

# **A szuperoxid-dizmutáz enzimet modellező peptidek réz(II)- és nikkel(II)-komplexei**

## **Tudományos Diákköri Dolgozat**

**Készítette:** Kiss Mariann

III. kémia BSc hallgató

**Témavezető:** Dr. Várnagy Katalin  
egyetemi docens

**Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar**

**Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék**

**2012**

## Tartalomjegyzék

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| Tartalomjegyzék.....                                        | 1  |
| Bevezetés.....                                              | 2  |
| 1. Irodalmi áttekintés.....                                 | 3  |
| 1.1. A nikkel biológiai szerepe.....                        | 3  |
| 1.2. A réz biológiai szerepe.....                           | 4  |
| 1.3. A szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimek szerepe.....       | 5  |
| 1.4. Védett multihisztidin tartalmú peptidek komplexei..... | 7  |
| 2. Kísérleti körülmények, vizsgálati módszerek.....         | 8  |
| 2.1. Felhasznált vegyszerek.....                            | 8  |
| 2.2 Vizsgált peptidek.....                                  | 8  |
| 2.3 Peptidszintézis.....                                    | 9  |
| 2.4 pH-Potenciometria.....                                  | 11 |
| 2.5 UV-látható spektrofotometria.....                       | 12 |
| 2.6 Cirkuláris dikroizmus (CD) – spektroszkópia.....        | 13 |
| 3. Kísérleti eredmények és értékelésük.....                 | 15 |
| 3.1. A ligandumok protonálódási állandói.....               | 15 |
| 3.2. A peptidek Ni(II)-komplexei.....                       | 16 |
| 3.3. A peptidek Cu(II)-komplexei.....                       | 23 |
| 4. Összefoglalás.....                                       | 30 |
| 5. Summary.....                                             | 31 |
| 6. Irodalmi hivatkozások.....                               | 32 |
| Köszönetnyilvánítás.....                                    | 34 |

## Bevezetés

A bioszervetlen kémia vagy szervetlen biokémia a fémek és nemfémek elemek funkcióival foglalkozik a biológiai rendszerekben. A bioszervetlen kémia választ keres arra, hogy a szervetlen elemek milyen hatást fejtenek ki a biomolekulák egészére, milyen módon befolyásolják, illetve alakítják ki azok funkcióit. A bioszervetlen kémiai nézőpont a biológiai rendszereket a szervetlen elemek, többségükben a fémionok oldaláról vizsgálja, és jól kiegészíti a biológiai, biokémiai szemléletet.

Az élő szervezetben a fémionok számos biomolekulával kerülhetnek gyengébb vagy erősebb kölcsönhatásba, a körülményektől függően. Napjainkra az is egyértelművé vált, hogy a szerves anyagok közül a fehérjék azok, amelyek a fémionok megkötésében meghatározó szerepet játszanak. A különböző fémtartalmú enzimek, proteinek és egyéb peptidláncot tartalmazó vegyületek legegyszerűbben olyan rendszerekkel modellezhetők, melyek központi ionként valamilyen átmenetifémiont, ligandumként aminosavat, peptidet vagy azok származékát tartalmazzák. Az elmúlt évek vizsgálatai azt mutatták, hogy a metalloproteinekben a fémionok megkötésére leggyakrabban a peptidlánc oldalláncbeli donorcsoportjai szolgálnak, pl. a hisztidin aminosav imidazolcsoportja. A Cu,Zn-szuperoxid-dizmutáz enzim aktív centrumában például a hisztidin imidazol nitrogénje is részt vesz a fémionok koordinálásában.

A Cu-kötőhely modellezésére egyetemünk Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában korábban már előállítottak és vizsgáltak szisztematikusan megtervezett több hisztidin aminosavat tartalmazó terminálisan védett peptideket különböző fémionok jelenlétében.

Ebbe a munkába kapcsolódtam be, amelynek során célkitűzésem az volt, hogy egy terminálisan védett hexapeptidet (Ac-His-Ala-Ala-His-Gly-His-NH<sub>2</sub>) előállítsak és a korábban szintetizált hasonló (Ac-His-Gly-Gly-His-Gly-His-NH<sub>2</sub>) peptiddel együtt a réz(II)- és nikkel(II)-ionokkal képzett komplexeket megvizsgáljam. Ez lehetőséget adott annak tanulmányozására is, hogy ha a három hisztidin aminosav közül kettő egymástól távolabb helyezkedik el, hogyan változik a peptidek komplexképző sajátága.

## 1. Irodalmi áttekintés

### 1.1. A nikkel biológiai szerepe<sup>1,2</sup>

A nikkel az emberi szervezet állandó alkotója. Akár 7-10 mg Ni/70 kg testsúly is kimutatható. Létfontossága az emberi szervezetben (és általában a gerincesek szervezetében) bizonytalan, azonban hiánya törpenövést, terméketlenséget okozhat. Ha felhalmozódik a szervezetben tüdőrák, bőrgyulladás alakulhat ki, elsősorban a nőknél.

A nikkel és különösen egyes vegyületeinek toxicitása hosszú idő óta ismeretes. A legáltalánosabb és legismertebb formája a nikkel toxicitásának a *Nickel Dermatitis*, ami az allergiás megbetegedések közé sorolható. A nikkeltárgyakkal (pl. ékszer, egyéb használati tárgy) való tartós érintkezés eredményeként kialakuló, az ekcémás kiütésekhez hasonlítható bőrelváltozást jelent, amelynek kialakulása és kezelési mechanizmusa még kevésbé ismert.

Fontos megfigyelés, hogy a szervezetben helyettesíthet más átmeneti fémeket. Igen gyakoriak a nikkel tartalmú enzimek az alacsonyabb rendű élő szervezetek (pl.: baktériumok) körében, illetve a növényvilágban. Ennek oka, hogy a nikkel sokkal fontosabb szerepet töltött be a földi élet kialakulásának kezdeti szakaszában, majd a hatékonyabb rendszerek az evolúció során kiszorították ezeket az enzimeket.

A nikkeltartalmú enzimekkel több területen találkozhatunk, a legismertebb az ureáz. Az ureáz enzim a hidrolázok közé sorolható, a karbamid hidrolízisét katalizálja. Ugyancsak nikkel tartalmú enzimek a hidrogenázok, melyek a hidrogén és az oxigén vízzé való átalakulását katalizálják. Érdeemes megemlíteni továbbá a koenzim F<sub>430</sub>-et, illetve a metil-S-koenzim-M reduktázt, amely a széndioxid metánná való átalakulásában vesz részt. Az utóbbi két enzimben a nikkel +1-es oxidációs számmal rendelkezik, míg általában az enzimek zömében +2-es az oxidációs száma. Újabb kutatások során nikkel tartalmú szuperoxid-dizmutáz enzimeket is felfedeztek.

Gyakorlati szempontból egyre jelentősebb területe a nikkel biológiai szerepének a hiperakkumuláló növényekhez kapcsolható. A növények kétfajta mechanizmust fejlesztettek ki a nehézfémek toxikus hatásával szemben. Vannak növények, melyek képesek kizárni a nehézfémek felszívódását, persze csak bizonyos határok között, illetve vannak, amelyek képesek magas koncentrációban felhalmozni bizonyos elemeket. Ez utóbbi mechanizmus legismertebb formáit a nikkel esetében írták le.

## 1.2. A réz biológiai szerepe<sup>1,3,4</sup>

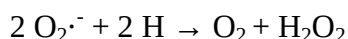
A réz valamennyi élő szervezet számára létfontosságú nyomelem. A szervezetben szinte kizárólag fehérjékhez kötött formában van jelen, s ezek többségükben enzimatisz szerepet töltenek be, valamint a Cu(I)-Cu(II) redoxirendszer révén a biológiai oxidációs folyamatokban vesznek részt. A réztartalmú fehérjék az alacsonyabb rendű élőlények szervezetében az oxigén szállításának funkcióját is ellátják. Ez azért van, mert a réz és a vas biokémiája nagy mértékben hasonló. Általánosságban elmondható, hogy a vastartalmú enzimeknek a biológiai rendszerekben megtalálhatók a réztartalmú hasonló funkciójú analógjai (alacsonyabb rendű élőlényekben). A réztartalmú fehérjék csoportjába tartoznak az elektronszállító fehérjék (kékréz fehérjék) is. A réz megtalálható még pl. a citokróm c-oxidázban és a szuperoxid-dizmutáz enzimben.

A réztartalmú fehérjék kémiai jellemzője, hogy ezekben a réz koordinációs geometriája nem értelmezhető egyszerűen azokkal a paraméterekkel, amelyek a réz különböző oxidációs állapotú modell komplexeihez általánosan rendelhetők, ezért ezeket különböző szerkezeti típusokba sorolták: I-es típusú, ún. „kék réz” fehérjék, II-es típusú, ún. „nem kék réz” fehérjék, III-as típusú, kétmagvú réz központot tartalmazó fehérjék, valamint a három vagy négy réz alegységet tartalmazó IV-es típusú rézfehérjék.

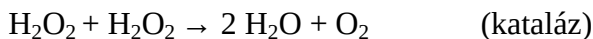
A réz esetén nagyon jól ismertek a különböző megbetegedések, mind az elem felhalmozódása, mind hiánya miatt. A Menkes-kór (göndör haj betegség) a réztranszport örökletes rendellenessége, melynek következtében kialakuló rézhiány súlyos elváltozásokat idézhet elő a fejlődésben. A Wilson-kór szintén örökletes betegség, a szervezet réztároló képességének zavara. Ennek következtében a réz a májban és az agyszövetekben kötődik, súlyos rendellenességeket okozva. Réz szükséges a vörösvérsejtek éréséhez, a vasnak a hembe való beépüléséhez és a vas mobilizálásához a ferritinből a transferrinbe, mivel katalizálja a Fe(III)/Fe(II) redoxi átalakulást, ami szükséges a vasnak a szállító/tároló/funkcionális fehérjék közötti mozgásához.

