamine ligand L (en > pic > dpa). The hydrolytic reaction of *cis*-[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺-type complexes with MeCOMet–Gly–Gly, containing the methionine side chain in the terminal position of the peptide, is regioselective while in the reaction of these Pd(II) complexes with MeCOGly–Met–Gly, none selective cleavage of the peptide occurs. This study contributes to a better understanding of the selective cleavage of methionine-containing peptides employing palladium(II) complexes as catalysts.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

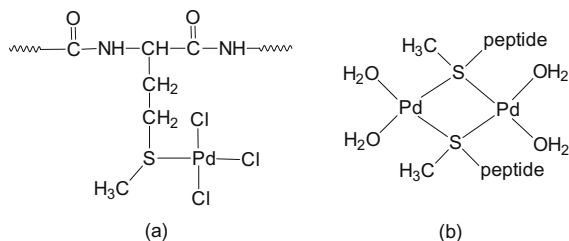
Recent years have witnessed an increasing interest in the study of the interactions of platinum(II) and palladium(II) complexes with sulfur- and histidine-containing peptides and proteins [1–4]. Interest in the study of these interactions also became of capital importance after the discovery that platinum(II) [5] and palladium(II) [6–13] aqua complexes can be promising reagents for the hydrolytic cleavage of the above-mentioned peptides. These complexes bind to the heteroatom in the side chain of methionine [5–9] or histidine [10–13] and promote cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of this anchoring amino acid. The mechanism of this regioselective hydrolytic reaction catalyzed by platinum(II) and palladium(II) aqua complexes is not yet completely understood. For clarification of this mechanism, it was necessary to investigate the influence of different factors, such as pH,

temperature and steric effects of the substrate and catalyst, on this hydrolytic reaction.

The hydrolytic reactions of methionine-containing peptides with palladium(II) complexes were studied by Kostić and coworkers in great detail [14]. From NMR spectra, they concluded that different promoters produce different hydrolytically active palladium(II)–peptide complexes. When the promoter was [PdCl₄]²⁻, the active form is a mononuclear palladium(II)–peptide complex (a), while when the promoter was [Pd(H₂O)₄]²⁺, a dinuclear complex with the two sulfur atoms of the two methionine side chains as bridges and water molecules in unspecified terminal positions was produced (b). It was shown that this dinuclear complex is more efficient than the corresponding mononuclear complex in promoting hydrolysis of the scissile amide bond. Additionally, it was also found that with methionine-containing peptides and *cis*-[Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ (en is ethylenediamine), *cis*-[Pd(Me₄en)(H₂O)₂]²⁺ (Me₄en is *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine) and *trans*-[Pd(py)₂(H₂O)₂]²⁺ (py is pyridine) complexes, the nitrogen coordinated ligands were replaced with water molecules and, presumably, the same active complex (b) as from [Pd(H₂O)₄]²⁺ was formed [15].

* Corresponding author. Fax: +381 (34) 335 040.

E-mail address: djuran@kg.ac.rs (M.I. Djuran).



The latter results are in accordance with those recently obtained in one of our laboratories [16] for the reaction of MeCOMet–Gly with different cis -[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺-type complexes (L is bidentate coordinated en; 1,2-propylenediamine, 1,2-pn; *N*-methylethylenediamine, Meen; *iso*-butylenediamine, ibn; or Me₄en). With all these complexes, in the pH range 2.0–2.5 and at 60 °C, the rate of the regioselective cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine was approximately the same and the amount of the hydrolyzed MeCOMet–Gly peptide was between 80% and 88% after 4 h. This was explained by the existence of the same catalytically active form in the reaction of cis -[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺ complexes with MeCOMet–Gly peptide complex obtained by the replacement of the chelated diamine ligand from the initially formed dinuclear palladium(II)–peptide complex. The above results for MeCOMet–Gly peptide are not in accordance with those obtained for cis -[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺-type complexes and the MeCOHis–Gly peptide under the same experimental conditions. The observed rates of hydrolytic reaction for the MeCOHis–Gly peptide were investigated in terms of steric hindrance of the chelating diamine on the palladium(II) complexes and the results showed that the rate of the hydrolysis decreased as the steric bulk of the palladium(II) complex increased (en > 1,2-pn > ibn > 1,2-dach > Meen > Me₄en) [17]. Different effects of the palladium(II) catalyst on the hydrolysis rate in reactions with histidine- and methionine-containing peptides can be explained by the different reaction mechanisms of the hydrolytic cleavage of the amide bonds in these peptides.

A better knowledge of the coordination chemistry of methionine-containing peptides with palladium(II) complexes is necessary for an understanding of the effects of palladium(II) complexes on the rate of hydrolysis and the mechanism of the hydrolytic reaction of methionine-containing peptides.

The present study deals with the hydrolysis of the peptide bond in the *N*-acetylated tripeptides: L-methionylglycylglycine, MeCOMet–Gly–Gly, and glycyl–L-methionyl–glycine, MeCOGly–Met–Gly, catalyzed by various palladium(II) complexes of the type cis -[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺, in which L is the bidentate coordinated ethylenediamine (en), 2-picolylamine (pic) and 2,2-dipyridylamine (dpa) ligand.

2. Experimental

2.1. Reagents

Distilled water was demineralized and purified to a resistance greater than 10 MΩ cm⁻¹. The compounds D₂O, DNO₃, NaOD, ethylenediamine (en), 2-picolylamine (pic), 2,2'-dipyridylamine (dpa) and K₂PdCl₄ were obtained from the Aldrich Chemical Co. All common chemicals were of reagent grade. The tripeptides L-methionylglycylglycine (Met–Gly–Gly) and glycyl–L-methionylglycine (Gly–Met–Gly) were obtained from the Sigma Chemical Co. The terminal amino group in the peptides was acetylated by standard methods [6]. As all the solutions were made in D₂O; hence, all the aqua ligands were actually D₂O. However, for simplicity and consistency with our previous publications, the D₂O ligand is shown as H₂O.

2.2. Synthesis of the Pd(II) complexes

The palladium(II) complexes of the type cis -[Pd(L)Cl₂] (L is en, pic or dpa ligand) were synthesized according to the procedures published in the literature [18–20]. K₂PdCl₄ was dissolved in water and mixed with an equimolar amount of ligand (L). The pH of the solution was adjusted to ca. 3 by addition of 1 M HCl and the mixture was stirred at 80 °C for 2 h. All complexes were crystallized from water at room temperature. The pure complexes were obtained by recrystallization from a small amount of water and cooling. The experimental results of the elemental analysis for C, H and N parameters for all palladium(II) complexes were in accordance with the theoretical values calculated for cis -[Pd(L)Cl₂]. The chlorido complexes were converted into the corresponding diaqua complexes by treatment with 1.95 equiv. of AgNO₃ at pH 2.0 according to a previously published method [21]. In each case, the formed solid AgCl was removed by filtration in the dark and fresh stock solutions of the aqua complexes were stored in a refrigerator until used for reaction with the peptides.

2.3. ¹H NMR measurements

Proton NMR spectra of D₂O solutions containing TSP (3-trimethylsilylpropane-1-sulfonate) as the internal reference were recorded with a Varian Gemini 200 spectrometer. Equimolar amounts of the palladium(II) complex and the peptide were mixed in an NMR tube. The final solution was 10 mM in each reactant. The pH was varied in the range 2.0–2.5. All reactions were performed at 60 °C.

2.4. UV–Vis measurements

The reactions between *N*-acetylated L-methionine, MeCOMet and the cis -[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺-type complexes (L is en, pic or dpa) were followed on a Perkin Elmer Lambda 35 double-beam spectrophotometer equipped with thermostated 1.00-cm quartz Suprasil cells by measuring the change in absorbance at suitable wavelengths as a function of time. The concentration of the palladium(II) complex was held constant at 1.0 × 10⁻⁴ M and the concentration of MeCOMet was varied between 2.2 × 10⁻³ and 6.5 × 10⁻³ M. The pH of the reaction mixture was 2.5. After preliminary repetitive scan experiments in the 260–400 nm range to search for isobestic points and spectral changes, the kinetics were studied by measuring the change in absorbance at 280, 292 and 282 nm for cis -[Pd(en)(H₂O)₂]²⁺, cis -[Pd(pic)(H₂O)₂]²⁺ and cis -[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺, respectively, as a function of time. All reactions were performed at 298 K. The pseudo-first-order rate constants (k_{obs} , s⁻¹) were obtained graphically from a plot of ln(A_x–A_t) versus time [22] (A_t and A_x are the absorbance of the reaction mixture at time *t* and at the end of the reaction, respectively usually after 10 half-lives).

2.5. pH measurements

All pH measurements were realized at 25 °C using an Iskra MA 5704 pH meter, which had been calibrated with Fischer certified buffer solutions of pH 4.00. The results were not corrected for the deuterium isotope effect.

3. Results and discussion

In the present study, the hydrolytic reactions between various palladium(II) complexes of the type cis -[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺ (L is bidentate coordinated ethylenediamine, en; 2-picolylamine, pic; 2,2-dipyridylamine, dpa) and the *N*-acetylated tripeptides

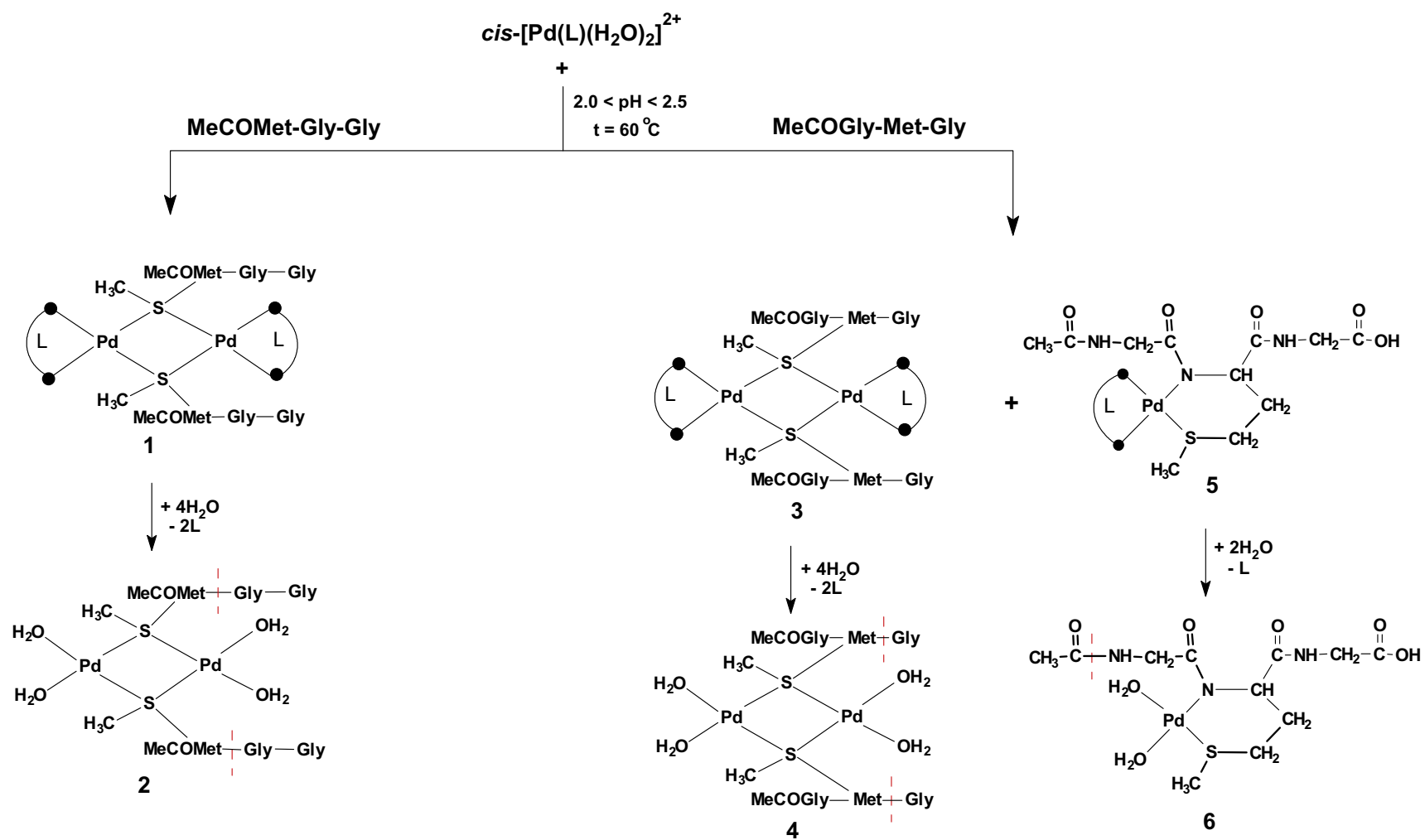


Fig. 2. The reaction scheme of $cis-[Pd(L)(H_2O)_2]^{2+}$ -type complexes (L = en, pic and dpa) with MeCOMet-Gly-Gly and MeCOGly-Met-Gly peptides in the pH range 2.0 < pH < 2.5 and at 60 °C.

coordinated en ligand, and the growth of the signal at 3.36 ppm, due to free H_2en^{2+} ligand. In the reactions of this tripeptide with the other two complexes, $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, owing to the overlap of the signals corresponding to the protons of the free pic and dpa ligands with those of the palladium(II)–peptide complex **1**, giving a multiplet in the region 7.00–8.50 ppm, the displacement of these two ligands by water molecules could not be followed by ^1H NMR spectroscopy.

It was found that in the reactions of MeCOMet–Gly–Gly with the investigated $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -type complexes, the ^1H NMR resonance at δ 3.98 ppm, corresponding to the glycine protons (glycine next to the methionine) of the none hydrolyzed peptide decreased, while that at δ 3.89 ppm for free Gly–Gly increased. Upon addition of Gly–Gly to the reaction mixture, the resonance at 3.89 ppm was enhanced. The amounts of unreacted tripeptide and the hydrolysis products were determined from the known initial concentration of MeCOMet–Gly–Gly and from the integrated resonance of the free Gly–Gly. The catalytic ability of each $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -type complex in the investigated reactions was determined by measuring the amount of the hydrolyzed peptide with time under the same experimental conditions; see Fig. 3a. From this figure, it can be concluded that the rate of hydrolysis decreased as the steric bulk of the palladium(II) complex increased ($\text{en} > \text{pic} > \text{dpa}$). In the reaction between $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and MeCOMet–Gly–Gly more than 95% of the Met–Gly amide bond had been hydrolyzed after 4.5 h. The reaction of this tripeptide with the other two complexes was much slower with 55% of the Met–Gly amide bond having been cleaved during this time with the $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex and only 15% with the $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex (Fig. 3a). The reaction of MeCOMet–Gly–Gly with these three Pd(II) complexes was followed for 30 h. It was found that with $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, the hydrolytic cleavage of MeCOMet–Gly–Gly was almost completed while with the $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex only 35% of this tripeptide had been cleaved during this time. No cleavage of the other amide bonds in MeCOMet–Gly–Gly was observed during this time.