### 1.3. A szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimek szerepe<sup>5,6</sup>

Az  $O_2$  redukciója során keletkező intermedierek ( $O_2^{\cdot-}$ , és  $O_2^{2-}$ ) igen reaktívak, a szervezet molekuláit gyors gyökös reakciókban elroncsolják, így ezeket semlegesítenie kell a szervezetnek. A semlegesítés oxidációval, redukcióval vagy diszproporcióval történhet. Utóbbi szerint történik a szuperoxid-gyökanion ( $O_2^{\cdot-}$ ) szuperoxid-dizmutáz enzim által katalizált semlegesítése. A reakció során a gyökanionból oxigén és hidrogén-peroxid keletkezik:

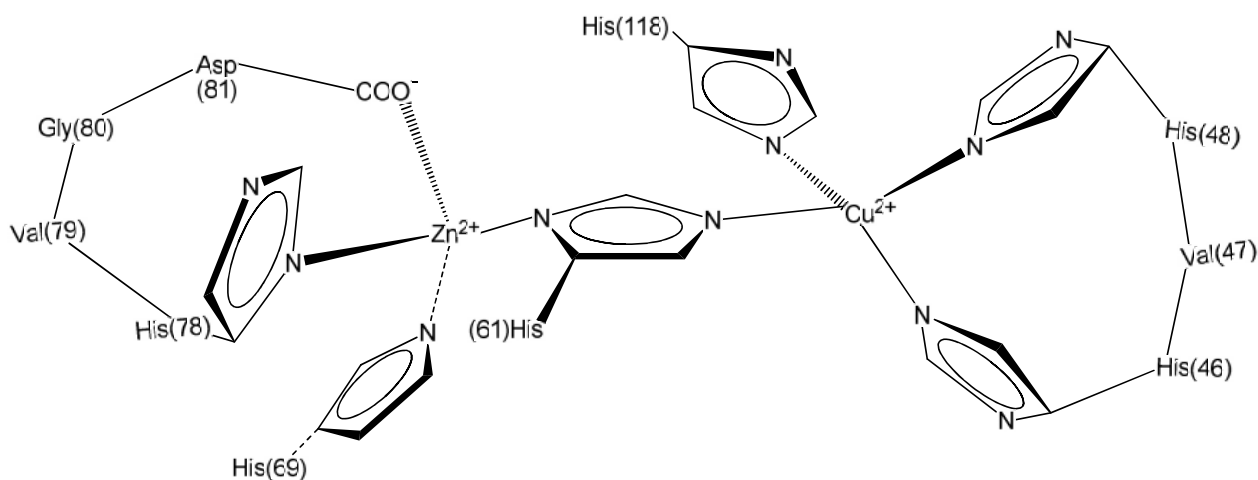
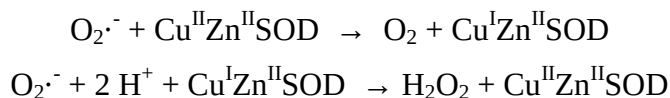


A reakcióban képződő hidrogén-peroxid további diszproporciós reakcióban oxigénné és vízzé alakul a kataláz, illetve a peroxidáz enzim hatására:



Az eukarióták (sejtmaggal rendelkező szervezetek) citoplazmájában működő Cu/Zn-tartalmú SOD mellett a prokariótákban (sejtmaggal nem rendelkező szervezetek) vastartalmú (baktériumok és növények) valamint mangántartalmú (mitokondrium és baktériumok) enzimek is fellelhetők az élővilágban. Újabban egy kizárólag mikroorganizmusokban megtalálható, nikkel tartalmú SOD enzimet is azonosítottak.

A SOD-enzimek közül a legjobban ismert a Cu/Zn-tartalmú, mely két viszonylag kis alegységből áll (molekulatömege  $2 \times 16$  kDa). Mindkét alegység tartalmaz egy réz- és egy cink iont, melyeket egy deprotonált imidazolát-gyűrű hídligandumként köt össze (1. ábra). A cink koordinációja közel tetraéderes elrendeződésű, a hídligandumon kívül további 2 His és egy Asp kapcsolódik hozzá. A réz koordinációja erősen torzult elrendeződést mutat, átmenetet képez a négyzetes piramisos és a trigonális bipiramisos geometria között, melyet a további 3 His egység koordinációja okoz. A dizmutálási reakció lényege, hogy a Cu centrum egyik állapotában képes a  $O_2^{\cdot-}$  oxidálására, míg a másik állapotában a redukálására. A katalitikus aktív centrumban a következő reakciók játszódnak le:



**1. ábra:** A Cu/Zn SOD enzim aktív centruma

A réz(II)ion az első lépésben  $\text{O}_2$ -né oxidálja az első, a második lépésben pedig a réz(I)ion peroxidá redukálja a második szuperoxid-gyökaniont. Tehát az enzim egyetlen katalitikus ciklus során két szuperoxid-gyökaniont képes átalakítani, miközben a réz oxidációs állapota a  $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)} \rightarrow \text{Cu(II)}$ , geometriája pedig a négyzetes piramis  $\rightarrow$  torzult tetraéder  $\rightarrow$  négyzetes piramis változásokon megy át. Feltételezhetően a két fémiont összekapcsoló imidazolato-híd az enzim működése során felbomlik, majd újra visszaalakul. Ebben a folyamatban a cink(II)-ionnak fontos szerepe van, mivel hatására marad a His imidazol gyűrűje olyan helyzetben, hogy az imidazolato-híd ismét kialakulhasson a katalitikus ciklus végén.

A Ni-SOD enzim szerkezetileg teljesen különböző a vas-, mangán- illetve a réz/cink-tartalmú SOD enzimektől. Ezen enzim aktív centrumában csupán egy nikkeliont tartalmaz, viszonylag kis méretű, körülbelül 120 aminosavat tartalmazó fehérje. A nikkelion mind az oxidált Ni(III), mind a redukált Ni(II) formájában két cisztein alegység oldalláncaihoz koordinálódik. Koordinációs szféráját az N-terminális His aminosav imidazol oldallánca, valamint egy peptidkötés amidnitrogénje egészíti ki. Redukált formában a fémion körül síknégyzetes elrendeződés alakul ki, míg oxidált formában a geometria torzul az axiális

helyzetben koordinálódó hisztidin imidazol-nitrogénje miatt. Az enzim működéséről kevés ismeret áll rendelkezésre szerkezetének így részletes ismerete ellenére.<sup>7,8</sup>

#### **1.4. Védett multihisztidin tartalmú peptidek komplexei<sup>9,10</sup>**

Az eddigi vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy hisztidin jelenlétében a fémion elsősorban az imidazolnitrogénekhez koordinálódik. Ezen donoratomok horgonyként viselkednek, csakúgy mint az N-terminális részen szabadon található aminos csoport. Sokszor használnak szabad aminos csoportot tartalmazó peptideket enzimek aktív centrumának modellezésére. Azonban a legtöbb enzimben, így például a Cu,Zn-szuperoxid-dizmutáz enzimben is a fémion csak az imidazolnitrogénekén keresztül koordinálódik. Így a modellvegyületek közül azokkal célszerű dolgozni, amelyekben az aminos csoportot és a karboxilcsoportot védőcsoporttal blokkolják. Ezekben a peptidekben a hisztidin veszi át a horgonydonor szerepét, ahogy az a természetes enzimben is gyakran előfordul.

Kutatócsoportunkban számos több hisztidint tartalmazó peptid oldategyensúlyi viselkedését tanulmányozták. Vizsgáltak két hisztidint tartalmazó peptideket, amelyek a horgonydonorként viselkedő hisztidin mellett aszparaginsavat, valint és glicint is tartalmaztak.<sup>11-13</sup> Jellemezték olyan peptideket is, amelyekben a hisztidineket két aminosav választotta el egymástól. Az eredmények rámutattak arra, hogy stabilisabb komplexek keletkeznek akkor, ha a hisztidineket egy aminosav választja el egymástól. Így került sor a HXHYH (X, Y= glycin, valin, alanin, prolin vagy szarkozin) szekvenciájú peptidek szintézisére. A ligandumok Cu(II)-iont tartalmazó oldataiban a három hisztidin jelenléte lehetővé teszi makrokelátok kialakulását, ami CuA összetételű komplex kialakulásához vezet. A makrokelátok képződése visszaszorítja ugyan az amidnitrogének deprotonálódását, de teljes mértékben nem tudja megakadályozni azt.

Az amiloid prekursor protein (APP) mindkét terminuson védett peptidfragmensei a HXHYH szekvenciájú részt tartalmazzák. 5-ös pH érték körül a Cu(II)-ion mindhárom imidazolnitrogénhez koordinálódik. Fiziológias pH-n a fémion a Leu(148) és His(149)-hez tartozó amidnitrogének deprotonálódását indukálja, ezáltal az Im(N), Im(N), Im(N), 2N-kötésmódú komplex alakul ki, szokatlan térbeli szerkezettel.<sup>14,15</sup>

Ha a HXHYH szekvenciájú peptidekben a hisztidinek között szarkozin található<sup>16</sup>, ezen ligandumok esetében gátolt az amidnitrogének deprotonálódása. A kisebb tagszámú

peptideknél is stabilis a CuA összetételű komplex, a három szarkozint tartalmazó heptapeptidek esetében azonban pH=6 felett uralkodó részecskének számít, még nagyobb stabilitást mutat.

Az összehasonlító elemzések rávilágítottak, hogy a makrokelát szerkezetet tartalmazó komplexek termodinamikai stabilitása függ a peptidláncban helyet foglaló hisztidinek számától, egymáshoz viszonyított helyzetétől és pozíciójától. A legnagyobb stabilitású komplexek a HXHYH szekvenciát tartalmazó peptidek esetében képződnek.

## **2. Kísérleti körülmények, vizsgálati módszerek**

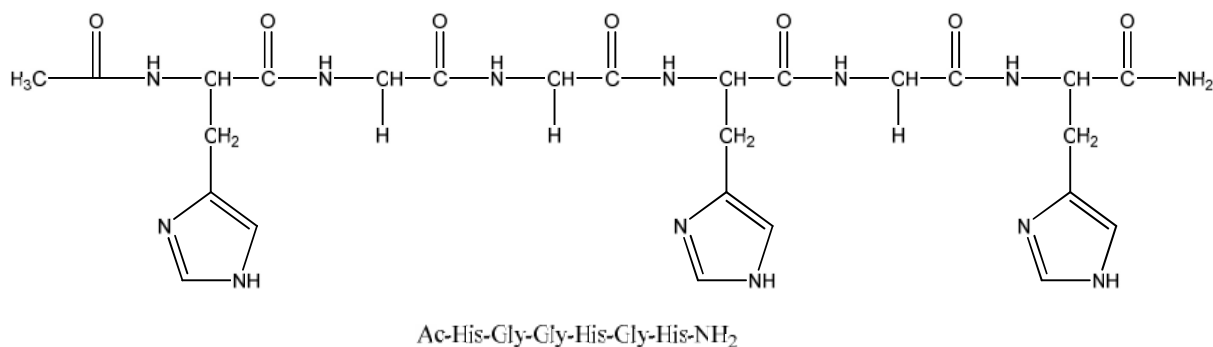
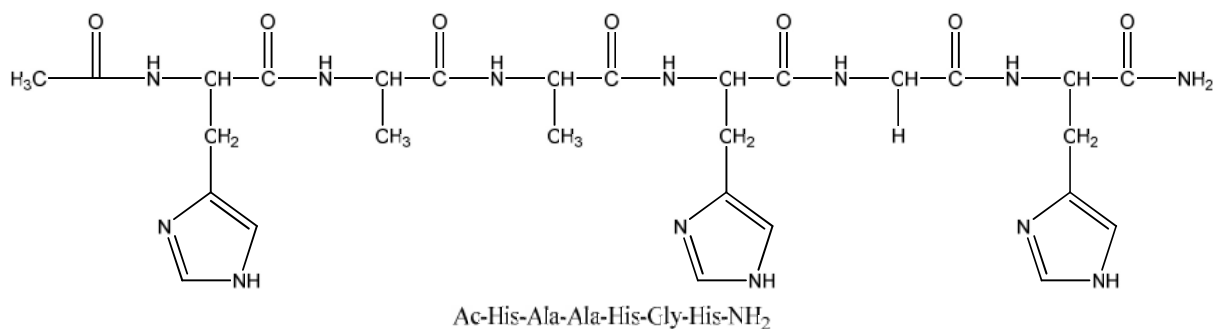
### **2.1. Felhasznált vegyszerek**

A méréseket pontosan ismert koncentrációjú CuCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, HCl és KOH oldatokkal végeztem. A KOH oldat pontos koncentrációját pH-potenciometriásan határoztam meg kálium-hidrogén-ftalát-oldat titrálási görbéjének Gran-féle linearizálásával<sup>17</sup>, majd a savkoncentrációt a már pontosan ismert koncentrációjú lúgoldatra határoztam meg.

A titrálásokat ~0,2 mol/dm<sup>3</sup> pontosan ismert koncentrációjú, karbonátmentes, argon atmoszférában készített és tárolt KOH oldattal végeztem. Az egyes mintákban az állandó ionerősséget 1 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú KCl oldattal állítottam be úgy, hogy a koncentrációja minden mintában 0,2 mol/dm<sup>3</sup> legyen.

### **2.2 Vizsgált peptidek**

Az általam vizsgált ligandumokat a Debreceni Egyetem Analitikai és Szervetlen Kémiai Tanszékének tulajdonában álló Liberty 1 típusú szilárd fázisú peptidszintetizáló berendezéssel állítottuk elő. A vizsgált ligandumok egyikét (Ac-His-Ala-Ala-His-Gly-His-NH<sub>2</sub>, továbbiakban HAAHGH) saját magam állítottam elő, míg a másik ligandumot (Ac-His-Gly-Gly-His-Gly-His-NH<sub>2</sub>, továbbiakban HGGHGH) a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport egy másik tagja, Asztalos József Attila szintetizálta<sup>18</sup> (2. ábra).



**2. ábra:** A vizsgált peptidek szerkezeti képlete

## 2.3 Peptidszintézis

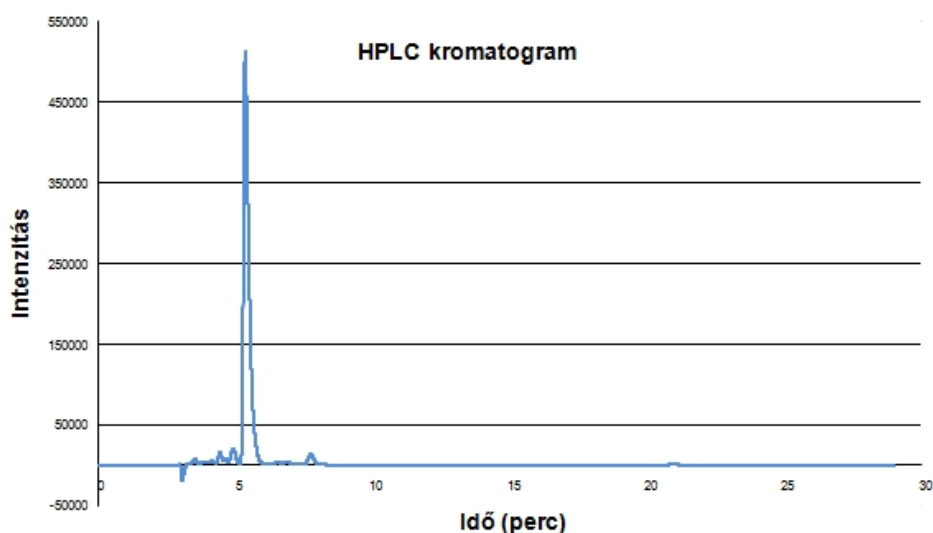
A peptidszintézist Liberty 1 típusú szilárd fázisú peptidszintetizálóval végeztük. Ezt a technikát 1963-ban egy amerikai professzor, R. B. Merrifield publikálta a peptidek szintézisére.<sup>19</sup> Ezen módszer automatizálásával ma már egyszerűbb módon tudunk peptideket szintetizálni. A mikrohullámmal sugárzott reakciótér eredményeként csaknem teljesen tiszta peptideket lehet előállítani. A készülék teljes mértékben számítógép által vezérelt. A számítógép segítségével kiszámíthatjuk a szükséges aminosavak, illetve reagensek mennyiségét. Ehhez először be kell táplálni az előállítani kívánt peptid szekvenciáját, majd kiválasztjuk, hogy védett vagy szabad végcsoportot tartalmazzon. Meg kell adnunk a használni kívánt gyanta minőségét, illetve az előállítani kívánt anyagmennyiséget. Ezután a program kiszámolja a szükséges mennyiségeket.

Az esetleges hibák elkerülése érdekében minden esetben felesleget alkalmaztunk a számított mennyiségekhez képest. A bemérés során az aminosavakat szilárd állapotban, tömeg szerint mértük ki táramérlegben. A megfelelő flakonokba helyeztük őket, majd

megfelelő térfogatú DMF (dimetil-formamid) oldószerben feloldottuk őket, és a helyükre csavartuk a flakonokat. Két aminosav kapcsolásához először el kell távolítani a Fmoc (9-fluor-metiloxi-karbonil-csoport) védőcsoportokat, majd aktivátor (HOBt: hidroxibenzotriazol, TBTU: benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametil-urónium-tetrafluoroborát) illetve aktivátor bázis (DIPEA: diizopropil-etil-amin) hozzáadása szükséges. A következő kapcsoláshoz ismét el kell távolítani a védőcsoportot, ez 20%-os piperidin (DMF-ben) oldattal történik. Az utolsó aminosav kapcsolása után a C-terminális vég acil-védőcsoportja 5% Ac<sub>2</sub>O-t (ecetsv-anhidrid) és 6% DIPEA-t tartalmazó DMF oldattal történő kezelés során kerül a peptide-re.

Amikor a védőcsoport is rákerült a peptide-re, TFA/TIS/EDT/H<sub>2</sub>O (trifluoecetsav/triizopropil-szilán/etán-ditiol/víz) hasítóeleggyel le kell hasítani a gyantáról. Ezt követően kicsapjuk a peptidet, így szűrhetővé válik, majd liofilizálás során az összes vizet eltávolítjuk róla. A liofilizálást követően a szilárd peptidet kézhez kapjuk, és fagyasztóládában korlátlan ideig tárolhatjuk.

Az előállított peptidet 50%-os kitermeléssel állítottam elő. Tisztaságát HPLC-vel vizsgáltuk, a HPLC-D429 készüléken Grace Vydac Tp C18-as (300 Å, 5µm, 250mm·4,6mm) kolonnával. A HPLC vizsgálat alapján a peptid megfelelő tisztaságú. A HPLC kromatogramot a 3. ábra mutatja be.



**3. ábra:** Az előállított peptid HPLC kromatogramja

## 2.4 pH-Potenciometria

Az oldatban lejátszódó egyensúlyi folyamatok állandóinak ismerete elméleti és gyakorlati szempontból egyaránt fontos. Esetünkben a képződő komplexek stabilitási állandóit határoztuk meg potenciometriás mérésekkel.

Az előállított peptidekből vizes oldatokat készítettem, az egyes minták kezdeti térfogata 3 illetve 4 ml, koncentrációjuk ligandumra nézve  $2 \cdot 10^{-3}$ - $3 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup> között változott. A ligandum-fémion arányát 1:3 és 2:1 arányok között változtattam.

Az ionerősséget megfelelő mennyiségű 1 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú KCl oldat hozzáadásával biztosítottam, így az ionerősség jó közelítéssel megegyezik a mérőoldat koncentrációjával, azonban jóval nagyobb, mint a ligandum-, illetve fémionkoncentráció összege, így biztosítva van, hogy az ionerősség nem változik a mintában a titrálás során.

A mérések kivitelezéséhez egy számítógép által vezérelt MOL-AcS bürettát és egy Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektóddal ellátott MOLSPIN pH-mérőt alkalmaztam. A  $\sim 0,2$  mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú KOH oldatot egy 1 cm<sup>3</sup> térfogatú Hamilton fecskendőből adagolta az automata büréta.

A pH-mérő kalibrációját minden esetben 0,050 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldattal végeztem, melynek pH-ja 25°C-on 4,008. Az állandó hőmérsékletet ultratermosztáttal biztosítottam. A mintákat mágneses keverő segítségével kevertettem, az egyensúly beállásának gyorsítása érdekében. Az oxigén kizárását argon gáz oldat fölé vezetésével biztosítottam.

A mérések eredményeit számítógép segítségével értékeltem ki. A ligandumok protonálódási és a fémkomplexek stabilitási állandóinak meghatározására a Nagypál István és Zékány László által kifejlesztett PSEQUAD<sup>20</sup>, valamint ennek egy továbbfejlesztett változatát, a SUPERQUAD<sup>21</sup> programokat használtam. A program a bruttó stabilitási állandók logaritmusát számítja:



$$\text{Komplekek stabilitási szorzata:} \quad \beta_{pqr} = [M_pA_qH_r] / [M]^p [A]^q [H]^r$$

$\beta_{pqr}$  a különböző lépcsőzetes folyamatok eredőjéből adódik, így további információkat, összehasonlítási lehetőségeket ad a lépcsőzetes egyensúlyokra vonatkozó állandók képzése.