3.2. Reactions of the palladium(II) complexes with MeCOGly–Met–Gly

When an equimolar amount of $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -type complex was incubated with MeCOGly–Met–Gly at $2.0 < \text{pH} < 2.5$ at 60°C , two palladium(II)–peptide complexes, **3** and **5**, were formed in a molar ratio 3:1, respectively; see Fig. 2. The complexes **3** and **5**

are intermediate products and after detachment of the chelate ligand L from Pd(II) and its replacement by water molecules, these complexes were converted into the hydrolytically active palladium(II)–peptide complexes **4** and **6**, respectively. In the present study, this replacement reaction was followed in the same manner as for the reaction of the $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -type complexes with the MeCOMet–Gly–Gly tripeptide (see previous section). The hydrolytically active complex **4** was responsible for the cleavage of the Met–Gly amide bond in the MeCOGly–Met–Gly tripeptide. The new signal in the ^1H NMR spectrum at 3.71 ppm was assigned to the methylene protons of the free glycine obtained by the cleavage of the Met–Gly amide bond. This signal increased with time and the concentrations of the peptide and the hydrolysis products were determined from the known initial concentration of the MeCOGly–Met–Gly tripeptide and from the integrated resonance of the free glycine. The catalytic ability of each of the $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -type complexes was determined by measuring the amount of the hydrolyzed peptide with time under the same experimental conditions. In the reaction of the $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -type complexes with MeCOGly–Met–Gly, the rate of hydrolysis decreased as the steric bulk of the palladium(II) complex increased ($\text{en} > \text{pic} > \text{dpa}$); see Fig. 3b. For the reaction of $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ with MeCOGly–Met–Gly, 40% of the Met–Gly amide bond had been hydrolyzed after 4.5 h. The reaction with $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ was two times slower and during this time only 20% of the peptide had been cleaved. Moreover, in the reaction with the $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex, no hydrolysis of the Met–Gly amide bond in the same peptide was observed (Fig. 3b).

The mononuclear complex **5**, which is responsible for the cleavage of the MeCO–Gly amide bond in MeCOGly–Met–Gly, was obtained by coordination of the deprotonated amide nitrogen atom as the second step after monodentate coordination of the palladium(II) catalyst to the methionine sulfur atom. Palladium(II) is one of the most effective transition-metal ions in displacing an amide proton [25]. The estimated pK_a for this reaction affected by palladium(II) is ≈ 2 , and displacement was observed even in a solution with $\text{pH} < 2.0$ [25–31]. The absence of cleavage of the Gly–Met bond in this peptide is in accordance with the fact that binding of the methionine sulfur–anchored palladium(II) atom to the deprotonated nitrogen in the amide bond stabilizes the C–N bond and inhibits its cleavage [8,25,32]. However, it was found in the present study that this complex plays very important role in the cleavage of the MeCO–Gly amide bond in MeCOGly–Met–Gly. The cleavage of this amide bond occurred after conversion of

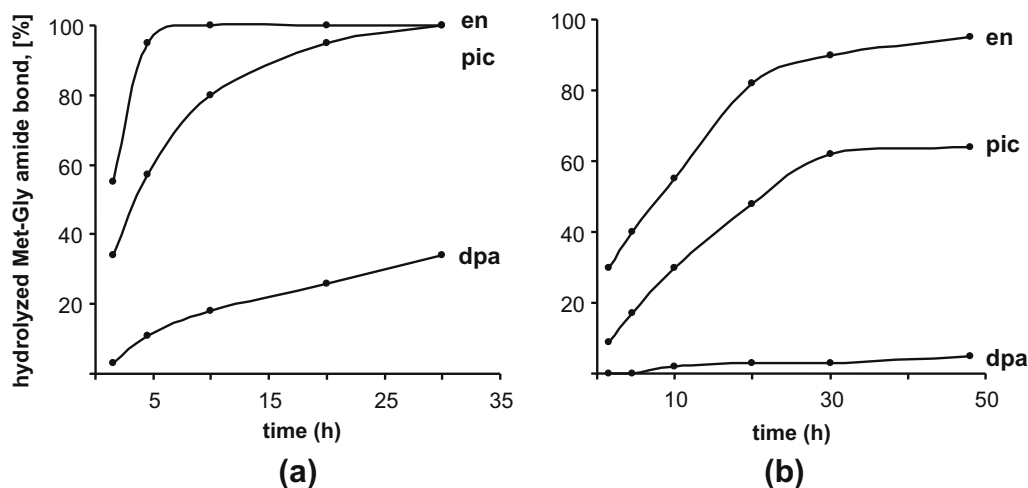
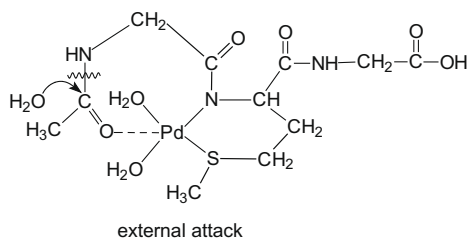


Fig. 3. The time dependence of the hydrolytic cleavage of the Met–Gly amide bond in methionine-containing peptides with different $\text{cis-}[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -type complexes (L is en, pic or dpa) at $2.0 < \text{pH} < 2.5$ and at 60°C : (a) MeCOMet–Gly–Gly and (b) MeCOGly–Met–Gly.

complex **5** into complex **6** by replacement of the ligand L with two water molecules. This replacement reaction is additionally supported by the *trans* influence of the negative charge on the deprotonated amide nitrogen and the acidic medium. Due to the fact that complexes **3** and **5** are simultaneously present in the reaction mixture, the replacement of L can be followed as an overall process. Hydrolysis of the MeCO–Gly amide bond can occur by two limiting mechanisms as represented in the scheme below. The first possibility is that palladium(II) acts as a Lewis acid and forms a chelate involving a deprotonated amide nitrogen of the amino group of methionine and the oxygen atom of the scissile amide bond. The interaction with the oxygen atom polarizes the carbonyl group and activates the carbon atom toward attack by a water molecule from the solvent (*external attack*). For the reaction to occur by this mechanism, the palladium(II) and carbonyl oxygen atoms should be proximate.

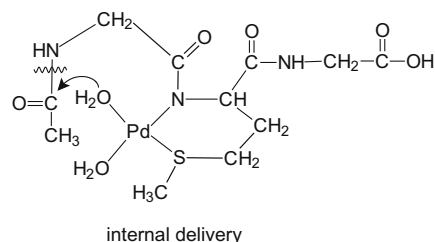


Another possibility is that an aqua ligand on the palladium(II) is delivered to the carbon atom in the amide bond (*internal attack*). For the cleavage of the amide bond to occur by this mechanism, an aqua ligand at palladium(II) should be proximate to the carbonyl carbon of the scissile amide bond. In the reaction between *cis*-[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺-type complexes and the MeCOGly–Met–Gly tripeptide, the ¹H NMR resonance at 2.05 ppm due to the CH₃ protons of the acetyl group in the substrate decreased, while that at 2.08 ppm for the CH₃ protons of free acetic acid increased. Upon addition of acetic acid to the reaction mixture, this resonance was enhanced. The concentrations of the peptide and the hydrolysis products were determined from the known initial concentration of MeCOGly–Met–Gly and from the integrated resonance of free acetic acid. When this reaction was performed with *cis*-[Pd(en)(H₂O)₂]²⁺, approximately 15% of the MeCO–Gly amide bond had been hydrolyzed after 30 h. This reaction is dependent on the nature of the ligand L and the number of hydrolyzed MeCO–Gly amide bonds decreased in the order en > pic > dpa.

4. Conclusions

From the present investigation of the reactions of *cis*-[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺-type complexes with two methionine-containing tripeptides, MeCOMet–Gly–Gly and MeCOGly–Met–Gly, at 2.0 < pH < 2.5 and at 60 °C, the following conclusions can be drawn. The rate of the hydrolytic cleavage of the amide bond in the reactions of *cis*-[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺-type complexes with the two methionine-containing peptides is strongly dependent on the nature of the bidentate coordinated diamine ligand L. It was found that the rate of hydrolysis decreased as the steric bulk of the palladium(II) complex increased (en > pic > dpa); see Figs. 3 and 4. The first step of these hydrolytic reactions is the monodentate coordination of the corresponding Pd(II) complex to the sulfur atom of the methionine side chain. The rate reactivity of the Pd(II) complexes with the methionine side chain is also the rate-determining step for the hydrolytic cleavage of the amide bonds in the investigated peptides. For confirmation of this statement, in the present study, separate experiments between the corresponding *cis*-[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺ complex and *N*-acetylated L-methionine, MeCO–

Met, were investigated by UV–Vis spectrophotometry. The reaction of *cis*-[Pd(en)(H₂O)₂]²⁺, *cis*-[Pd(pic)(H₂O)₂]²⁺ and *cis*-[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ complexes with MeCOMet was followed at pH 2.5 and at room temperature by measuring the change in absorbance at suitable wavelengths as a function of time. The use of a large excess of ligand ([MeCOMet]:[Pd(II) complex] > 20:1) provided for pseudo-first-order rate conditions, which allowed *k*_{obs} to be calculated at four different MeCOMet concentrations. The second-order rate constants were determined from a plot of *k*_{obs} versus [MeCOMet]. Dinuclear Pd(II)–amino acid complexes with the two sulfur atoms of the two methionine residues as bridges in the reactions between these three Pd(II) complexes and MeCOMet were expected [14–16]. The reaction of MeCOMet with *cis*-[Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ was two times faster (*k*₂ = 1.75 × 10^{−1} M^{−1} s^{−1}) than with *cis*-[Pd(pic)(H₂O)₂]²⁺ (*k*₂ = 8.29 × 10^{−2} M^{−1} s^{−1}) and approximately 36 times faster than with *cis*-[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺



(*k*₂ = 4.87 × 10^{−3} M^{−1} s^{−1}). These results are in accordance with the fact that the latter two complexes are more sterically demanding than the *cis*-[Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ complex. The obtained results from the UV–Vis measurements can be taken as additional arguments for the fact that inhibition of the hydrolytic reaction of the methionine-containing peptides is strongly dependent on the steric bulk of the *cis*-[Pd(L)(H₂O)₂]²⁺ complex.

Additionally, from the present study, it can be concluded that position of the methionine side chain in the peptide plays a role in the cleavage selectivity as well as in the rate of this hydrolytic reaction. Hydrolytic reaction of *cis*-[Pd(en)(H₂O)₂]²⁺, *cis*-[Pd(pic)(H₂O)₂]²⁺ and *cis*-[Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ complexes with MeCOMet–Gly–Gly tripeptide under the above-mentioned experimental conditions was regioselective and only the amide bond involving the carboxylic group of the methionine was cleaved (Fig. 2). However, the hydrolytic reaction of these three Pd(II) complexes with MeCOGly–Met–Gly tripeptide was none selective and under the investigated conditions, two amide bonds, Met–Gly and MeCO–Gly, were cleaved

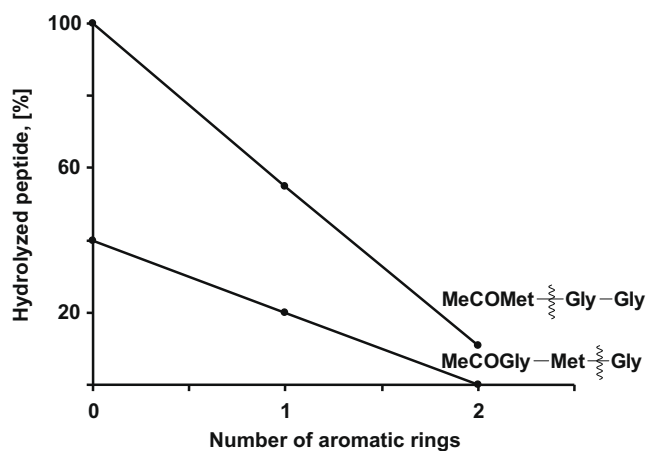


Fig. 4. The dependence of the rate of hydrolysis of the Met–Gly amide bond in methionine-containing peptides on the steric bulk of the palladium(II). The reactions were performed for 4.5 h at 2.0 < pH < 2.5 and at 60 °C.

(Fig. 2). The cleavage of these two amide bonds is a parallel process and also strongly dependent on the steric bulk of the Pd(II) complex.

Acknowledgment

This work was funded in part by the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Project No. 142008).

References

- [1] L.D. Pettit, M. Bezer, *Coord. Chem. Rev.* 61 (1985) 97–114.
- [2] T.G. Appleton, *Coord. Chem. Rev.* 166 (1997) 313–359.
- [3] H. Kozłowski, L.D. Pettit, *Stud. Inorg. Chem.* 11 (1991) 530–545.
- [4] P. Tsiveriotis, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.* 190–192 (1999) 171–184.
- [5] I.E. Burgeson, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.* 30 (1991) 4299–4305.
- [6] L. Zhu, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.* 31 (1992) 3994–4001.
- [7] L. Zhu, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 4566–4570.
- [8] L. Zhu, N.M. Kostić, *Inorg. Chim. Acta* 217 (1994) 21–28.
- [9] E.N. Korneeva, M.V. Ovchinnikov, N.M. Kostić, *Inorg. Chim. Acta* 243 (1996) 9–13.
- [10] T.N. Parac, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 51–58.
- [11] T.N. Parac, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 5946–5951.
- [12] S.U. Milinković, T.N. Parac, M.I. Djuran, N.M. Kostić, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1997) 2771–2776.
- [13] X. Chen, L. Zhu, H. Yan, X. You, N.M. Kostić, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1996) 2653–2658.
- [14] N.M. Milović, N.M. Kostić, in: A. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems, Palladium(II) and Platinum(II) Complexes as Synthetic Peptidases*, XXXVIII, Marcel Dekker Inc., 2001, pp. 145–186 and references therein.
- [15] X. Chen, X. Luo, Y. Song, S. Zhou, L. Zhu, *Polyhedron* 17 (1998) 2271–2278.
- [16] D.P. Ašanin, S. Rajković, D. Molnar-Gabor, M.I. Djuran, *Monatsh. Chem.* 135 (2004) 1445–1453.
- [17] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Polyhedron* 19 (2000) 959–963.
- [18] H. Hohmann, R. van Eldik, *Inorg. Chim. Acta* 174 (1990) 87–92.
- [19] A. Caubet, V. Moreno, E. Molins, C. Miravittles, *J. Inorg. Biochem.* 48 (1992) 135–152.
- [20] R.C. Warren, J.F. McConnell, N.C. Stephenson, *Acta Crystallogr. Sect. B* 26 (1970) 1402–1407.
- [21] G. Mehal, R. van Eldik, *Inorg. Chem.* 24 (1985) 4165–4170.
- [22] J.H. Espenson, *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms*, second ed., McGraw-Hill, New York, 1995 (Chapters 2 and 6).
- [23] A.F.M. Siebert, Ph.D. Dissertation, University of Bochum, Germany, 1995, p. 166.
- [24] Z. Nagy, I. Sóvágó, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (2001) 2467–2475.
- [25] H. Sigel, R.B. Martin, *Chem. Rev.* 82 (1982) 385–426.
- [26] I. Sóvágó, R.B. Martin, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 43 (1981) 425–429.
- [27] L. Menabue, M. Saladini, M. Sola, *Inorg. Chem.* 29 (1990) 1293–1295.
- [28] E.W. Wilson Jr., R.B. Martin, *Inorg. Chem.* 10 (1971) 1197–1202.
- [29] S. Kasselouri, A. Garoufis, M. Hadjiliadis, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.* 104 (1990) 1–12.
- [30] E.W. Wilson Jr., R.B. Martin, *Inorg. Chem.* 9 (1970) 528–532.
- [31] J.P. Laussac, R. Haran, N. Hadjiliadis, *CR Acad. Sci. Paris Ser. II* 300 (1985) 137–140.
- [32] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Polyhedron* 18 (1999) 3611–3616.

A study of the reactions of a methionine- and histidine-containing tetrapeptide with different Pd(II) and Pt(II) complexes: selective cleavage of the amide bond by platination of the peptide and steric modification of the catalyst

Snežana Rajković,^a Marija D. Živković,^a Csilla Kállay,^b Imre Sóvágó^b and Miloš I. Djuran^{*a}

Received 27th April 2009, Accepted 15th July 2009

First published as an Advance Article on the web 24th August 2009

DOI: 10.1039/b908182h

¹H NMR spectroscopy was applied to the study of the reactions of [M(en)(H₂O)₂]²⁺ complexes (M = Pd(II) and Pt(II)) with the *N*-acetylated methionyl-glycyl-histidyl-glycineamide, MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂. All reactions were performed in the pH range 1.5–2.0 with equimolar amounts of the [M(en)(H₂O)₂]²⁺ complex and the tetrapeptide at 60 °C. In all these reactions, a metal(II) complex bound to a methionine residue affects the regioselective cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine. The priority in the cleavage of the Met-Gly amide bond in relation to the other amide bonds in this peptide is due to the high affinity of Pt(II) and Pd(II) ions for the sulfur donor atom. The mechanism of these hydrolytic reactions is discussed and, for its clarification, the reaction of the [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ complex with MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ was additionally investigated by potentiometric titration. The steric effects of the various palladium(II) complexes of the type [Pd(L)(H₂O)₂]²⁺, in which L is a chelating diamine (ethylenediamine, en, 2-picolylamine, pic, or 2,2-dipyridylamine, dpa) on the hydrolytic cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of histidine in the MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ tetrapeptide were also studied by ¹H NMR spectroscopy. All reactions were performed under the above-mentioned conditions and in the initial stage of these reactions, the MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ was reacted with an equimolar amount of the [Pt(dien)Cl]⁺ complex (dien is diethylenetriamine) and then the monoplatinated [Pt(dien)(MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂-S)]²⁺ complex was treated with an equimolar amount of [Pd(L)(H₂O)₂]²⁺. It was found that the rate of hydrolysis of the His-GlyNH₂ amide bond in [Pt(dien)(MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂-S)]²⁺ decreased from the en to the pic complex, with finally a total inhibition of this reaction with [Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺. These results are an important step in the study of the regioselective cleavage of peptides and proteins and in the development of new palladium(II) complexes as artificial metallopeptidases.

Introduction

Recent years have witnessed an increasing interest in the study of the interactions of platinum(II) and palladium(II) complexes with sulfur- and histidine-containing peptides and proteins.^{1–4} Interest in the study of these interactions also became of capital importance after the discovery that platinum(II)⁵ and palladium(II)^{6–13} aqua complexes can be promising reagents for the hydrolytic cleavage of the above-mentioned peptides. In general, it was shown that platinum(II) and palladium(II) aqua complexes bind to the heteroatom in the side chain of methionine^{5–9} or histidine^{10–13} and promote cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of the anchoring amino acid. Other examples for residue-specific peptide cleavage are the selective hydrolysis of serine-containing peptides by zinc salts reported by Komiyama¹⁴ and the selective hydrolysis of the *N*-terminal peptide bond by Co(III) complexes¹⁵ as well as the site-selective protein cleavage mediated by certain Fe(II),^{16–19} Ni(II),²⁰ and Cu(II)²¹ complexes. More recently, reaction of the

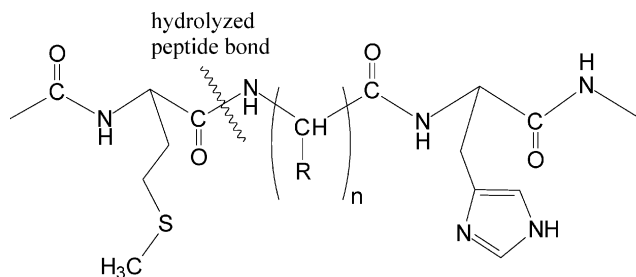
organometallic compound molybdocene dichloride, Cp₂MoCl₂ (Cp = η⁵-cyclopentadienyl) with cysteine-containing di- and tripeptides showed that coordination of the Cp₂Mo²⁺ unit to the thiol group of X-Cys-Y peptides assists the release of the amino acid at the carboxyl end of the cysteine residue.²² In spite of the numerous results obtained recently, the very complicated mechanism of these hydrolytic reactions has yet to be completely understood. For clarification of this mechanism, investigations into the influence of different factors, such as pH, temperature, solvent and steric effects of the substrate or catalyst, on this hydrolytic reaction were shown to be necessary.

Recent studies in one of our laboratories²³ showed that reaction of the [Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ complex (dpa is bidentate coordinated 2,2'-dipyridylamine) with the *N*-acetylated dipeptides MeCOMet-Gly and MeCOHis-Gly in the pH range 2.0–2.5 and at two different temperatures, 25 and 60 °C, was remarkably selective in the cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine in the side chain. The lack of cleavage of the amide bond in the reaction between [Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ and the MeCOHis-Gly peptide was attributed to the steric bulk of this palladium(II) complex. On the basis of these findings, it was assumed that in the reaction between a sterically bulky palladium(II) complex, such as [Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺, and a theoretically proposed

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: djuran@kg.ac.rs; Fax: +381(34) 335 040; Tel: +381(34) 300 251

^bDepartment of Inorganic and Analytical Chemistry, University of Debrecen, H-4010 Debrecen, Hungary

polypeptide containing both methionine and histidine residues, only the amide bond involving the carboxylic group of methionine in the side chain would be cleaved (see Scheme 1). For additional confirmation of this assumption, it was shown to be necessary to investigate the regioselective cleavage reaction with structurally different palladium(II) complexes and peptides containing both methionine and histidine residues.



Scheme 1

In a continuation of our previous investigations,²³ in the present study a new tetrapeptide *N*-acetylated methionyl-glycyl-histidyl-glycineamide, MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂, was synthesized and employed to investigate its reactions with [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ and [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ complexes. Additionally, this tetrapeptide was also used to study the influence of the steric crowding on [Pd(L)(H₂O)₂]²⁺-type complexes (L is bidentate coordinated ethylenediamine, en; 2-picolylamine, pic; and 2,2'-dipyridylamine, dpa) on the reaction with the nitrogen atom of the imidazole ring in the histidine side chain.

Experimental

Materials

Distilled water was demineralized and purified to a resistance greater than 10 MΩ cm⁻¹. The compounds D₂O, DNO₃, NaOD, ethylenediamine (en), 2-picolylamine (pic), 2,2'-dipyridylamine (dpa), K₂PdCl₄ and K₂PtCl₄ were obtained from the Aldrich Chemical Co. All common chemicals were of reagent grade. The tetrapeptide was synthesized by manual solid phase peptide synthesis using Fmoc-chemistry.^{24,25} The peptide was purified using semi-preparative RP-HPLC, and analyzed by analytical HPLC and electrospray ionization mass spectrometry. The terminal amino group was acetylated by standard methods.⁶

The [Pt(en)Cl₂], [Pt(dien)Cl]Cl (dien is tridentate coordinated diethylenetriamine ligand) and [Pd(L)Cl₂]-type complexes (L is en, pic or dpa ligand) were synthesized according to the procedures published in the literature.^{26–29} The purity of the complexes was checked by elemental microanalyses and ¹H NMR spectroscopy.

As all the solutions were prepared in D₂O, all the aqua ligands were actually D₂O. However, for simplicity and consistency with our previous publications, the D₂O ligand is shown as H₂O. All the above-mentioned Pt(II) and Pd(II) chloro complexes were converted into the corresponding diaqua complexes by treatment with 1.95 equiv. of AgNO₃ at pH 2.0 according to a previously published method.³⁰ In each case, the formed solid AgCl was removed by filtration in the dark and the fresh stock solution of the aqua complex was stored in a refrigerator until it was used for reactions with the tetrapeptide.

Potentiometric measurements

The pH-potentiometric titrations in the pH range 2.5–11.0 were performed on 3 cm³ samples in a 1 : 1 ratio of Pd(II) ion and MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂. The measurements were made with a MOLSPIN pH meter equipped with a 6.0234.100 combined electrode (Metrohm) and a MOL-ACS microburette controlled by a computer.

The titrations were performed with a carbonate-free stock solution of potassium hydroxide of known concentration. During the titration, argon was bubbled through the samples to ensure the absence of oxygen and carbon dioxide and for stirring of the solutions. All the pH-potentiometric measurements were performed at a constant ionic strength of 0.2 M KCl and at a constant temperature (25 °C). The pH readings were converted into hydrogen ion concentration as described earlier.³¹ Protonation constants of the tetrapeptide and the stability constants of the Pd(II) complexes were calculated by means of general computational programs, PSEQUAD³² and SUPERQUAD.³³

¹H NMR measurements

Proton NMR spectra of D₂O solutions containing TSP (3-methylsilylpropane-1-sulfonate) and DSS (2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate sodium salt) were recorded with a Bruker AM360 FT-NMR spectrometer and a Varian Gemini 200 spectrometer. Equimolar amounts of the Pd(II) or Pt(II) complex and MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ tetrapeptide were mixed in an NMR tube. The final solution contained 10 mM of each reactant. All reactions were performed at 60 °C.

The pH values were determined by use of a Radiometer pH-meter equipped with a Metrohm 6.0222.100 combined glass/calomel electrode and pH meter (Iskra MA 5704). The results were not corrected for the deuterium isotope effect.

Results and discussion

Potentiometric investigation of the reaction between [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ and MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂

Stability constants of the major species formed in the reaction of [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ with MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ were determined by potentiometric titrations and the corresponding titration curves are plotted in Fig. 1. A comparison of the titration curves of the free ligand and the metal-containing system revealed that the titration of the imidazolium protons of the histidyl residue occurs in the acidic pH range, supporting a strong interaction between [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ and the tetrapeptide with [ML] stoichiometry. In agreement with this assumption, only peaks of the coordinated imidazole and thioether residues could be detected in the ¹H NMR spectra of the [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺-MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ system (the NMR spectra are discussed in detail in the next section). The stability constants of the major species are listed in Table 1. The value obtained for the species [ML] is significantly higher than those reported for the monodentate binding of imidazole-N donor functions (log *K* = 6.45, for the Ac-histamine-[Pd(dien)]²⁺ system,³⁴ or the monodentate binding of thioether sulfur atoms (log *K* = 5.61 for the Ac-methionine-[Pd(dien)]²⁺ system).³⁵ The increase in stability strongly supports the simultaneous binding of both imidazole and thioether residues

Table 1 Protonation constant of the terminally protected tetrapeptide MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ and the stability constants of the complexes obtained in the reaction between [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ (M) and MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ (L) (*T* = 298 K, *I* = 0.2 mol dm⁻³). Stability constants are defined as logβ_{pqr} for M_pH_qL_r

	MeCO-MetGlyHisGly-NH ₂	[Pd(en)(H ₂ O) ₂] ²⁺ + MeCO-MetGlyHisGly-NH ₂
[HL] ⁺	6.50(1)	
[ML] ²⁺		9.54(4)
[MH ₁ L] ⁺		1.34(5)
p <i>K</i> (amide)		8.20
(ML → MH ₁ L)		

in the form of a macrochelate, as shown by structure **1** in Fig. 2. It is also clear from Fig. 1. that another base-consuming process starts around pH 7. Its stoichiometry can best be described by the species [MH₁L] with the involvement of imidazole and deprotonated amide nitrogen atoms in the metal binding. The complexity of the NMR spectra of the system at high pH (see the next section), however, clearly indicates that the [MH₁L] stoichiometry is just a simplification and both coordination isomers and polynuclear species can be present in the alkaline samples.

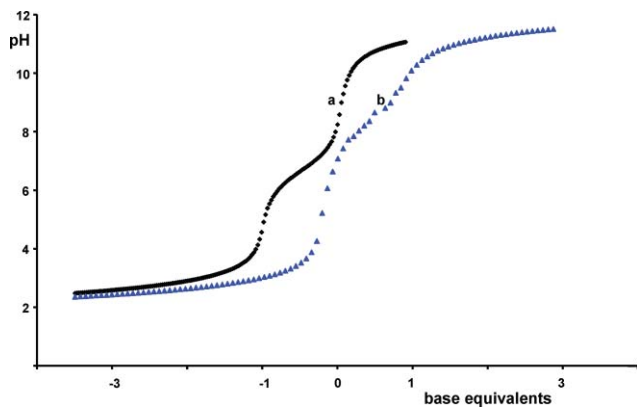


Fig. 1 Potentiometric titration curves of the free peptide (a) and the [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺-MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ system at a 1 : 1 complex to peptide molar ratio (b).