## 2.5 UV-látható spektrofotometria

A spektrofotometriai módszerek alapja azon jelenség, hogy a molekula vagy atom fénnel történő besugárzás során gerjesztett állapotba jut, aminek oka, hogy a besugárzott fény egy részét elnyeli. A gerjesztéssel analóg módon fotonok formájában energiát emittál, így visszajut alapállapotba. A besugárzott fény lecsökkent intenzitását mérni tudjuk. Mivel a fehér fény több komponensből tevődik össze, nehéz lenne kiszűrni, hogy milyen energiájú fényt nyelt el a molekula. Ennek egyszerűbbé tételére a mintát monokromatikus fénnel sugározzuk be, méghozzá úgy, hogy a hullámhosszát változtatjuk. Így nyerhető a minta spektruma, ahol az áteresztett (illetve a minta által visszavert) sugárzás intenzitását vagy az ezekből számolt abszorbeált fény intenzitását ábrázoljuk a gerjesztő sugárzás energiájának függvényében.

Az UV-látható spektrofotometriai módszert használhatjuk kvalitatív, illetve kvantitatív meghatározásokra egyaránt. A mi esetünkben a különböző pH-értékeken felvett spektrumok maximumainak eltolódása alapján a komplexek szerkezetére, geometriájára és a koordinálódó donoratomok számára következtethetünk.

**Cu(II)-komplexek:** A Cu(II)-ligandum rendszerek vizsgálata során a spektrumokat Perkin Elmer Lamda 25 típusú kétsugaras fotométeren, 1,000 cm-es küvettában vettük fel különböző pH-értékeken, különböző fémion/ligandum arányoknál.

A réz(II)-komplexek spektroszkópiai sajátságairól nehéz általános törvényszerűségeket levonni a koordinációs módok sokfélesége, illetve a sok befolyásoló tényező miatt. A tetragonálisan torzult, oktaédes szerkezetű komplexekben a d-d átmenetekhez tartozó sávok összeolvadhatnak, energiájuk és intenzitásuk erősen függ a koordinálódó donoratomok számától. A vizes oldatokban jelenlevő  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -ion négy ekvatoriális vízmolekulájának oxigén- vagy nitrogéndonorokkal történő helyettesítése az abszorpciós maximumot a rövidebb hullámhosszak felé tolja el. Ez az effektus különösen nitrogéndonoroknál jelentős. Kvantitatív összefüggések megadását az nehezíti, hogy az effektus nagysága a donoratom kémiai természetén kívül függ a kelátgyűrű méretétől, valamint a ligandumhoz kapcsolódó, de a koordinációban részt nem vevő szubsztituensektől is. Az abszorpciós maximumok helye megbecsülhető a következő empirikus függvény alapján<sup>22</sup>:

$$\lambda_{\max} [\text{nm}] = \frac{10^3}{1,18 + 0,052(\text{COO}^-) + 0,166(\text{NH}_2) + 0,200(\text{N} =) + 0,140(\text{Im})}$$

Ezen összefüggés nem alkalmazható abban az esetben, ha kelátképződés van az egyik axiális pozícióval. Az axiális koordináció ugyanis a  $\lambda_{\max}$  értékeinek kismértékű eltolódását eredményezi a nagyobb hullámhosszak felé (vörös eltolódás).

**Ni(II)-komplexek:** A Ni(II)-ligandum rendszerek spektrumait Hewlett Packard HP8453 típusú, egysugaras, diódasoros fotométeren vettük fel 1,000 cm-es küvettában különböző pH-értékeken, különböző fémion/ligandum arányoknál.

A Ni(II)-komplexek jellemző koordinációs száma a 4, 5 és 6, ezek közül a legjellemzőbb a 4 és 6. A 6-os koordinációs számú, oktaéderes geometriájú komplexeknek három spinmegengedett d-d átmenete van a látható hullámhossz tartományban, de mindhárom elég gyenge. A komplex geometriájának torzulása a középső sáv felhasadását eredményezheti. Ezek mellett létezik egy még kisebb intenzitású, spintiltott átmenet is, amely általában csak vállként jelenik meg valamelyik csúcson.

A 4-es koordinációs számú, tetraéderes geometriájú nikkel(II)-komplexek elnyelése sokkal intenzívebb. A látható sáv hullámhossz tartománya 500-900 nm.

A 4-es koordinációs számmal gyakran képződnek diamágneses sajátságú, síknégyszetes geometriájú komplexek is, különösen erős terű ligandumok esetén (ilyenek lehetnek például a peptidek amidnitrogénjei). Ezek könnyen ki is alakulhatnak más geometriájú komplexekből. Az ilyen szerkezetű komplexek 400-550 nm körül adnak egy elég intenzív sávot. Egy második, még intenzívebb sáv található 430 nm alatt, amely gyakran töltésátviteli eredetű.

## 2.6 Cirkuláris dikroizmus (CD) – spektroszkópia

A CD spektroszkópia a polarizált fény és egy optikailag aktív anyag kölcsönhatásán alapuló spektroszkópai módszer. A síkban polarizált fény egy balra és egy jobbra cirkulárisan polarizált fénysugár összegének tekinthető. Az optikailag aktív anyagok a síkban polarizált fény ezen két összetevőjével különbözőképpen lépnek kölcsönhatásba (eltérő a törésmutatójuk), a kilépő fény elliptikusan polarizált lesz. A cirkuláris dikroizmus, vagy más néven Cotton-effektus a síkban polarizált fény két összetevőjének különböző abszorpciója.

Az optikailag aktív anyagokban a jobbra és a balra cirkulárisan polarizált sugárzás nemcsak különböző törésmutatóval, hanem különböző abszorpciós koefficienssel is

jellemezhető. Így a közegen való áthaladás után a két sugár különböző helyen és amplitúdóval találkozik. A kétféle fénysugár abszorpciójának különbségét (pontosabban a  $\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$  értéket) a hullámhossz függvényében ábrázolva megkapjuk a cirkuláris dikroizmus görbét. A CD görbe maximuma, illetve minimuma az elektrongerjesztési abszorpciós spektrum maximuma helyén, illetve ahhoz igen közel jelentkezik.

A fémkomplexek optikai aktivitása a komplexmolekula aszimmetriájától vagy a ligandum saját – a komplexképződés előtt is meglevő – aszimmetriájától származhat. A komplexmolekula optikai aktivitását okozhatja a központi atom aszimmetriája, vagy a komplexképződés hatására a ligandum donoratomján kialakuló aszimmetria (Meisenheimer-komplex). A koordináció hatására nem csak egy donoratom, hanem egy egész ligandum is aszimmetrikussá válhat, ami szintén a komplex optikai aktivitását eredményezi.

A komplexek CD-spektrumának egyik jellegzetessége a jelek intenzitásának additivitása, azaz az egyes (nem koordinálódó) oldalláncok hatása összeadódik. Például a trialanin komplexének CD intenzitása egy adott hullámhosszon egyenlő a háromféle, egy alaninból és két glicinből felépülő tripeptidek esetén tapasztalt intenzitások összegével. Ez az összefüggés nemcsak az alanin esetén igaz, hanem valamennyi nemkoordinálódó oldalláncot tartalmazó peptidre érvényes.<sup>23-25</sup> Általánosan megfogalmazva egy XYZ tripeptid komplexének várható CD spektruma adott hullámhosszon a következőképpen számítható:

$$\Delta\epsilon_{\lambda}^{X-Y-Z} = \Delta\epsilon_{\lambda}^{X-\text{Gly}-\text{Gly}} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{\text{Gly}-Y-\text{Gly}} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{\text{Gly}-\text{Gly}-Z}$$

ahol  $\Delta\epsilon_{\lambda}^{X-Y-Z}$  az adott X-Y-Z tripeptid  $\text{MAH}_2$  összetételű komplexének  $\lambda$  hullámhosszon mért Cotton-effektusa.

A CD-méréseket a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén végeztem. A spektrumokat JASCO-810 spektrométeren, szobahőmérsékletű vizes oldatokban vettem fel különböző pH-értékeknél, illetve fémion/ligandum arányoknál. 0,100 és 1,000 cm-es úthosszúságú küvettákat használtam.

### 3. Kísérleti eredmények és értékelésük

#### 3.1. A ligandumok protonálódási állandói

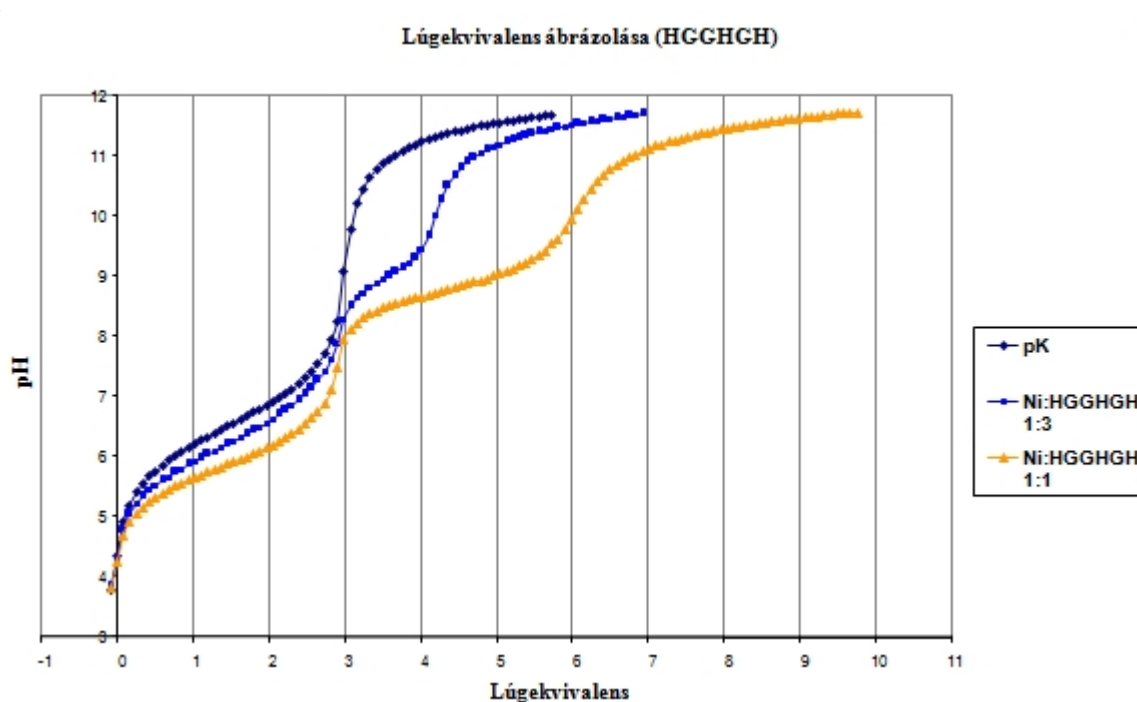
Elsőként a vizsgált ligandumok protonálódási állandóit határoztam meg pH-potenciometriásan. A protonálódási állandókat az 1. táblázatban foglaltam össze. Mivel mindkét általam vizsgált ligandum terminálisan védett peptid, ezért csak az oldallánc deprotonálódásának állandói határozhatók meg. Ennek megfelelően a deprotonálódási állandók a hisztidin aminosavak imidazolcsoportjaihoz rendelhetők. Néhány korábban meghatározott ligandum protonálódási állandóit is feltüntettem a táblázatban összehasonlítás céljára és mérési eredményeimet összevettem az irodalmi adatokkal.