¹H NMR investigation of the reactions of the *N*-acetylated tetrapeptide MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ with [M(en)(H₂O)₂]²⁺ (M = Pd(II) and Pt(II)) complexes

Hydrolytic reactions between [M(en)(H₂O)₂]²⁺-type complexes (M = Pd(II) and Pt(II)) and the *N*-acetylated tetrapeptide MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ were investigated by ¹H NMR spectroscopy. The tetrapeptide and corresponding ethylenediamine (en) complex were mixed in equimolar amounts and the reactions

were performed at 60 °C in the pH range 1.5–2.0. In the reactions of these two complexes with MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂, the regioselective cleavage of the Met-Gly amide bond was observed. Different reaction pathways of hydrolytic cleavage of this tetrapeptide in the reactions with [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ and [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ complexes are presented in Fig. 2.

[Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ + MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂. When an equimolar amount of [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ complex was incubated with MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ under the above-mentioned conditions, the first product observed in solution in the first 60 min of the reaction was palladium(II)-peptide complex **1** (see Fig. 2). This macrochelate [Pd(en)(MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂-*S,N3*)]²⁺ complex with bidentate coordination of the tetrapeptide *via* the N3 atom of the imidazole ring and methionine sulfur atom is an intermediate product. The chemical shifts for the resonances of the free MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ at 8.62 and 7.29 ppm for H2 and H5 imidazole protons, respectively, were shifted upfield and new resonances for these protons due to complex **1** at 8.00 ppm for H2 and 6.93 ppm for H5 appeared in the ¹H NMR spectrum (see Table 2 and Fig. 3). The coordination of MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ through the sulfur atom of methionine shifted the resonance for the methyl protons at 2.09 ppm due to free methionine downfield to 2.32 ppm after its coordination to Pd(II). The macrochelate [Pd(en)(MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂-*S,N3*)]²⁺ product was unstable under these experimental conditions and, after 60 min of the reaction, it was converted into the hydrolytically active [Pd(MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂-*S,N3*)(H₂O)₂]²⁺ complex **2** (see Fig. 2). This conversion proceeds through the detachment of the en ligand from Pd(II) and its replacement by two water molecules. The conversion of **1** into **2** is evident in the ¹H NMR spectrum by the simultaneous decline of the singlet at 2.86 ppm, due to protons of the bidentate coordinated en ligand, and growth of that at 3.36 ppm, due to free H₂en²⁺ ligand. Release of en ligand in this reaction is supported by the *trans* influence of the sulfur atom and acidic medium present in the solution (1.5 < pH < 2.0).³⁶ The coordination mode in complex **2** permits the close approach of the Pd(II) and its aqua ligands to the Met-Gly peptide bond. This amide bond was cleaved over time and the final product in the investigated reaction was [Pd(Gly-His-GlyNH₂-*N,N',N3*)(MeCOMet-*S*)]⁺ complex **3**. The formation of complex **3** was detected in the ¹H NMR spectrum by the appearance of two new resonances at 3.62 and 3.67 ppm after 2 h of reaction. These resonances were assigned to the Gly protons (Gly with terminal amino group) of the Gly-His-GlyNH₂ fragment, which is tridentately coordinated to Pd(II). The coordination of this fragment occurred through the terminal amino group of Gly, the deprotonated amide nitrogen of histidine and the N3 nitrogen atom of imidazole. Deprotonation of the amide nitrogen of histidine and

Table 2 Proton chemical shifts for the hydrolytic reaction between [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ and MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ in the pH range 1.5–2.0 and in D₂O solvent

Substrate/hydrolytically active form/hydrolytic product	Chemical shifts (δ)/ ppm					
	H2	H5	CH ₂ (Gly)	CH ₂ (GlyNH ₂)	CH(Met)	CH ₃ -S(Met)
MeCOMet-Gly-His-GlyNH ₂	8.62	7.29	4.02	3.97	4.36	2.09
[Pd(en)(MeCOMet-Gly-His-GlyNH ₂ - <i>S,N3</i>)] ²⁺	8.0	6.93	4.02	3.97	4.36	2.32
[Pd(Gly-His-GlyNH ₂ - <i>N,N',N3</i>)(MeCOMet- <i>S</i>)] ⁺	7.96	7.03	3.62; 3.67	3.97	4.24	2.37

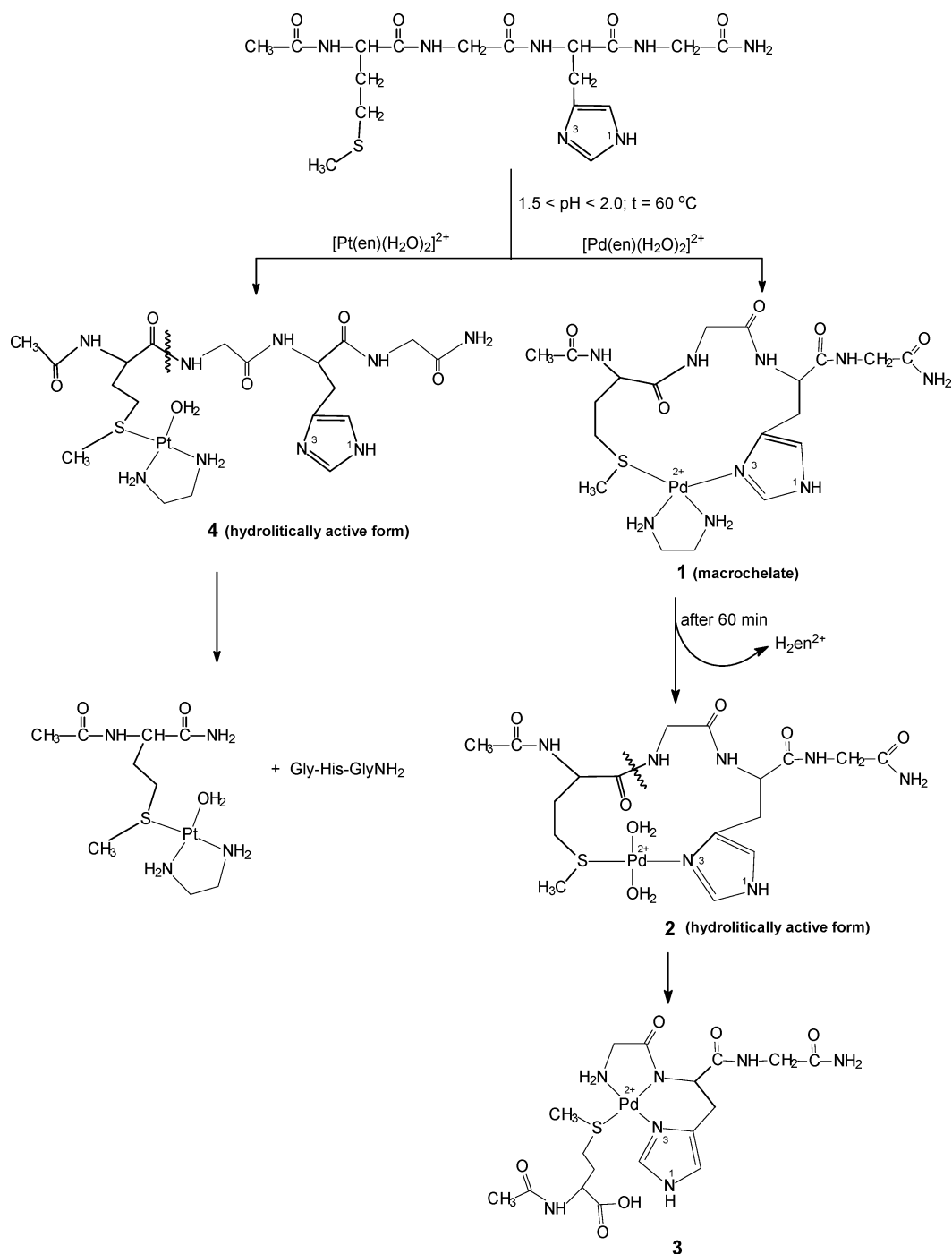


Fig. 2 Different pathways of the hydrolytic reaction of the MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ tetrapeptide with [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ and [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ complexes. The reactions were performed at 1.5 < pD < 2.0 and at 60 °C in D₂O solvent.

its coordination to Pd(II) shifted the resonances for the H2 and H5 imidazole protons at 7.96 and 7.03 ppm, respectively, upfield in accordance with those for the intermediate [Pd(en)(MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂-S,N3)]²⁺ and [Pd(MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂-S,N3)(H₂O)₂]²⁺ complexes (8.00 for H2 and 6.93 ppm for H5 protons; see Table 2). The chemical shifts for the methylene Gly and imidazole H2 and H5 protons for the complex **3** were checked in separate experiments by the reaction of K₂PdCl₄ with the tripeptide Gly-His-Gly under the same experimental conditions.

Indeed, the [Pd(Gly-His-Gly-N,N',N3)Cl] complex obtained in this reaction showed the same chemical shifts as those for complex **3**. In the [Pd(Gly-His-GlyNH₂-N,N',N3)(MeCOMet-S)]⁺ complex, the MeCOMet fragment was monodentately coordinated through the methionine sulfur atom and no significant differences in the chemical shifts for the methionine methyl protons were observed. The only measurable differences between the chemical shifts for the investigated Pd(II)-peptide complexes were observed in the case of the methionine methine protons (at 4.24 ppm for

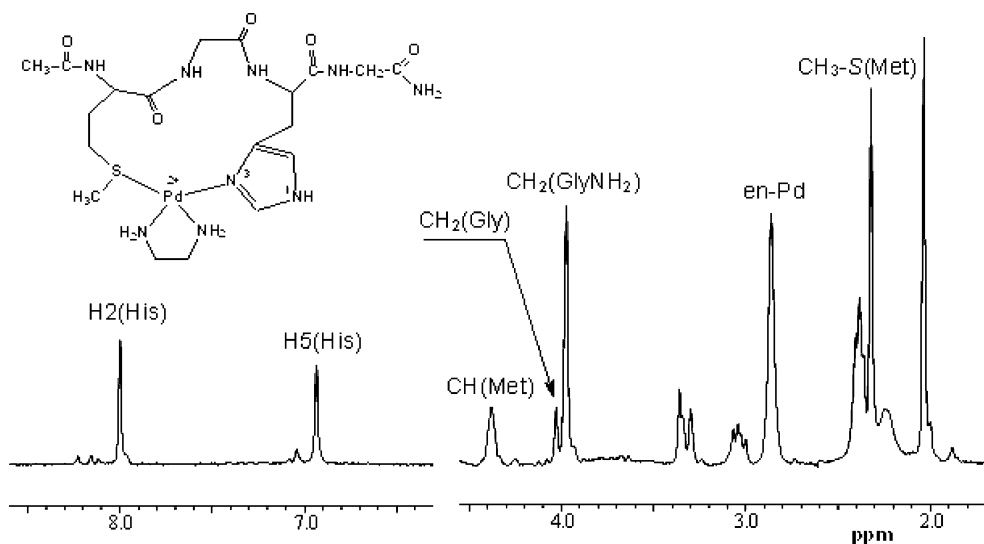


Fig. 3 ^1H NMR spectrum of the macrochelate $[\text{Pd}(\text{en})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S,N3})]^{2+}$ complex for the hydrolytic reaction between $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ in the pH range 1.5–2.0 and in D₂O solvent.

complex **3** and 4.36 ppm for complexes **1** and **2** (Table 2)). The formation of complex **3** in the reaction between $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ was followed over time and the concentration of this complex was determined by integration of the resonance at 4.02 ppm due to the Gly protons for the complex **1** and the resonances at 3.62 ppm for these protons in complex **3**. The total amount of hydrolyzed MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ was calculated in accordance with the concentration of complex **3** and it was found that more than 90% of the substrate had been hydrolyzed after 24 h.

The regioselective cleavage of the Met-Gly peptide bond was found previously in the reactions of the antitumor drug cisplatin, *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ with the methionine- and histidine-containing pentapeptides, MeCOMet-Gly-His-Gly-Gly-OH, MeCOMet-Gly-Gly-His-Gly-OH and MeCOGly-Met-Gly-His-Gly-OH. In these reactions, the hydrolytically active forms were also S, N1- or N3-imidazole macrochelated Pt(II)-pentapeptide complexes.³⁷

$[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ + MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂. When the $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex was mixed with an equimolar amount of MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ at $1.5 < \text{pH} < 2.0$ and at 60 °C, only the Pt(II)-tetrapeptide, $[\text{Pt}(\text{en})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, complex **4** was formed in the first 2 h (see Fig. 2). In this complex, the tetrapeptide is monodentately coordinated through the methionine sulfur atom to Pt(II) and no release of en ligand and no binding of Pt(II) to either the N3 or N1 imidazole nitrogen atom was observed. The $[\text{Pt}(\text{en})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complex with coordinated water molecule is hydrolytically active and only regioselective cleavage of the Met-Gly amide bond was observed in this reaction. Two hydrolytic products, the tripeptide Gly-His-GlyNH₂ and $[\text{Pt}(\text{en})(\text{MeCOMet-S})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, were observed from the ^1H NMR measurements (Fig. 2). The resonances at 3.94 ppm due to the Gly protons (Gly with a terminal amino group) of complex **4** decreased while that at 3.83 ppm for free Gly-His-GlyNH₂ increased. Upon addition of the tripeptide Gly-His-Gly to the reaction mixture, the resonance

at 3.83 ppm was enhanced. The amounts of the non-hydrolyzed tetrapeptide and hydrolysis products were determined from the known initial concentration of MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ and from the integrated resonance of the Gly protons of the free Gly-His-GlyNH₂. The catalytic ability of the $[\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex in the investigated reaction was determined by measuring the amount of hydrolyzed MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ with time under the same experimental conditions. The concentration of the free and hydrolyzed tetrapeptide were determined every 30 min and the reaction was followed for 24 h. It was found that 85% of the MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ had been hydrolyzed after 24 h at 60 °C.

^1H NMR investigation of the selective cleavage of the amide bond in $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ with $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -type complexes

For the prevention of the hydrolytic cleavage of the Met-Gly amide bond in the reaction of MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ with $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -type complexes (L is en, pic or dpa), this tetrapeptide in the first stage was reacted with an equimolar amount of $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ complex (dien is tridentate coordinated diethylenetriamine). The reaction of the Pt(II) complex with MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ was performed at $1.5 < \text{pH} < 2.0$ and at 60 °C. The formation of $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ was evidenced by the simultaneous decline of the resonances at 2.09 ppm, arising from the S-methyl protons of free MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂, and the growth of the resonance at 2.55 ppm, corresponding to the S-methyl protons of the tetrapeptide coordinated to Pt(II) through the sulfur atom. The major product in this reaction after 2 h of reaction was $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$, formed in a yield of 95%. In the second stage, the solution containing the $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ complex was treated with an equimolar amount of the corresponding $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex and the pH of the reaction mixture was adjusted to $1.5 < \text{pH} < 2.0$ (see Fig. 4). All reactions were performed at 60 °C.

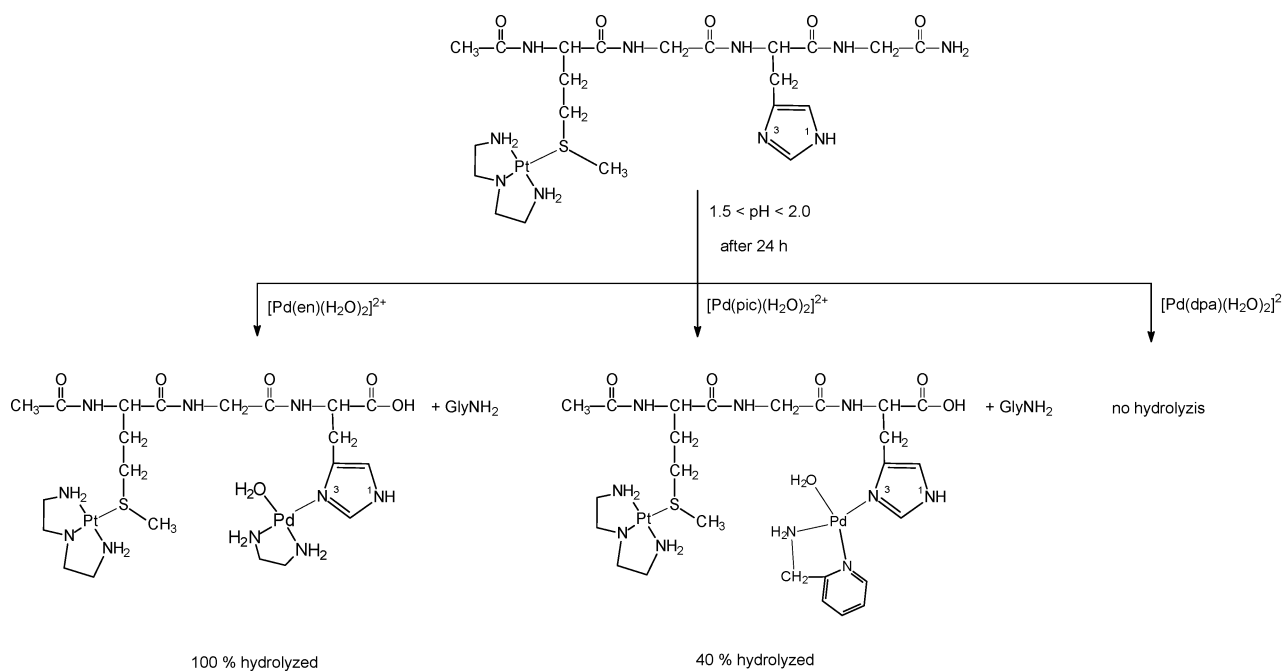


Fig. 4 Schematic presentation of the reactions between $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ and $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -type complexes (L is en, pic or dpa) at $1.5 < \text{pD} < 2.0$ and at 60°C . Dependence of the amount of hydrolyzed substrate on the steric bulk of the palladium(II) complex.

When an equimolar amount of $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ was incubated with the solution containing the $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ complex under these experimental conditions, five new NMR detectable Pd(II)/Pt(II)-tetrapeptide complexes were formed (see Fig. 5). Previous studies with $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and MeCOHis-Gly ,^{10-12,38,39} as well as the most recent studies with *trans*- $[\text{PdCl}_2(\text{DEA})_2]$ or *trans*- $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{DEA})_2]^{2+}$ (DEA is diethanolamine) with this peptide,⁴⁰ showed that five palladium(II)-peptide complexes were also formed at $\text{pH} < 3.0$. These complexes were designated from **A** through to **E** and the same designation is used for the presently investigated Pd(II)/Pt(II)-tetrapeptide complexes (Fig. 5 and Table 3). The two major complexes obtained in the investigated reaction were linkage isomers of each other with a unidentate coordination of Pd(II) *via* the

N3 or N1 atom to the imidazole ring, complexes **A** and **B**, respectively. The three minor complexes contained more than one palladium(II) atom per dipeptide or involved more than one donor atom in the dipeptide. The experiments with MeCOHis-Gly selectively methylated at the N1 and N3 atom of imidazole and $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ showed that only palladium(II) with a monodentate coordination to the N3 atom of imidazole could affect the cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of histidine; none of the four other modes of coordination were effective.¹¹ Also, the experiments with different histidine-containing peptides and different Pd(II) complexes showed that only monodentate coordination of the peptide *via* the N3 atom of the imidazole to the Pd(II) ion affects hydrolytic cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of histidine.^{10-12,38-41}

Table 3 Identification of the Pd(II)/Pt(II)-peptide complexes according to the chemical shifts of the imidazole protons for the reactions of $[\text{Pd}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -type complexes with $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$

Reactants	Pd(II)/Pt(II)-peptide-type complex	δ (H)	
		H2	H5
$[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + \text{MeCOHis-Gly}^a$	A	8.14	7.12
	B	7.88	6.89
	C	7.66	6.60
	D	8.04	7.10
	E	7.74	6.67
$[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + [\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$	A	8.14	7.10
	B	7.88	6.89
	C	7.62	6.63
	D	8.05	7.01
	E	7.73	6.78
$[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + [\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$	A	^b	7.15
	B	^b	6.89
$[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + [\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$	A	^b	7.04
	B	7.87	6.84

^a Ref. [10,12]. ^b Resonance of the H2 proton overlapped with those of pyridine.

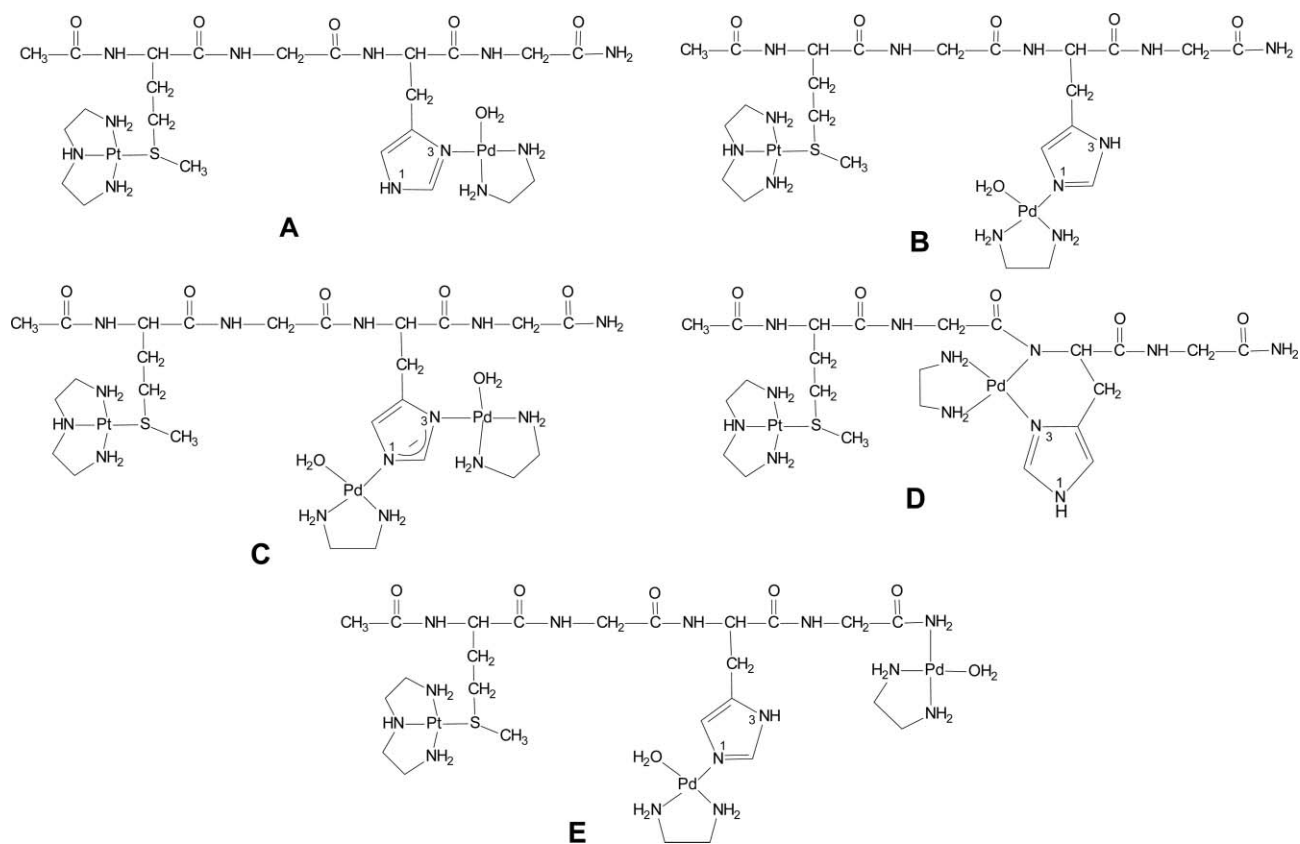


Fig. 5 The five Pd(II)/Pt(II)-tetrapeptide complexes formed in the reaction between $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ and the $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex at $1.5 < \text{pD} < 2.0$ and at 60°C .

This was explained by the fact that this coordination mode permits the necessary close approach of the Pd(II) ion and of its aqua ligand to the scissile peptide bond. The chemical shifts of the H2 and H5 imidazole protons of the Pd(II)/Pt(II)-tetrapeptide complexes obtained in the reaction of $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ with $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ were compared with those of the reaction between the $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex and $\text{MeCOHis-Gly}^{10-12}$ under the same experimental conditions (see Table 3). By comparison of these chemical shifts, it may be concluded that the Pd(II)/Pt(II)-tetrapeptide complexes formed in the reaction of $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ are identical to those formed in the reaction of the MeCOHis-Gly dipeptide and the $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex. In the reaction between $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$, no release of ethylenediamine was observed. During this reaction, the ^1H NMR resonance at 3.96 ppm due to the GlyNH_2 protons of $\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2$ decreased, while that at 3.86 ppm of free GlyNH_2 increased. Upon addition of GlyNH_2 to the reaction mixture, its resonance was enhanced. The concentrations of $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ and the hydrolysis products were determined from the known initial concentration of $\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2$ and from the integrated resonance of the free GlyNH_2 . Some of the liberated GlyNH_2 reacted with the catalyst to form a small amount of the $[\text{Pd}(\text{en})(\text{GlyNH}_2\text{-N,N'})]^{2+}$ complex (N' is amide nitrogen), which was detected by ^1H NMR spectroscopy by the resonances at 3.52 and 3.54 ppm. Indeed, the same complex was

formed upon mixing equimolar amounts of $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ and glycineamide. The cleavage of the His-GlyNH₂ amide bond was regioselective and the reaction was completed in less than 24 h (Fig. 4).

In the reaction between the $[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex and $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$, under the above-mentioned conditions, only two NMR detectable Pd(II)/Pt(II)-tetrapeptide complexes were observed, designated **A** and **B**. The designation of these complexes was made in accordance with those for the reaction of $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ with $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (see Fig. 5). However, the complexes of type **C**, **D** and **E** from Fig. 5, were not detected in the reaction with the $[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex, even after 3 days. In this reaction, only the cleavage of the His-GlyNH₂ amide bond was observed (Fig. 4). The catalytic ability of the $[\text{Pd}(\text{pic})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex in the investigated reaction was determined by measuring the amount of the substrate and hydrolytic product with time as was already explained for the reaction of $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ with the $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex. The concentration of the free and the hydrolyzed $\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2$ were determined every 30 min and the reaction was followed for 24 h. It was found that during this time only 40% of the $\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2$ had been hydrolyzed under the employed experimental conditions.

However, in the reaction between $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{MeCOMet-Gly-His-GlyNH}_2\text{-S})]^{2+}$ and the $[\text{Pd}(\text{dpa})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex under the same experimental conditions, no cleavage of any amide bond in

this substrate was observed, even when the reaction was prolonged to 3 days (Fig. 4). Also, no cleavage of the amide bond was previously observed in the reaction between this Pd(II) complex and the MeCOHis-Gly peptide.²³ The total steric inhibition of the hydrolytic reaction of this peptide in the reaction with the [Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ complex was explained in terms of the steric bulk of the Pd(II) complex. In accordance with this, the same arguments can be taken for the explanation of the total steric inhibition of the hydrolytic reaction of [Pt(dien)(MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂-S)]²⁺ with the [Pd(dpa)(H₂O)₂]²⁺ complex.

Conclusions

Summing up, the reactions of [Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ and [Pt(en)(H₂O)₂]²⁺ with the MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ tetrapeptide in the pH range 1.5–2.0 and at 60 °C are remarkably selective in the cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine. The cleavage of the Met-Gly amide bond in priority over the other amide bonds in this peptide is due to the high affinity of Pt(II) and Pd(II) ions for the sulfur donor atom. The reaction of MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂ with monofunctional [Pt(dien)Cl]⁺ complex was shown to be a good method for the protection of the methionine residue from attack by the catalyst. The reaction of monoplattinated [Pt(dien)(MeCOMet-Gly-His-GlyNH₂-S)]²⁺ with [Pd(L)(H₂O)₂]²⁺-type complexes clearly demonstrated that by modification of palladium(II) catalyst introducing sterically hindered diamine ligand, total inhibition of the hydrolytic cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of histidine can be achieved. This finding should be taken into consideration when designing new palladium(II) complexes for the regioselective cleavage of peptides and proteins. Studies aimed at investigating these new possible synthetic metallopeptidases are in progress.

Acknowledgements

This work was funded in part by the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Project No. 142008).