**1. táblázat:** A vizsgált ligandumok protonálódási állandói ( $I = 0,2 \text{ mol/dm}^3$  (KCl) ionerősség,  $T = 25^\circ \text{C}$ )

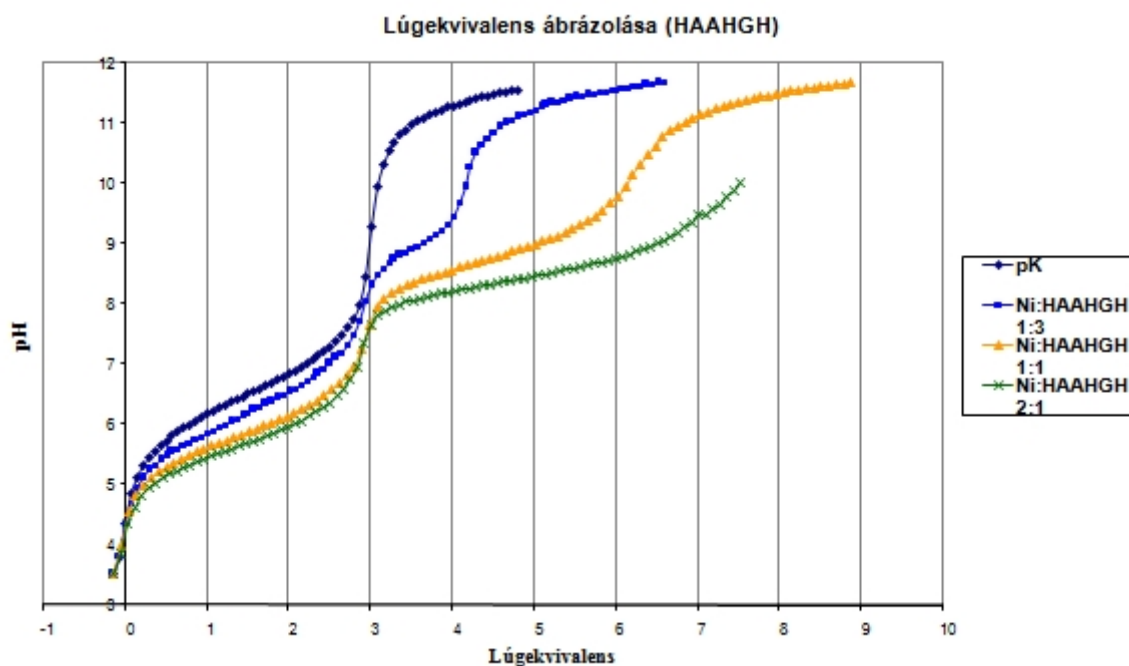
| Protonálódási állandók          |                           |                                         |                           |                                        |                                       |                                      |
|---------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
|                                 | Ac-HAAHGH-NH <sub>2</sub> | Ac-HGGHGH-NH <sub>2</sub> <sup>18</sup> | Ac-HGGHGH-NH <sub>2</sub> | Ac-HVHGH-NH <sub>2</sub> <sup>16</sup> | Ac-HGGH-NH <sub>2</sub> <sup>26</sup> | Ac-HVVH-NH <sub>2</sub> <sup>9</sup> |
| [HA] <sup>+</sup>               | 7,00 (1)                  | 7,01                                    | 7,03 (2)                  | 6,92                                   | 6,84                                  | 6,73                                 |
| [H <sub>2</sub> A] <sup>+</sup> | 13,36 (1)                 | 13,36                                   | 13,37 (2)                 | 13,23                                  | 12,88                                 | 12,74                                |
| [H <sub>3</sub> A] <sup>+</sup> | 19,16 (1)                 | 19,21                                   | 19,18 (3)                 | 18,95                                  | -                                     | -                                    |
| pK <sub>1</sub>                 | 5,80 (1)                  | 5,85                                    | 5,81 (3)                  | 5,72                                   | 6,04                                  | 6,01                                 |
| pK <sub>2</sub>                 | 6,36 (1)                  | 6,35                                    | 6,34 (2)                  | 6,31                                   | 6,84                                  | 6,73                                 |
| pK <sub>3</sub>                 | 7,00 (1)                  | 7,01                                    | 7,03 (2)                  | 6,92                                   | -                                     | -                                    |

A három hisztidin aminosavat tartalmazó peptidekre jellemző protonálódási állandók jó egyezésben vannak egymással. A HXXHGH szekvenciájú peptidekre kapott értékek gyakorlatilag megegyeznek, és hasonlóak a HVHGH szekvenciájú peptidéhez is. Ez arra utal, hogy az egyik hisztidin egy aminosavval távolabbra került, nem befolyásolta a sav-bázis egyensúlyi folyamatokat.

### 3.2. A peptidek Ni(II)-komplexei



4. ábra: A Ni(II)-HGGHGH rendszer titrálási görbéi ( $c_{\text{lig}}=3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ )



5. ábra: A Ni(II)-HAAHGH rendszer titrálási görbéi ( $c_{\text{lig}}=3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ )

A titrálási görbéken jól látszik, hogy ~5-ös pH-értéken kezdődik a komplexképződés, majd az ekvivalencia pont beállta után egy újabb lúgfogyasztó folyamat során megkezdődik az amidnitrogének deprotonálódása.

A nikkel(II)-komplexekre számolt stabilitási állandókat a 2. táblázatban foglaltam össze. Néhány korábban meghatározott ligandum adatait is feltüntettem összehasonlítás céljára.

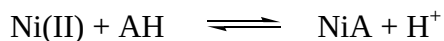
**2. táblázat:** A nikkel(II)-komplexekre számolt stabilitási állandók logaritmusa ( $I = 0,2$  mol/dm<sup>3</sup> (KCl),  $T = 25^\circ\text{C}$ )

| Ni(II)-komplexek stabilitási és protonálódási állandói |                           |                           |                                        |                                       |                                      |                           |
|--------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| lg $\beta$                                             | Ac-HAAHGH-NH <sub>2</sub> | Ac-HGGHGH-NH <sub>2</sub> | Ac-HVHGH-NH <sub>2</sub> <sup>10</sup> | Ac-HGGH-NH <sub>2</sub> <sup>26</sup> | Ac-HVVH-NH <sub>2</sub> <sup>9</sup> | Ac-HGH-NHMe <sup>10</sup> |
| NiAH                                                   | 10.71 (5)                 | 10.7 (2)                  | 10.83                                  | -                                     | -                                    | 9.32                      |
| NiA                                                    | 4.66 (4)                  | 4.78 (9)                  | 4.8                                    | 3.70                                  | 3.67                                 | 4.02                      |
| NiAH <sub>2</sub>                                      | -                         | -                         | -12.59                                 | -                                     | -                                    | -13.28                    |
| NiAH <sub>3</sub>                                      | -21.6 (6)                 | -21.4 (13)                | -22.04                                 | -21.81                                | -23.62                               | -22.17                    |
| NiA <sub>2</sub>                                       | -                         | -                         | -                                      | -                                     | -                                    | 6.93                      |
| Ni <sub>2</sub> AH <sub>2</sub>                        | -                         | -                         | -8.91                                  | -                                     | -                                    | -                         |
| Ni <sub>2</sub> AH <sub>4</sub>                        | -25.64 (5)                | -25.4 (16)                | -25.73                                 | -                                     | -                                    | -                         |
| Ni <sub>2</sub> AH <sub>5</sub>                        | -                         | -                         | -35.64                                 | -                                     | -                                    | -                         |
| pK <sub>13</sub> (amid) <sup>a</sup>                   | 8.75                      | 8.73                      | -                                      | 8.50                                  | 9.10                                 | -                         |
| pK <sub>12</sub> (amid) <sup>b</sup>                   | -                         | -                         | 8,69                                   | -                                     | -                                    | 8,65                      |
| pK <sub>3</sub> (amid) <sup>c</sup>                    | -                         | -                         | 4,72                                   | -                                     | -                                    | 4,44                      |
| pK (NiAH/NiA)                                          | 6.05                      | 5.92                      | 6.03                                   | -                                     | -                                    | 5.3                       |

<sup>a</sup>  $[\lg\beta(\text{NiA}) - \lg\beta(\text{NiAH}_3)]/3$ , <sup>b</sup>  $[\lg\beta(\text{NiA}) - \lg\beta(\text{NiAH}_2)]/2$ , <sup>c</sup>  $[\lg\beta(\text{NiAH}_2) - \lg\beta(\text{NiAH}_3)]/2$

A táblázat adataiból látható, hogy mind a HAAHGH mind a HGGHGH szekvenciájú peptid esetében ugyanolyan összetételű komplexek vannak jelen a rendszerben. Mind ekvimoláris, mind ligandumfelesleget tartalmazó oldatban 1:1 arányú komplexek keletkeznek. Fémfelesleg esetén kétmagvú komplexek keletkezése is feltételezhető.