References

- 1 L. D. Pettit and M. Bezer, *Coord. Chem. Rev.*, 1985, **61**, 97.
- 2 T. G. Appleton, *Coord. Chem. Rev.*, 1997, **166**, 313.
- 3 H. Kozłowski and L. D. Pettit, *Stud. Inorg. Chem.*, 1991, **11**, 530.
- 4 P. Tsiveriotis and N. Hadjiladis, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **190–192**, 171.
- 5 I. E. Burgeson and N. M. Kostić, *Inorg. Chem.*, 1991, **30**, 4299.
- 6 L. Zhu and N. M. Kostić, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 3994.
- 7 L. Zhu and N. M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 4566.
- 8 L. Zhu and N. M. Kostić, *Inorg. Chim. Acta*, 1994, **217**, 21.
- 9 E. N. Korneeva, M. V. Ovchinnikov and N. M. Kostić, *Inorg. Chim. Acta*, 1996, **243**, 9.
- 10 T. N. Parac and N. M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 51.
- 11 T. N. Parac and N. M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 5946.
- 12 S. U. Milinković, T. N. Parac, M. I. Djuran and N. M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997, 2771.
- 13 X. Chen, L. Zhu, H. Yan, X. You and N. M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1996, 2653.
- 14 M. Yashiro, A. Yamurara, T. Takarada and M. Komiyama, *J. Inorg. Biochem.*, 1997, **67**, 225.
- 15 K. W. Bentley and E. H. Creaser, *Biochem. J.*, 1973, **135**, 507.
- 16 R. Miyake, K. Murakami, J. T. Owens, D. P. Greiner, O. N. Ozoline, A. Ishihama and C. F. Meares, *Biochemistry*, 1998, **37**, 1344.
- 17 N. Ettner, J. W. Metzger, T. Lederer, J. D. Hulmes, C. Kisker, W. Hinrichs, G. A. Allestad and W. Hillen, *Biochemistry*, 1995, **34**, 22.
- 18 E. Heyduk, *Biochemistry*, 1994, **33**, 9643.
- 19 A. Mustaev, M. Kozlov, V. Markovtsov, E. Zaychikov, L. Denissova and A. Goldfarb, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, **94**, 6641.
- 20 B. Cuenoud, T. W. Tarasow and A. Schepartz, *Tetrahedron Lett.*, 1992, **33**, 895.
- 21 J. Wu, D. M. Perrin, D. S. Sigman and H. R. Kaback, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995, **92**, 9186.
- 22 A. Erxleben, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 1082.
- 23 M. D. Živković, S. Rajković, U. Rychlewska, B. Warzajtis and M. I. Djuran, *Polyhedron*, 2007, **26**, 1541.
- 24 R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 2149.
- 25 E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R. C. Sheppard and B. J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1978, 537.
- 26 H. Hohmann and R. van Eldik, *Inorg. Chim. Acta*, 1990, **174**, 87.
- 27 A. Caubet, V. Moreno, E. Molins and C. Miravittles, *J. Inorg. Biochem.*, 1992, **48**, 135.
- 28 R. C. Warren, J. F. McConnell and N. C. Stephenson, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.*, 1970, **26**, 1402.
- 29 M. I. Djuran, E. L. M. Lempers and J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 1991, **30**, 2648.
- 30 G. Mahal and R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 1985, **24**, 4165.
- 31 H. M. N. H. Irving, M. G. Miles and L. D. Pettit, *Anal. Chim. Acta*, 1967, **38**, 475.
- 32 L. Zékány, I. Nagypál, in: D. Leggett, (Ed.), *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, Plenum Press, New York, 1985, p. 291.
- 33 P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1985, 1195.
- 34 A. Kiss, E. Farkas, I. Sóvágó, B. Thormann and B. Lippert, *J. Inorg. Biochem.*, 1997, **68**, 85.
- 35 Z. Nagy, I. Fábán and I. Sóvágó, *J. Inorg. Biochem.*, 2000, **79**, 129.
- 36 Z. Nagy and I. Sóvágó, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2001, 2467.
- 37 O. Hohage and W. S. Sheldrick, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, **100**, 1506.
- 38 M. I. Djuran and S. U. Milinković, *Monatsh. Chem.*, 1999, **130**, 613.
- 39 M. I. Djuran and S. U. Milinković, *Polyhedron*, 2000, **19**, 959.
- 40 Z. D. Petrović, M. I. Djuran, F. W. Heinemann, S. Rajković and S. R. Trifunović, *Bioorg. Chem.*, 2006, **34**, 225.
- 41 N. M. Milović, N. M. Kostić, in: A. Sigel, H. Sigel, (Eds.), *(Metal Ions in Biological Systems, Palladium(II) and Platinum(II) Complexes as Synthetic Peptidases, XXXVIII*, Marcel Dekker Inc, 2001, p. 145.



Hydrolysis of the amide bond in *N*-acetylated L-methionylglycine catalyzed by various platinum(II) complexes under physiologically relevant conditions

Marija D. Živković, Darko P. Ašanin, Snežana Rajković, Miloš I. Djuran *

Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovica 12, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 October 2010

Accepted 23 December 2010

Available online 6 January 2011

Keywords:

Platinum(II) complexes

L-Methionylglycine

Proton NMR spectroscopy

Hydrolysis

ABSTRACT

The hydrolytic reactions between various Pt(II) complexes of the type [Pt(L)Cl₂] and [Pt(L)(CBDCA-O,O')] (L is ethylenediamine, en; (±)-*trans*-1,2-diaminocyclohexane, dach; (±)-1,2-propylenediamine, 1,2-pn and CBDCA is the 1,1-cyclobutanedicarboxylic anion) and the *N*-acetylated L-methionylglycine dipeptide (MeCOMet-Gly) were studied by ¹H NMR spectroscopy. All reactions were realized at 37 °C with equimolar amounts of the Pt(II) complex and the dipeptide at pH 7.40 in 50 mM phosphate buffer in D₂O. Under these experimental conditions, a very slow cleavage of the Met-Gly amide bond was observed and this hydrolytic reaction proceeds through the intermediate [Pt(L)(H₂O)(MeCOMet-Gly-S)]⁺ complex. In general, it can be concluded that faster hydrolytic cleavage of the MeCOMet-Gly dipeptide was observed in the reaction with the chloride complex than with corresponding CBDCA Pt(II) complexes. The steric effects of the Pt(II) complex on the hydrolytic cleavage of the amide bond in the MeCOMet-Gly dipeptide were also investigated by ¹H NMR spectroscopy. It was found that the rate of hydrolysis decreases as the steric bulk of the CBDCA and chlorido Pt(II) complexes increase (en > 1,2-pn > dach). These results contribute to a better understanding of the toxic side effects of Pt(II) antitumor drugs and should be taken into consideration when designing new potential Pt(II) antitumor drugs with preferably low toxic side effects.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Recent years have witnessed an increasing interest in the study of the interactions of platinum(II) and palladium(II) complexes with sulfur- and histidine-containing peptides and proteins [1–4]. Particularly, this interest was induced through the facts that interactions of platinum(II) complexes with methionine or cysteine residues in peptides and proteins are thought to be responsible for a variety of biological effects, such as deactivation of platinum(II) antitumor complexes, development of cellular resistance to platinum drugs and toxic side effects, such as nephrotoxicity [5]. Moreover, interest in the study of the interactions of platinum(II) [6–8] and palladium(II) [7–21] complexes with methionine- and histidine-containing peptides and proteins also became of cardinal importance after the discovery that their aqua complexes can be promising reagents for the hydrolytic cleavage of the above-mentioned peptides. In general, it was shown that platinum(II) and palladium(II) aqua complexes bind to the heteroatom in the side chain of methionine [6–13] or histidine [7,8,14–22] and promote cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of the anchoring amino acid. The influence of different factors, such as pH, temperature, solvent and steric effects of the substrate or

catalyst, on this hydrolytic reaction has been extensively investigated in the past two decades. Up until now, most of these investigations were performed in strongly acidic media, whereas only a few reports concerning this hydrolytic reaction between methionine- and histidine-containing peptides and platinum(II) antitumor complexes under physiological relevant conditions have been reported [23–27].

This paper reports on the ¹H NMR investigations of the hydrolysis reactions between various Pt(II) complexes of the type [Pt(L)Cl₂] and [Pt(L)(CBDCA-O,O')] (where L is bidentate coordinated ethylenediamine, en; (±)-*trans*-1,2-diaminocyclohexane, dach or (±)-1,2-propylenediamine, 1,2-pn; and CBDCA is the 1,1-cyclobutanedicarboxylic anion) and the *N*-acetylated L-methionylglycine dipeptide (MeCOMet-Gly) under physiological conditions of pH and temperature (pH 7.40 and 37 °C). The observed rates of the peptide hydrolysis are explained in terms of the leaving ligand (chlorido or CBDCA) and the steric hindrance of the chelating diamine ligand (L) on the Pt(II) complex.

2. Experimental

2.1. Materials

The distilled water was demineralized and purified to a resistance great than 10 MΩ cm. The compounds D₂O, DNO₃, NaOD,

* Corresponding author. Tel.: +381 34 300 251; fax: +381 34 335 040.

E-mail address: djuran@kg.ac.rs (M.I. Djuran).

ethylenediamine (en), (\pm)-*trans*-1,2-diaminocyclohexane, (dach), (\pm)-1,2-propylenediamine (1,2-pn) and $K_2[PtCl_4]$ were obtained from the Aldrich Chemical Co. All common chemicals were of reagent grade. The dipeptide *L*-methionylglycine was obtained from the Sigma Chemical Co. The terminal amino group in this peptide was acetylated by standard methods [9].

2.2. Syntheses of $[Pt(L)Cl_2]$ -type complexes (*L* is en, dach or 1,2-pn)

Platinum(II) complexes of the type $[Pt(L)Cl_2]$ were synthesized according to procedures published in the literature [28–30]. K_2PtCl_4 was dissolved in water and mixed with an equimolar amount of the diamine ligand. The pH of the solution was adjusted to ca. 3 by addition of 1 M HCl and the mixture was stirred at 80 °C for 2 h. All the complexes were crystallized from water at room temperature. The pure complexes were obtained by recrystallization from a small amount of water. The yield was between 80% and 90%.

2.2.1. Elemental microanalyses

Anal. Calc. for $[Pt(en)Cl_2] = C_2H_8N_2Cl_2Pt$ (FW = 326.08): C, 7.37; H, 2.47; N, 8.59. *Found:* C, 7.48; H, 2.43; N, 8.56%. *Anal. Calc.* for $[Pt(1,2-pn)Cl_2] = C_3H_{10}N_2Cl_2Pt$ (FW = 340.11): C, 10.59; H, 2.96; N, 8.24. *Found:* C, 11.15; H, 3.17; N, 8.05%. *Anal. Calc.* for $[Pt(dach)Cl_2] = C_6H_{14}N_2Cl_2Pt$ (FW = 380.17): C, 18.96; H, 3.71; N, 7.37. *Found:* C, 19.20; H, 3.49; N, 7.46%.

2.2.2. NMR (1H and ^{13}C) characterization (DMSO- d_6 , 250 MHz)

$[Pt(en)Cl_2]$: 1H NMR, δ (ppm): 2.24 (s, 4H, 2CH₂), 5.30 (s, 4H, 2NH₂); ^{13}C NMR, δ (ppm): 48.76 (CH₂). $[Pt(1,2-pn)Cl_2]$: 1H NMR, δ (ppm): 1.11 (d, 3H, CH₃), 2.10–2.58 (m, 3H, CH and CH₂), 5.12–5.39 (m, 4H, 2NH₂); ^{13}C NMR, δ (ppm): 15.71 (CH₃), 52.49 (CH₂), 55.42 (CH). $[Pt(dach)Cl_2]$: 1H NMR, δ (ppm): 1.06 (m, 4H, 2CH₂ from C4 and C5), 1.63 (m, 4H, 2CH₂ from C3 and C6), 2.07 (m, 2H, 2CH from C1 and C2), 4.98–5.71 (m, 4H, 2NH₂); ^{13}C NMR, δ (ppm): 24.08 (C4 and C5), 31.27 (C3 and C6), 62.66 (C1 and C2). These data are in accordance with those reported previously for the corresponding Pt(II) complexes [31].

2.3. Syntheses of $[Pt(L)(CBDCA-O,O')]$ -type complexes (*L* is en, 1,2-pn or dach)

The chlorido complexes $[Pt(en)Cl_2]$, $[Pt(1,2-pn)Cl_2]$ and $[Pt(dach)Cl_2]$ were converted into the corresponding diaqua complexes by treatment with 1.95 equiv. of $AgNO_3$ at pH 2.0, according to a published method [32]. In each case, the formed solid $AgCl$ was removed by filtration in the dark. To the clear solutions of the aqua complexes, equimolar amounts of CBDCA (anion of 1,1-cyclobutanedicarboxylic acid) and two equivalents of NaOH were added. The mixture was stirred at 60 °C for 3 h and all complexes were crystallized from water by cooling in a refrigerator. After filtration of the solid complex, an equivalent volume of ethanol was added to the filtrate and an additional amount of the CBDCA Pt(II) complex crystallized after cooling in a refrigerator for two days. The yield was between 50% and 60%.

2.3.1. Elemental microanalyses

Anal. Calc. for $[Pt(en)(CBDCA-O,O')] = C_8H_{14}N_2O_4Pt$ (FW = 397.29): C, 24.19; H, 3.55; N, 7.05. *Found:* C, 24.28; H, 3.47; N, 7.04%. *Anal. Calc.* for $[Pt(1,2-pn)(CBDCA-O,O')] = C_9H_{16}N_2O_4Pt$ (FW = 411.31): C, 26.28; H, 3.92; N, 6.81. *Found:* C, 25.31; H, 4.11; N, 6.95%. *Anal. Calc.* for $[Pt(dach)(CBDCA-O,O')] = C_{12}H_{20}N_2O_4Pt$ (FW = 451.38): C, 31.93; H, 4.47; N, 6.21. *Found:* C, 30.70; H, 4.53; N, 6.13%.