A NiAH összetételű komplex esetében két imidazolgyűrűn koordinálódik a fémion, míg a harmadik protonált formában marad. Ez többféle izomer szerkezetben valósulhat meg. Ahhoz, hogy megbecsüljük, melyik izomer szerkezet a kedvezőbb, össze kell hasonlítanunk a különböző szekvenciájú peptidekhez tartozó adatokat. Ezeket az adatokat a 3. táblázatban foglaltam össze. A két imidazol nitrogén koordinációjú komplexek stabilitási állandói a három hisztidin aminosavat tartalmazó peptidek esetében a

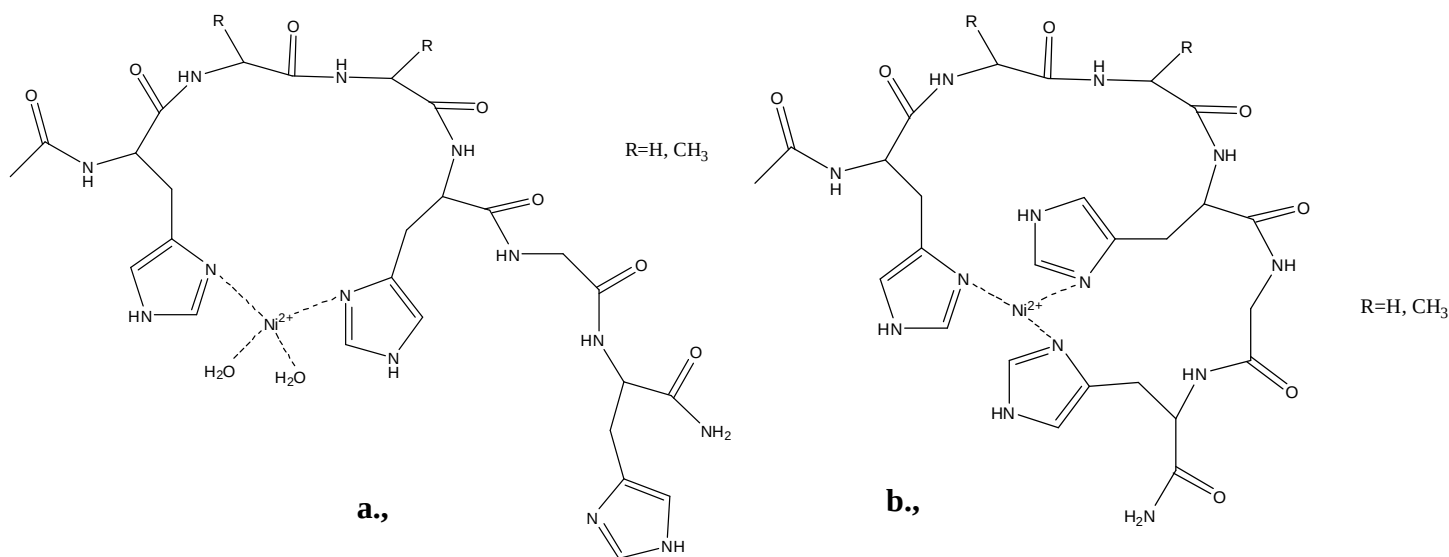


folyamatra vonatkozó állandó, míg a két hisztidin aminosavat tartalmazó peptidek esetében a NiA összetételű komplexek stabilitási állandói.

**3. táblázat:** A két imidazol nitrogén koordinációjú nikkel(II)-komplexek stabilitási állandóinak logaritmusai (\*  $\lg\beta(\text{NiA})$ )

|               | $\lg\beta(\text{NiAH})\text{-pK}_3$ |             | $\lg\beta(\text{NiA})$ |              | $\lg\beta(\text{NiAH})\text{-pK}_3$ |
|---------------|-------------------------------------|-------------|------------------------|--------------|-------------------------------------|
| <b>HGGHGH</b> | 3,69                                | <b>HGGH</b> | 3,70                   | <b>HGH</b>   | 4,02*                               |
| <b>HAAHGH</b> | 3,71                                | <b>HVVH</b> | 3,67                   | <b>HVHGH</b> | 3,91                                |

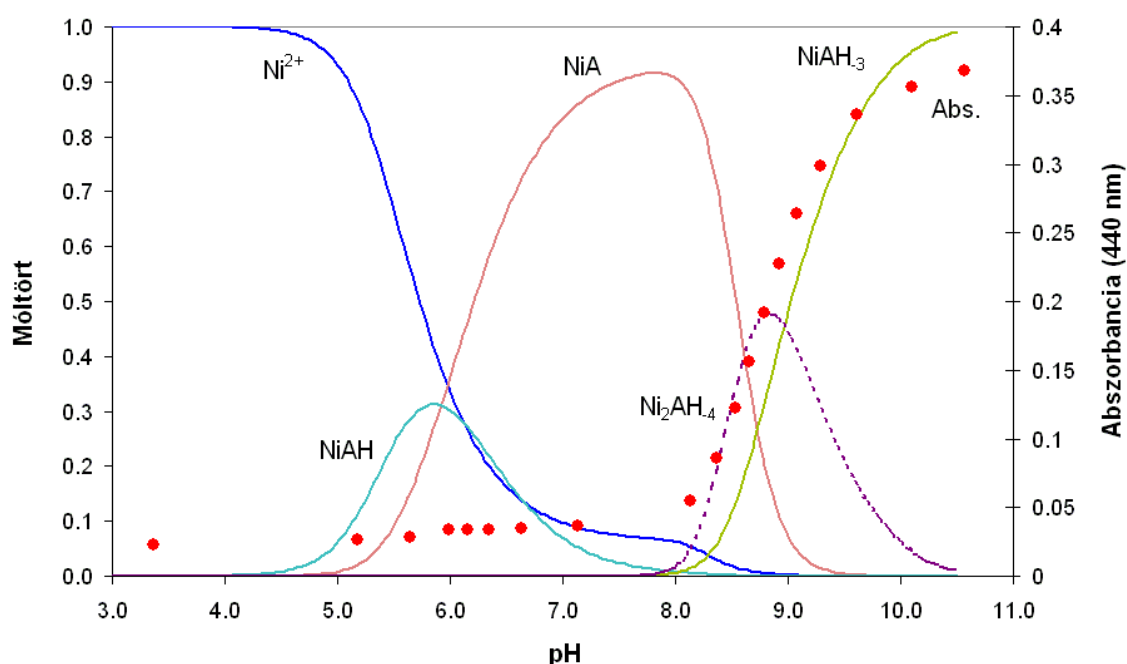
Az adatok alapján megállapítható, hogy a vizsgált két peptid esetén a számított értékek közelebb vannak azon értékekhez, amelyeket két egymástól távolabb lévő His aminosavat tartalmazó peptidek vizsgálata esetén kaptunk. Ezek alapján kedvezőbb lehet annak az izomernek a képződése, ahol a fémion a két távolabbi imidazolnitrogénhez kötődik (6. ábra **a.**).



**6. ábra:** A képződő NiAH (**a.**) és NiA (**b.**) összetételű komplexek sematikus szerkezete

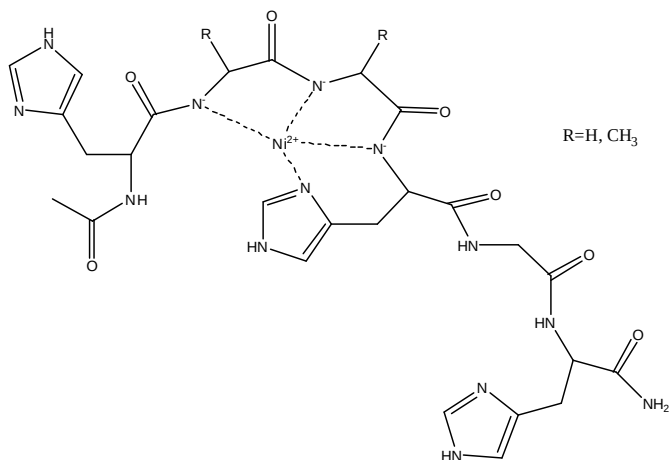
A NiA összetételű komplex esetén a harmadik imidazol gyűrű is deprotonálódik, kötődik a fémionhoz (6. ábra **b.**). A NiAH/NiA deprotonálódást jellemző  $\text{pK}(\text{NiAH}/\text{NiA})$

érték kisebb, mint a ligandumra jellemző deprotonálódási állandó. Ebből arra következtethetünk, hogy a fémion elősegíti az imidazolcsoport deprotonálódását. A kialakuló NiA összetételű komplexek stabilitása jelentős, uralkodó komplexek a gyengén savas (pH~6) tartományban. (7. ábra) Ez jóval nagyobb stabilitás, mint ami egy oligopeptid MA komplexét jellemzi.

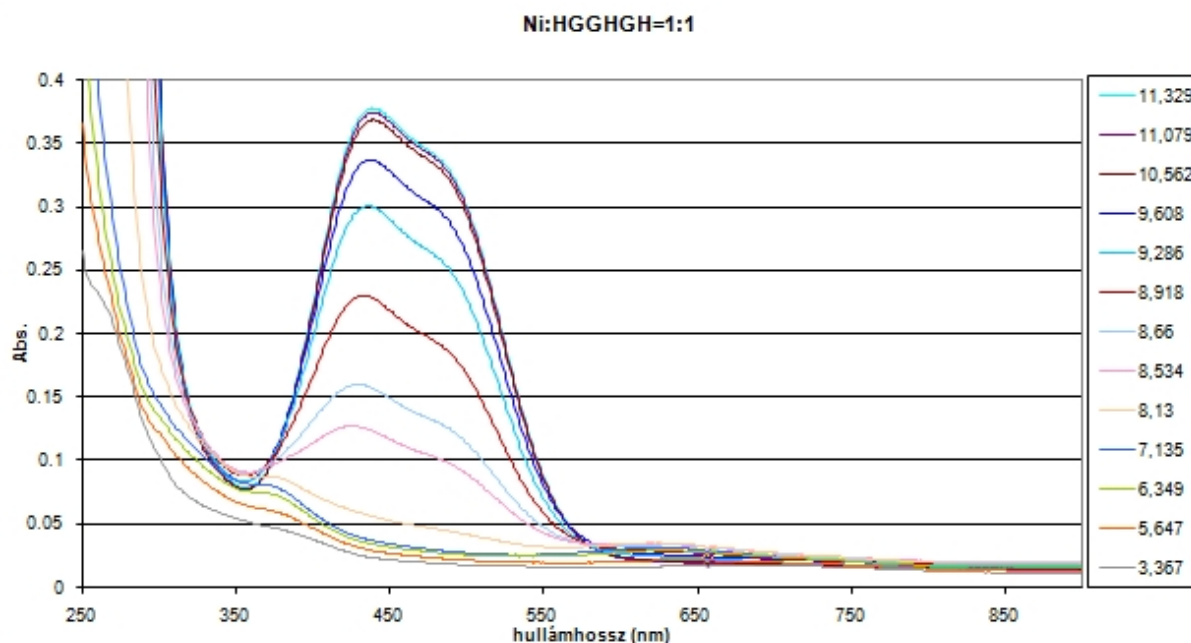


**7. ábra:** A Ni(II):HGGHGH 1:1 arányú rendszerének eloszlásgörbéje és az abszorbancia változás (piros pontozott görbe) a pH függvényében

Nagyobb pH érték esetén lejátszódik az amidnitrogének deprotonálódása, és egy lépésben  $\text{NiAH}_3$  összetételű komplex képződik. Ez meglepő, mert mint ahogyan az a 2. táblázatban is látható, a HXH szekvenciát tartalmazó peptidek esetén jellemző az (Im(N),  $\text{N}^-$ ,  $\text{N}^-$ , Im(N)) koordinációjú  $\text{MLH}_2$  összetételű komplexek képződése és erre a koordinációra meg is lenne a lehetőség. Elviekben számítható lépcsőzetes deprotonálódás, de a deprotonálódásra jellemző állandók nagyon közel esnek egymáshoz, ami arra utal, hogy ezek a folyamatok kooperatív módon játszódnak le.



**8. ábra:** A  $\text{NiAH}_3$  összetételű komplex sematikus szerkezete

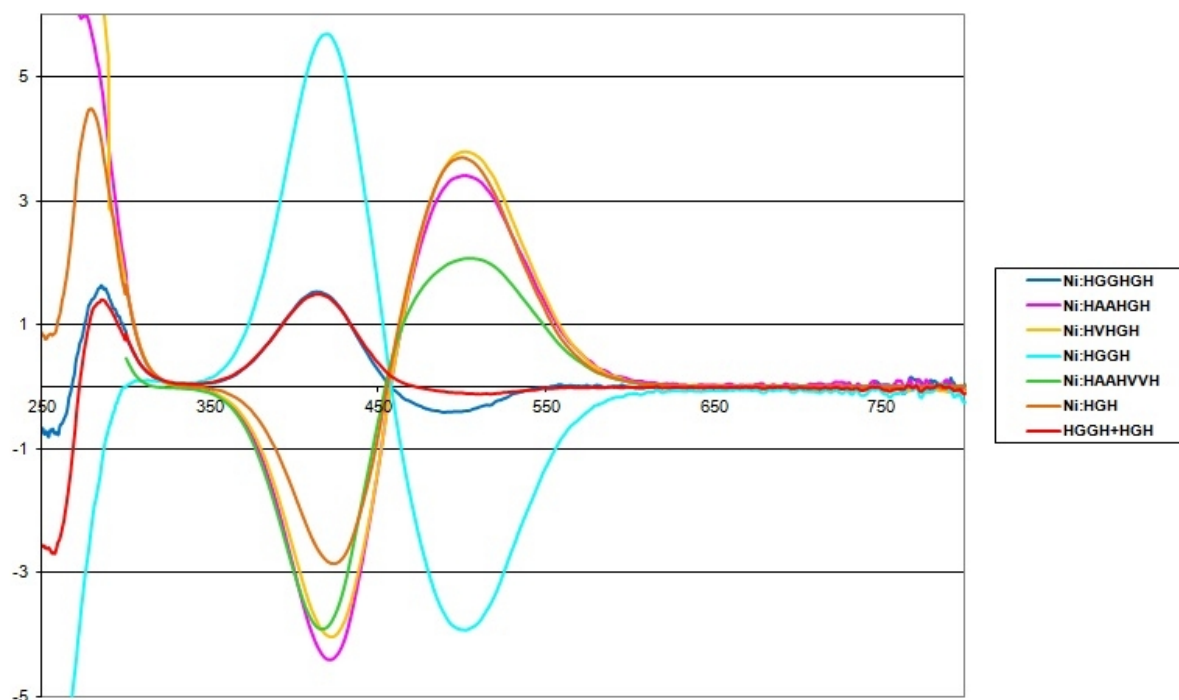


**9. ábra:** A Ni(II):HGGHGH 1:1 rendszer UV-látható fotometriás spektrumai

A  $\text{NiAH}_3$  összetételű komplex koordinációja ( $\text{N}^-$ ,  $\text{N}^-$ ,  $\text{N}^-$  Im(N)), ami megvalósulhat a közbelső hisztidin aminosav részvételével is (8. ábra). Ennek a koordinációjú komplexnek a képződését és jelentős mennyiségét tükrözik a spektrális adatok. Az UV-látható spektrofotometria spektrumán látható (9. ábra), hogy a  $\text{pH}=8,5$  körül egy intenzív széles sáv jelenik meg  $\sim 440$  nm hullámhossz értéknél. Ennek a csúcsnak csak az intenzitása nő a pH emelésével. Hasonló spektrum jellemzi a HGH és HGGH peptidek komplexeit is. Azonban ez még nem elegendő bizonyíték a koordináció helyének igazolásához. Egyértelmű bizonyítékot a CD-spektrumok szolgáltatnak. Ha a HXH szekvencia koordinálódásával kialakuló komplex lenne a meghatározó, akkor a Ni(II)-HGH, HAAHGH és a HGGHGH esetén hasonló CD-spektrumot kellene kapnunk. Mind 9-es, mind 11-es pH érték esetén eltérés figyelhető meg. A HGGHGH peptid komplexéhez tartozó spektrum különbözik a többitől, éppen ellentétes a d-d átmenethez tartozó Cotton-effektus előjele (10. ábra).

Ez alátámasztja a HGGH szekvenciájú rész koordinációjának kedvezményezettségét. A koordinálódó HXXH részben ha glicin a hisztidint követő aminosav, ez ellentétes Cotton-effektust eredményez. Így ez összhangban van korábbi tapasztalatokkal és az irodalommal.<sup>27</sup>

Nem kizárólag ez a komplex lehet jelen a rendszerben, feltételezhetően kétféle izomer alakul ki, erre utal, hogy ha a HGH és HGGH-ra jellemző spektrumokat összegezzük mind 9-es mind 11-es pH érték esetén a HGGHGH-komplexe CD-spektrumához hasonló spektrumot kapunk. Az izomerek aránya kb 40:60%-ra tehető.



**10. ábra:** A pH~11 értékhez tartozó CD-spektrumok összehasonlítása

Feltételezhető, hogy hasonló koordinációs izomerek alakulnak ki a HAAHGH szekvenciájú peptid esetén is, erre utalnak a hasonló deprotonálódási folyamatok is. A HAAHGH-komplexek CD-spektruma hasonló a HAAHVH- és a HVHGH-komplexekhez tartozó spektrumokhoz, de a Cotton-effektushoz tartozó  $\lambda$  értékek minimálisan eltérnek a HGH-komplexekhez tartozó spektrumtól. A komplexekhez tartozó spektrumok  $\lambda_{\max}$  értékeit a 4. táblázat foglalja össze.

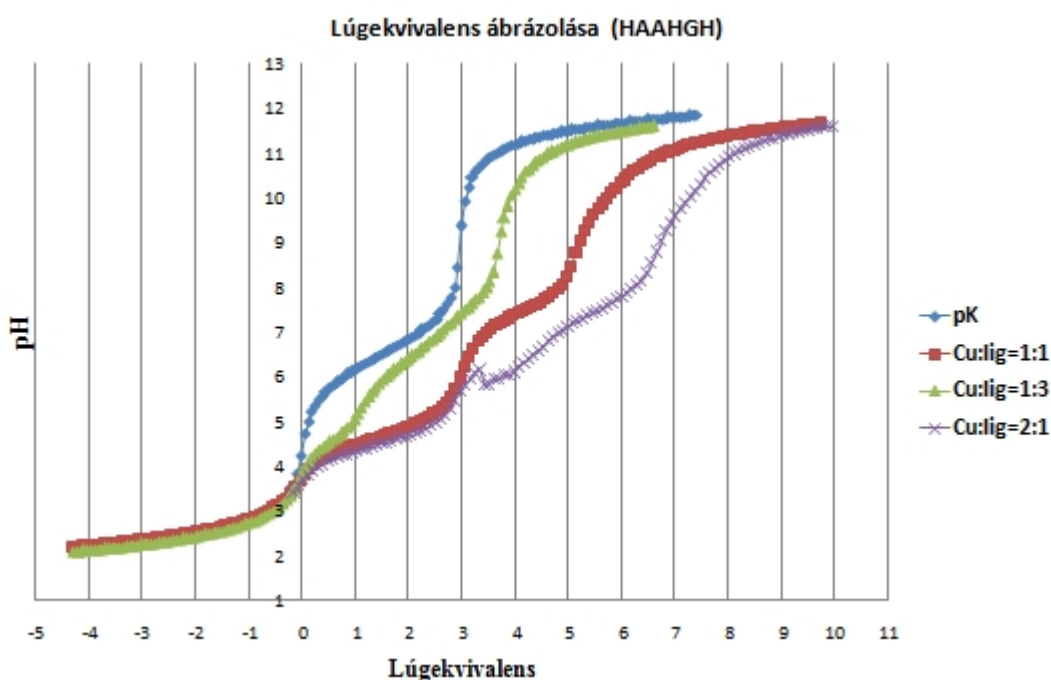
Fémionfelesleg esetén feltételezhető kétmagvú,  $\text{Ni}_2\text{AH}_4$  összetételű komplex keletkezése. A potenciometriás vizsgálatok csak 9-es pH értékig végezhetők, ezt követően csapadék válik ki. A két fémion feltételezhetően ( $\text{N}^-$ ,  $\text{N}^-$ ,  $\text{Im}(\text{N})$ ) koordinációval kötődhet, de az amidnitrogének deprotonálódása átfedésben van a fémion hidrolízisével.