2.3.2. NMR (1H and ^{13}C) characterization (DMSO- d_6 , 250 MHz)

$[Pt(en)(CBDCA-O,O')]$: 1H NMR, δ (ppm): 2.23 (s, 4H, 2CH₂ from en), 5.55 (s, 4H, 2NH₂), 1.64 (m, 2H, γ -CH₂ from CBDCA), 2.65 (t, 4H, α -CH₂ and β -CH₂ from CBDCA); ^{13}C NMR, δ (ppm): 47.84 (CH₂ from en), 14.99 (C3 from CBDCA), 30.19 (C2 and C4 from CBDCA), 55.47 (C1 from CBDCA), 177.23 (C=O). $[Pt(1,2-pn)(CBDCA-O,O')]$: 1H NMR, δ (ppm): 1.11 (d, 3H, CH₃ from 1,2-pn), 2.12–2.56 (m, 3H, CH and CH₂ from 1,2-pn), 5.22–6.03 (m, 4H, 2NH₂), 1.65 (m, 2H, γ -CH₂ from CBDCA), 2.65 (t, 4H, α -CH₂ and β -CH₂ from CBDCA); ^{13}C NMR, δ (ppm): 15.82 (CH₃ from 1,2-pn), 53.49 (CH₂ from 1,2-pn), 56.41 (CH from 1,2-pn), 15.07 (C3 from CBDCA), 30.10 and 30.38 (C2 and C4 from CBDCA), 56.20 (C1 from CBDCA), 177.42 (C=O). $[Pt(dach)(CBDCA-O,O')]$: 1H NMR, δ (ppm): 1.11 (m, 4H, 2CH₂, C4 and C5 from dach), 1.62 (m, 4H, 2CH₂, C3 and C6 from dach), 2.03 (m, 2H, 2CH, C1 and C2 from dach), 4.98–5.71 (m, 4H, 2NH₂), 1.65 (m, 2H, γ -CH₂ from CBDCA), 2.68 (t, 4H, α -CH₂ and β -CH₂ from CBDCA); ^{13}C NMR, δ (ppm): 24.07 (C4 and C5 from dach), 31.49 (C3 and C6 from dach), 62.06 (C1 and C2 from dach), 15.04 (C3 from CBDCA), 30.26 (C2 and C4 from CBDCA), 55.47 (C1 from CBDCA), 177.34 (C=O). These data are in accordance with those reported previously for the corresponding Pt(II) complexes [33,34].

2.4. Measurements

All pH measurements were realized at ambient temperature using an Iskra MA 5704 pH meter calibrated with Fischer certified buffer solutions of pH 4.00 and 7.00. The results were not corrected for the deuterium isotope effect. NMR spectra of Pt(II) complexes were taken on a Bruker AC 250 spectrometer operating at 250 MHz (proton) and 62.9 MHz (carbon), using standard Bruker software; tetramethylsilane (TMS, δ 0.00 ppm) was used as a reference for 1H NMR spectra, whereas the central carbon line of deuterated dimethylsulfoxide (DMSO- d_6) was set at 39.5 ppm for carbon-13 NMR spectra.

The reactions of MeCOMet–Gly with the platinum(II) complexes in 50 mM phosphate buffer at pH 7.40 in D₂O were followed by 1H NMR spectroscopy using a Varian Gemini 2000 spectrometer (200 MHz). Sodium trimethylsilylpropane-3-sulfonate (TSP) was used as an internal reference. The 1H NMR spectra were acquired using the WATERGATE sequence for water suppression. Typical acquisition conditions were as follows: 90° pulses, 24 000 data number points, 4 s acquisition time, 1 s relaxation delay, collection of 16–128 transients and final digital resolution of 0.18 Hz per point. All the NMR spectra were processed using the Varian vnmr software (version 6.1, revision C). The chemical shifts are reported in ppm. Equimolar amounts of the platinum(II) complex and the dipeptide were mixed in an 5 mm NMR tube and spectra were recorded at appropriate time intervals. The final solution was 10 mM in each reactant. All reactions were performed at 37 °C. Elemental microanalyses for carbon, hydrogen and nitrogen were performed by the Faculty of Chemistry of Warsaw University of Technology and by the Microanalytical Laboratory, Faculty of Chemistry, University of Belgrade.

3. Results and discussion

Hydrolytic reactions between various Pt(II) complexes of the type $[Pt(L)Cl_2]$ and $[Pt(L)(CBDCA-O,O')]$ (*L* is ethylenediamine, en; (\pm)-*trans*-1,2-diaminocyclohexane, dach; (\pm)-1,2-propylenediamine, 1,2-pn; and CBDCA is the 1,1-cyclobutanedicarboxylic anion) and the *N*-acetylated *L*-methionylglycine dipeptide (MeCOMet–Gly) were studied by 1H NMR spectroscopy. All reactions were performed with equimolar amounts of the platinum(II) complex and the dipeptide at pH 7.40 in 50 mM phosphate buffer in D₂O and at 37 °C. The studied platinum(II) complexes are shown in Fig. 1. The different

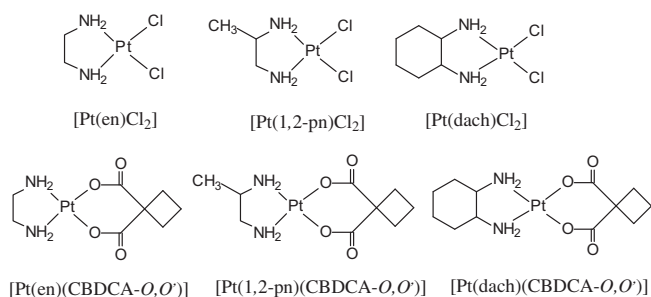


Fig. 1. Platinum(II) complexes used in the reaction with *N*-acetylated α -methionylglycine (MeCOMet-Gly) as catalytic reagents for the hydrolytic cleavage of this peptide.

chelate diamine ligands (L) in these complexes are inert to substitution and are expected to remain bound to the platinum(II) atom during the reactions with the dipeptide. In all the investigated reactions, a very slow selective cleavage of the Met-Gly amide bond in the MeCOMet-Gly dipeptide was observed. The influence of the leaving ligand (chlorido and CBDCA) and the steric effects of the chelate diamine ligand (L) on this hydrolytic reaction was investigated in relation to the toxic side effects of platinum(II) antitumor drugs.

3.1. Hydrolytic reactions of the $[Pt(L)Cl_2]$ - and $[Pt(L)(CBDCA-O,O')]$ -type complexes with MeCOMet-Gly

The reaction scheme of $[Pt(L)Cl_2]$ - and $[Pt(L)(CBDCA-O,O')]$ -type complexes with the MeCOMet-Gly dipeptide is given in Fig. 2.

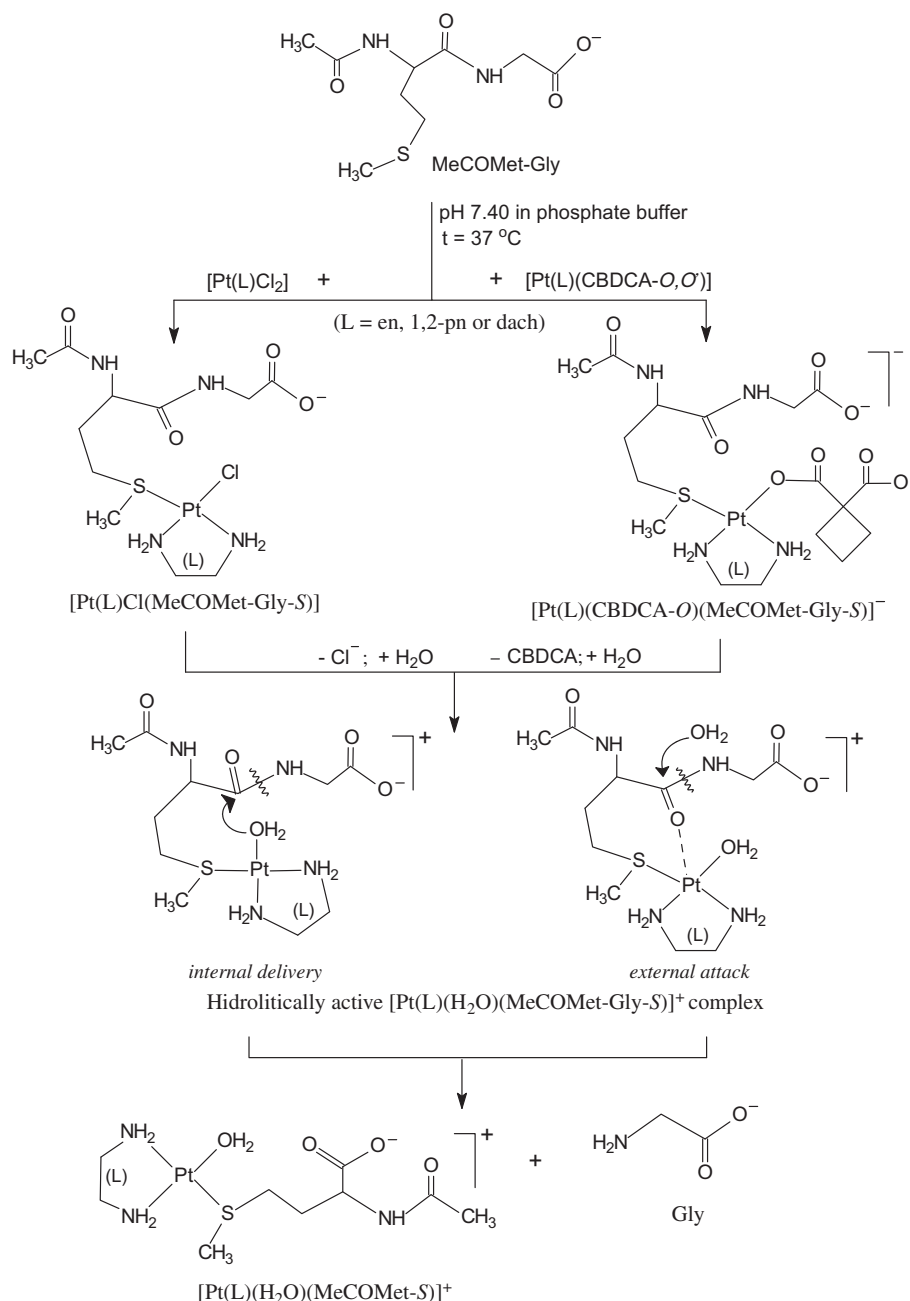


Fig. 2. The reaction scheme of the hydrolytic reaction of the MeCOMet-Gly dipeptide with $[Pt(L)Cl_2]$ - and $[Pt(L)(CBDCA-O,O')]$ -type complexes (L is en, 1,2-pn and dach). The corresponding Pt(II) complex and dipeptide were mixed in a 1:1 molar ratio and all reactions performed at pH 7.40 and at 37 °C in 50 mM phosphate buffer in D_2O solvent.

When an equimolar amount of the corresponding Pt(II) complex was incubated with MeCOMet–Gly under the above-mentioned conditions, the major product observed in solution after 4 h of reaction was an intermediate platinum(II)–peptide complex, $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}(\text{MeCOMet-Gly-S})]$ for $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ - and $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O})(\text{MeCOMet-Gly-S})]^-$ for $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O,O'})]$ -type complexes. The formation of these intermediate products was fast and could be followed by the simultaneous decline of the proton NMR resonance at 2.11 ppm, arising from the S-methyl protons of free MeCOMet–Gly, and the growth of the resonance at 2.39–2.56 ppm, corresponding to the S-methyl protons of the dipeptide coordinated to Pt(II) through the sulfur atom. The chemical shift of this resonance is dependent on the type of Pt(II) complex. Moreover, the formation of the ring-opened $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O})(\text{MeCOMet-Gly-S})]^-$ complex could be observed by the simultaneous decline of the triplet at 2.87 ppm for the H_α and H_β methylene protons of the bidentate coordinated CBDCA ligand in the $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O,O'})]$ complex, and the growth of a new multiplet at 2.32 ppm for these protons due to the monodentate bound CBDCA ligand in the ring-opened Pt(II) intermediate complex. The multiplets for the H_γ methylene protons for the bidentate and monodentate coordinated CBDCA ligand were overlapped and the changes in their intensities could not be quantified in the present study. The formation of the ring-opened carboplatin adducts containing monodentate thioethers were also observed in the reactions of the anticancer drug carboplatin with a variety of sulfur-containing amino acids [35,36]. It was found that carboplatin reacts very slowly with thiol-type ligands and that sulfur-bridged species containing four-membered Pt_2S_2 rings represent the major products in these reactions. However, it was shown that the reactions of this Pt(II) antitumor drug with thioether ligands are much more rapid and the kinetics for the initial stages of the reaction with L-methionine were determined ($k = 2.7 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at pH 7.0). During this reaction, the very stable ring-

opened $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{CBDCA-O})(\text{L-Met-S})]^-$ intermediate product was formed which has a half-life for Met–S,N ring closure of 28 h at 310 K [36]. The detection of a Pt(II) complex containing the ring-opened CBDCA ligand and a monodentate thioether ligand in the urine of mice treated with the carboplatin drug was also reported [37]. The intermediate $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}(\text{MeCOMet-Gly-S})]$ and $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O})(\text{MeCOMet-Gly-S})]^-$ complexes are hydrolytically inactive and after replacement of the chlorido and monodentate coordinated CBDCA ligand in these complexes by water molecules, they were converted into the hydrolytically active Pt(II)–peptide $[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})(\text{MeCOMet-Gly-S})]^+$ complex. It was shown that a coordinated aqua ligand in Pd(II) and Pt(II) complexes plays an important role in promoting the regioselective cleavage of the amide bond in histidine- and methionine-containing peptides [14–16,18–22]. These findings can be explained in terms of two possible limiting mechanisms, both presented in Fig. 2. Either the labile aqua ligand is displaced by the methionine carbonyl oxygen, thus activating the carbonyl group to *external attack* by a water molecule, or will itself be delivered to the scissile amide group (*internal delivery*) with resulting cleavage. In the present investigated reactions between $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ - and $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O,O'})]$ -type complexes with the MeCOMet–Gly dipeptide under the above mentioned experimental conditions, the hydrolysis of the $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}(\text{MeCOMet-Gly-S})]$ and $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O})(\text{MeCOMet-Gly-S})]^-$ complexes is the rate determining step for the hydrolytic cleavage of the Met–Gly amide bond. The replacement of the chlorido and CBDCA ligand by water molecules could not be followed by ^1H NMR spectroscopy. The triplet at 2.50 ppm for the H_α and H_β methylene protons and the multiplet at 1.97 ppm for the H_γ methylene protons of free CBDCA were overlapped with signals for the H_γ methylene protons and with methyl protons of the acetyl group of the methionine residue, respectively. Hydrolysis of the $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}(\text{MeCOMet-Gly-S})]$ and $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O})(\text{MeCOMet-Gly-S})]^-$ complexes and hydrolytic cleavage of the Met–Gly amide bond, upon formation

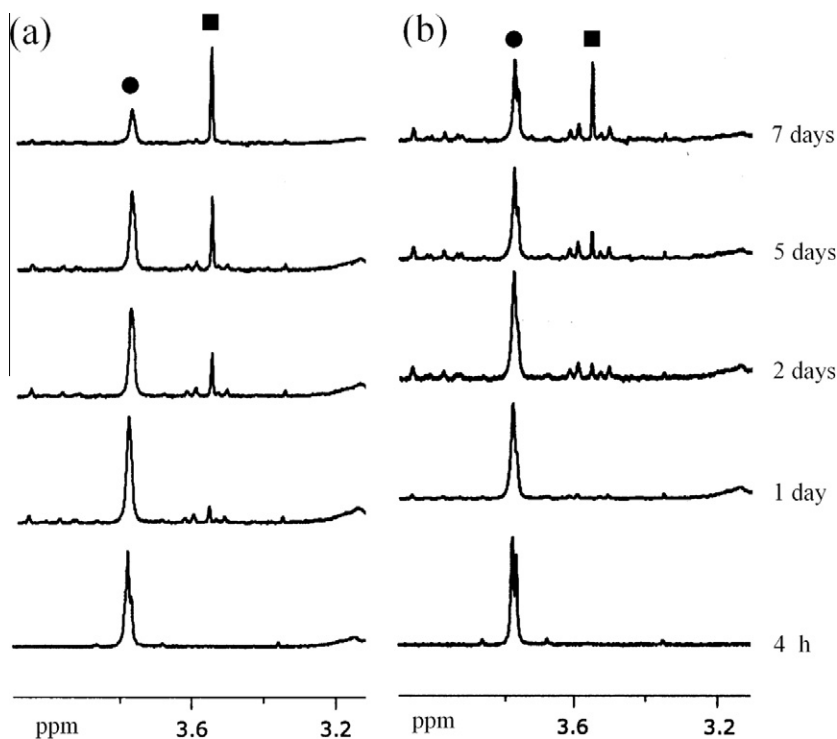


Fig. 3. Parts of the ^1H NMR spectra during the reactions of $[\text{Pt}(1,2\text{-pn})\text{Cl}_2]$ (a) and $[\text{Pt}(1,2\text{-pn})(\text{CBDCA-O,O'})]$ (b) with MeCOMet–Gly. The corresponding Pt(II) complex and the dipeptide were mixed in a 1:1 molar ratio and all reactions were performed at pH 7.40 and at 37 °C in 50 mM phosphate buffer in D_2O with TSP as the internal standard. For these reactions, the resonances are indicated as follows: (●) GlyCH_2 at 3.76 ppm of the MeCOMet–Gly dipeptide and (■) GlyCH_2 at 3.55 ppm of the free glycine.

of the corresponding hydrolytically active aqua species, are the two consequential reactions; see Fig. 2. In accordance with this, the cleavage of the Met–Gly amide bond, as the overall hydrolytic process in reactions of $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ - and $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O},\text{O}')]$ -type complexes with MeCOMet–Gly dipeptide, was followed by ^1H NMR spectroscopy. The resonance at 3.75–3.78 ppm corresponding to the glycine protons of the non-hydrolyzed peptide decreased while that at 3.55 ppm for free glycine increased; see Fig. 3. The second hydrolytic product in this reaction was the $[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})(\text{MeCOMet-S})]^+$ complex, containing the *N*-acetylated amino acid methionine, which is monodentately coordinated through the sulfur atom for Pt(II). Indeed, the same complex is formed upon mixing equimolar amounts of the corresponding $[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex with *N*-acetylated *L*-methionine, MeCOMet. Upon addition of glycine to the reaction mixture, its resonance was enhanced. The amounts of the non-hydrolyzed peptide and the hydrolysis products were determined from the known initial concentration of MeCOMet–Gly and from the integrated resonance of the free glycine. The catalytic abilities of the $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ - and $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O},\text{O}')]$ -type complexes were determined by measuring the amount of hydrolyzed MeCOMet–Gly with time under the same experimental conditions. The concentrations of the free and the hydrolyzed peptide were determined every 4 h and the reaction was followed for 7 days. The time dependence of the hydrolytic cleavage of the Met–Gly amide bond in the reactions between $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ - and $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O},\text{O}')]$ -type complexes and the MeCOMet–Gly dipeptide is given in Fig. 4. These complexes differ in the chelate diamine ligand, which contributes to the steric bulk of the corresponding Pt(II) complex. In accordance with this, it was found that in all the investigated chlorido and CBDCA Pt(II) complexes, the rate of peptide hydrolysis decreased in the following order: en > 1,2-pn > dach (Fig. 4 and Table 1). Furthermore, the rates of this hydrolytic reaction between $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ and $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O},\text{O}')]$ containing the same chelate diamine ligand (L) were compared. In general, it was found that the $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ complexes are much better hydrolytic agents than the corresponding $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O},\text{O}')]$ complexes; see Fig. 4 and Table 1. Differences in the reactivity between the $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O},\text{O}')]$ and $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ complexes can be attributed to the different stability of their intermediate products, $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}(\text{MeCOMet-Gly-S})]$ and $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O})(\text{MeCOMet-Gly-S})]^-$, formed in the first stage of the reaction with the MeCOMet–Gly dipeptide. The very stable intermediate $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O})(\text{MeCOMet-Gly-S})]^-$ complex and the slow replacement of its monodentate coordinated CBDCA ligand by a water molecule are the main contributing factors for the lower hydrolytic activity of $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O},\text{O}')]$ with respect to those

Table 1

Percentage (%) hydrolyzed amide bond in MeCOMet–Gly dipeptide during its reaction with $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ - and $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O},\text{O}')]$ -type complexes after 2 and 7 days at pH 7.40 in 50 mM phosphate buffer and at 37 °C.

Platinum(II) complex	Hydrolyzed Met–Gly amide bond (%)	
	After 2 days	After 7 days
$[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$	24.0	90.0
$[\text{Pt}(\text{en})(\text{CBDCA-O},\text{O}')]$	8.6	60.4
$[\text{Pt}(1,2\text{-pn})\text{Cl}_2]$	20.0	60.0
$[\text{Pt}(1,2\text{-pn})(\text{CBDCA-O},\text{O}')]$	8.0	32.0
$[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$	7.5	55.0
$[\text{Pt}(\text{dach})(\text{CBDCA-O},\text{O}')]$	0	25.4

for the $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ complexes. A very slow cleavage of the amide bond was also observed in the reactions between the anticancer drug cisplatin, *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, and different *N*-acetylated methionine-containing peptides if these reactions were performed in neutral or weakly alkaline solutions ($7.0 \leq \text{pH} \leq 9.5$) [24–27].

4. Conclusions

Selective hydrolytic cleavage of the MeCOMet–Gly dipeptide in the reactions with $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ - and $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O},\text{O}')]$ -type complexes occurred under physiological conditions (pH 7.40 and 37 °C). The cleavage of the Met–Gly amide bond in this peptide is very slow and proceeds through the intermediate $[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})(\text{MeCOMet-Gly-S})]^+$ complex. The formation of the aqua complex from the corresponding $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}(\text{MeCOMet-Gly-S})]$ and $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O})(\text{MeCOMet-Gly-S})]^-$ complexes is the rate determining step for the hydrolytic cleavage of the MeCOMet–Gly dipeptide. The higher stability of the initially formed $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O})(\text{MeCOMet-Gly-S})]^-$ complex with respect to the analog $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}(\text{MeCOMet-Gly-S})]$ intermediate product is in accordance with the slow replacement of its CBDCA ligand by a water molecule, finally resulting in the formation of the hydrolytically active $[\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})(\text{MeCOMet-Gly-S})]^+$ complex. The present findings that Pt(II) complexes can cleave methionine-containing peptides under physiological relevant conditions of pH and temperature can have an importance for a better understanding of the toxic side effects of Pt(II) antitumor drugs. In this paper, it was demonstrated that modification of the Pt(II) complex by the introduction of a sterically hindered diamine ligand, inhibition of the hydrolytic cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of methionine can be achieved. This latest results should also be taken into consideration when designing new potential Pt(II) antitumor drugs with low toxic side effects.

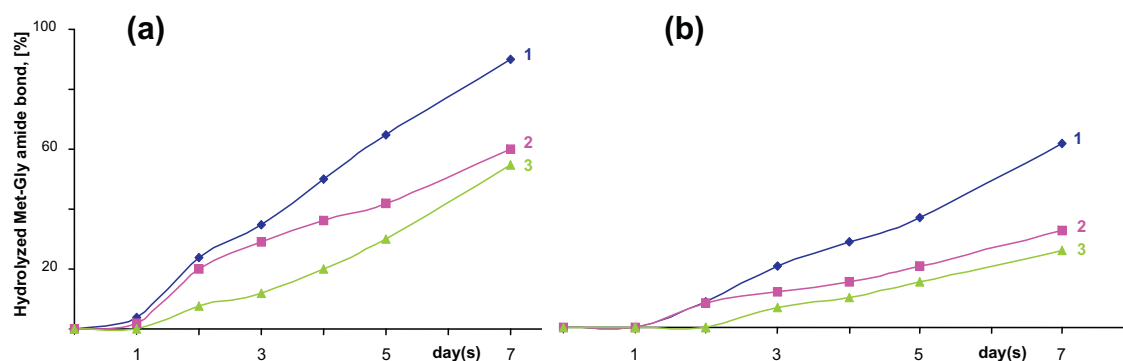


Fig. 4. The time dependence of the hydrolytic cleavage of the Met–Gly amide bond in the MeCOMet–Gly dipeptide with different $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ (a) and $[\text{Pt}(\text{L})(\text{CBDCA-O},\text{O}')]$ (b) complexes (L is ethylenediamine, en (1); (±)-1,2-propylenediamine, 1,2-pn (2); (±)-*trans*-1,2-diaminocyclohexane, dach (3); and CBDCA is the 1,1-cyclobutanedicarboxylic anion). The corresponding Pt(II) complex and the dipeptide were mixed in a 1:1 molar ratio and all reactions were performed at pH 7.40 and at 37 °C in 50 mM phosphate buffer in D_2O as solvent.

Acknowledgment

This work was funded in part by the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Project No. 172036).

References

- [1] L.D. Pettit, M. Bezer, *Coord. Chem. Rev.* 61 (1985) 97.
- [2] T.G. Appleton, *Coord. Chem. Rev.* 166 (1997) 313.
- [3] H. Kozłowski, L.D. Pettit, *Stud. Inorg. Chem.* 11 (1991) 530.
- [4] P. Tsvieriotis, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.* 190–192 (1999) 171.
- [5] E.L.M. Lempers, J. Reedijk, *Adv. Inorg. Chem.* 37 (1991) 175.
- [6] I.E. Burgeson, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.* 30 (1991) 4299.
- [7] N.M. Milović, N.M. Kostić, in: A. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems, Palladium(II) and Platinum(II) Complexes as Synthetic Peptidases*, vol. XXXVIII, Marcel Dekker Inc., 2001, p. 145.
- [8] S. Rajković, M.D. Živković, C. Kállay, I. Sóvágó, M.I. Djuran, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2009) 8370.
- [9] L. Zhu, N.M. Kostić, *Inorg. Chem.* 31 (1992) 3994.
- [10] L. Zhu, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 4566.
- [11] L. Zhu, N.M. Kostić, *Inorg. Chim. Acta* 217 (1994) 21.
- [12] E.N. Korneeva, M.V. Ovchinnikov, N.M. Kostić, *Inorg. Chim. Acta* 243 (1996) 9.
- [13] D.P. Ašanin, S. Rajković, D. Molnar-Gabor, M.I. Djuran, *Monatsh. Chem.* 135 (2004) 1445.
- [14] T.N. Parac, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 51.
- [15] T.N. Parac, N.M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 5946.
- [16] S.U. Milinković, T.N. Parac, M.I. Djuran, N.M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 2771.
- [17] X. Chen, L. Zhu, H. Yan, X. You, N.M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1996) 2653.
- [18] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Monatsh. Chem.* 130 (1999) 613.
- [19] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Polyhedron* 18 (1999) 3611.
- [20] M.I. Djuran, S.U. Milinković, *Polyhedron* 19 (2000) 959.
- [21] Z.D. Petrović, M.I. Djuran, F.W. Heinemann, S. Rajković, S.R. Trifunović, *Bioorg. Chem.* 34 (2006) 225.
- [22] M.D. Živković, S. Rajković, U. Rychlewska, B. Warzajtis, M.I. Djuran, *Polyhedron* 26 (2007) 1541.
- [23] A.F.M. Siebert, W.S. Sheldrick, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 385.
- [24] M. Hahn, M. Kleine, W.S. Sheldrick, *J. Biol. Inorg. Chem.* 6 (2001) 556.
- [25] S. Manka, F. Becker, O. Hohage, W.S. Sheldrick, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1947.
- [26] O. Hohage, W.S. Sheldrick, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1506.
- [27] O. Hohage, S. Manka, W.S. Sheldrick, *Inorg. Chim. Acta* 362 (2009) 953.
- [28] H. Hohmann, R. van Eldik, *Inorg. Chim. Acta* 174 (1990) 87.
- [29] A. Caubet, V. Moreno, E. Molins, C. Miravittles, *J. Inorg. Biochem.* 48 (1992) 135.
- [30] R.C. Warren, J.F. McConnell, N.C. Stephenson, *Acta Crystallogr., Sect. B* 26 (1970) 1402.
- [31] M. Milanesio, E. Monti, M.B. Gariboldi, E. Gabano, M. Ravera, D. Osella, *Inorg. Chim. Acta* 361 (2008) 2803.
- [32] G. Mehal, R. van Eldik, *Inorg. Chem.* 24 (1985) 4165.
- [33] F.D. Rochon, G. Massarweh, *Inorg. Chim. Acta* 359 (2006) 4095.
- [34] N. Summa, T. Soldatović, L. Dahlenburg, Ž.D. Bugarčić, R. van Eldik, *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (2007) 461.
- [35] U. Frey, J.D. Ranford, P.J. Sadler, *Inorg. Chem.* 32 (1993) 1333.
- [36] K.J. Barnham, M.I. Djuran, P. del S. Murdoch, J.D. Ranford, P.J. Sadler, *Inorg. Chem.* 35 (1996) 1065.
- [37] K.J. Barnham, U. Frey, P. del S. Murdoch, J.D. Ranford, P.J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 11175.