**4. táblázat:** A Ni(II)-ligandum rendszerek fotometriás és CD-spektroszkópiás spektrumainak  $\lambda_{\max}$  értékeit összefoglaló táblázat (a hullámhossz értékek nm-ben, a moláris abszorbancia ( $\epsilon$ ) értékek  $\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$  egységben értendők)

|              | Ni:HAAHGH                       |               |                                  |               | Ni:HGGHGH                       |                |                                |               |
|--------------|---------------------------------|---------------|----------------------------------|---------------|---------------------------------|----------------|--------------------------------|---------------|
|              | 1:3                             |               | 1:1                              |               | 1:3                             |                | 1:1                            |               |
|              | UV                              | CD            | UV                               | CD            | UV                              | CD             | UV                             | CD            |
| <b>pH=8</b>  | 372 (64),<br>620 (23)           | 235,5 (-1,94) | 380 (38),<br>630 (14)            | 235 (-0,17)   | 365<br>(83)+váll<br>477 (95)    | 289,5 (0,18)   | 369 (43),<br>628 (17)          | 260,5 (2,16)  |
|              |                                 | 259 (0,97)    |                                  | 257 (0,99)    |                                 | 356 (0,02)     |                                | 417 (0,12)    |
|              |                                 | 418 (-0,51)   |                                  | 416,5 (-0,44) |                                 | 418 (0,19)     |                                | 512 (0,27)    |
|              |                                 | 505 (0,34)    |                                  | 511 (0,22)    |                                 | 480,5 (-0,09)  |                                |               |
| <b>pH=9</b>  | 442<br>(156)+váll<br>486 (127)  | 244 (4,41)    | 440<br>(143)+váll<br>485 (108)   | 247 (6,52)    | 438<br>(164)+váll<br>477 (149)  | 277,5 (1,29)   | 440<br>(127)+váll<br>480 (109) | 279,5 (1,64)  |
|              |                                 | 257 (5,25)    |                                  | 257 (7,34)    |                                 | 334,5 (0,02)   |                                | 412,5 (0,87)  |
|              |                                 | 420,5 (-2,79) |                                  | 421 (-3,38)   |                                 | 415 (0,97)     |                                | 471,5 (-0,02) |
|              |                                 | 501 (2,11)    |                                  | 501 (2,48)    |                                 | 486,5 (-0,129) |                                |               |
| <b>pH=11</b> | 442<br>(2119)+váll<br>486 (175) | 259,5 (7,11)  | 440 (218)<br>+ váll 485<br>(180) | 280 (5,57)    | 438 (199)<br>+váll 477<br>(179) | 288,5 (1,55)   | 440<br>(176)+váll<br>480 (159) | 285,5 (1,72)  |
|              |                                 | 279,5 (5,71)  |                                  | 421 (-4,21)   |                                 | 342 (0,04)     |                                | 414 (1,31)    |
|              |                                 | 421,5 (-4,41) |                                  | 501,5 (3,42)  |                                 | 413,5 (1,55)   |                                | 490 (-0,26)   |
|              |                                 | 502,5 (3,41)  |                                  |               |                                 | 490 (-0,40)    |                                |               |

### 3.3. A peptidek Cu(II)-komplexei

A Cu(II)-komplexek vizsgálatát a HAAHGH szekvenciájú peptid esetén végeztem el. A HGGHGH szekvenciájú peptid Cu(II)-komplexeit korábban már vizsgálták<sup>18</sup>. Ezeket a vizsgálatokat a fémionfelesleget tartalmazó arány pH-potenciometriás mérésével kiegészítettem, illetve a meghatározott paramétereket összehasonlításra használok fel.



**11. ábra:** A Cu(II)-HAAHGH rendszerek titrálási görbéi ( $c_{\text{lig}}=2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ )

A titrálási görbéken látható, hogy a komplexképződés 4-es pH-értéken kezdődik. Az ekvivalenciapont elérése után egy újabb lúgfogyasztó folyamat, az amidnitrogének deprotonálódása kezdődik. A komplexek stabilitási állandóit összefoglalva a 5. táblázat tartalmazza. Hasonlóan a nikkel(II)-komplexekhez először a CuAH (12. ábra **a.**), majd a CuA (12. ábra **b.**) összetételű komplex keletkezik. Feltételezhetően a CuAH összetételű komplex esetén ismét az egymástól távolabb eső két imidazolcsoporton keresztül is koordinálódhat a fémion, erre az 6. táblázat adatai utalnak. Azonban, mivel nem egyértelmű a kedvezményezettsége, feltehetően mindkét izomer jelen van a rendszerben. A táblázat adatainak értelmezéséhez a nikkel(II)-komplexek esetében leírtakat alkalmazzuk.

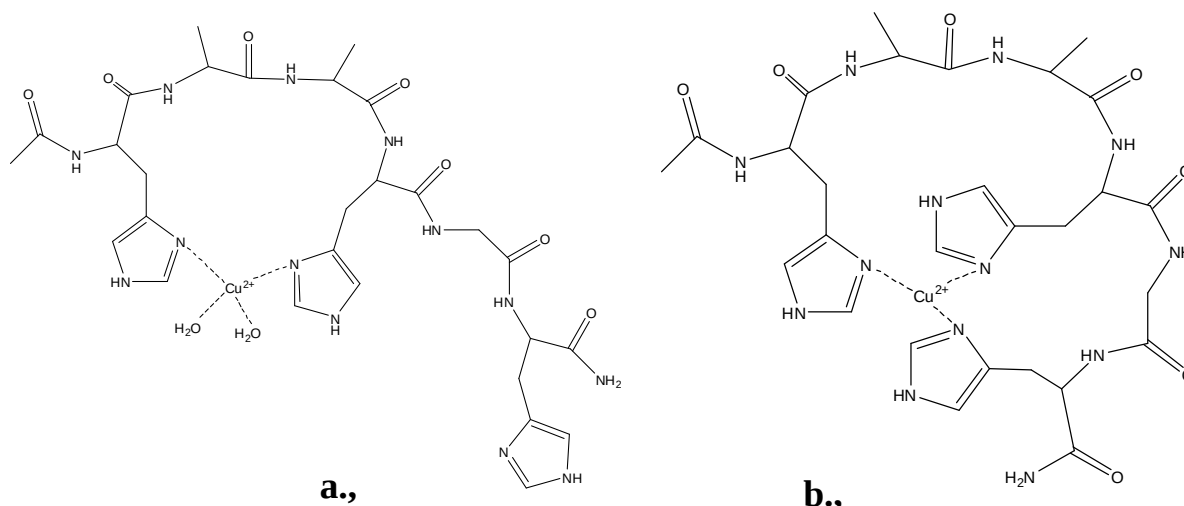
**5. táblázat:** A réz(II)-komplexekre számolt stabilitási állandók logaritmusa ( $I = 0,2 \text{ mol/dm}^3$  (KCl),  $T = 25^\circ\text{C}$ )

| <b>Cu(II)-komplexek stabilitási és protonálódási állandói</b>       |                                 |                                              |                                 |                                             |                                            |                                           |                                 |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------|
|                                                                     | <b>Ac-HAAHGH-NH<sub>2</sub></b> | <b>Ac-HGGHGH-NH<sub>2</sub><sup>18</sup></b> | <b>Ac-HGGHGH-NH<sub>2</sub></b> | <b>Ac-HVHGH-NH<sub>2</sub><sup>28</sup></b> | <b>Ac-HGGH-NH<sub>2</sub><sup>26</sup></b> | <b>Ac-HVVH-NH<sub>2</sub><sup>9</sup></b> | <b>Ac-HGH-NHMe<sup>13</sup></b> |
| <b>CuAH</b>                                                         | 13,02 (6)                       | 13,02                                        | 13,05 (6)                       | 13,09                                       | -                                          | -                                         | -                               |
| <b>CuA</b>                                                          | 8,55 (3)                        | 8,24                                         | 8,22 (5)                        | 7,78                                        | 5,97                                       | 5,79                                      | 6,32                            |
| <b>CuAH<sub>1</sub></b>                                             | 1,52 (11)                       | 1,44                                         | 1,78 (11)                       | 1,13                                        | -                                          | -1,05                                     | -0,11                           |
| <b>CuAH<sub>2</sub></b>                                             | -5,90 (7)                       | -5,82                                        | -5,69 (12)                      | -6,25                                       | -7,88                                      | -9,21                                     | -5,91                           |
| <b>CuAH<sub>3</sub></b>                                             | -14,95 (8)                      | -14,61                                       | -14,78 (17)                     | -16,39                                      | -16,1                                      | -17,6                                     | -16,01                          |
| <b>Cu<sub>2</sub>AH<sub>4</sub></b>                                 | -                               | -                                            | -15,02 (8)                      | -14,46                                      | -                                          | -                                         | -                               |
| <b>Cu<sub>2</sub>AH<sub>5</sub></b>                                 | -23,35 (9)                      | -20,81                                       | -23,1 (18)                      | -24,14                                      | -                                          | -                                         | -                               |
| <b>Cu<sub>2</sub>AH<sub>6</sub></b>                                 | -                               | -                                            | -                               | -35,78                                      | -                                          | -                                         | -                               |
| <b>CuA<sub>2</sub></b>                                              | -                               | -                                            | -                               | -                                           | 9,79                                       | 9,52                                      | 9,79                            |
| <b>pK<sub>1</sub>(amid)</b>                                         | 7,03                            | 6,8                                          | 6,44                            | 6,65                                        | -                                          | 6,84                                      | 6,43                            |
| <b>pK<sub>2</sub>(amid)</b>                                         | 7,42                            | 7,26                                         | 7,47                            | 7,38                                        | -                                          | 8,16                                      | 5,8                             |
| <b>pK<sub>3</sub>(amid)</b>                                         | 9,05                            | 8,79                                         | 9,09                            | 10,14                                       | 8,22                                       | 8,39                                      | 10,1                            |
| <b>pK (MAH/MA)</b>                                                  | 4,47                            | 4,78                                         | 4,83                            | 5,31                                        | -                                          | -                                         | -                               |
| <b>pK (M<sub>2</sub>AH<sub>4</sub>/M<sub>2</sub>AH<sub>5</sub>)</b> | 7,0                             | -                                            | 8,08                            | 9,68                                        | -                                          | -                                         | -                               |

**6. táblázat:** A két imidazol nitrogénen keresztül koordinálódó réz(II)-komplexek stabilitási állandóinak logaritmusa

|               | <b>lgβ(CuAH)-pK<sub>3</sub></b> |             | <b>lgβ(CuA)</b> |
|---------------|---------------------------------|-------------|-----------------|
| <b>HAAHGH</b> | 6,02                            | <b>HGH</b>  | 6,32            |
| <b>HGGHGH</b> | 6,02                            | <b>HGGH</b> | 5,97            |
| <b>HVHGH</b>  | 6,17                            | <b>HVH</b>  | 6,63            |
| <b>HHGH</b>   | 5,79                            | <b>HVVH</b> | 5,79            |

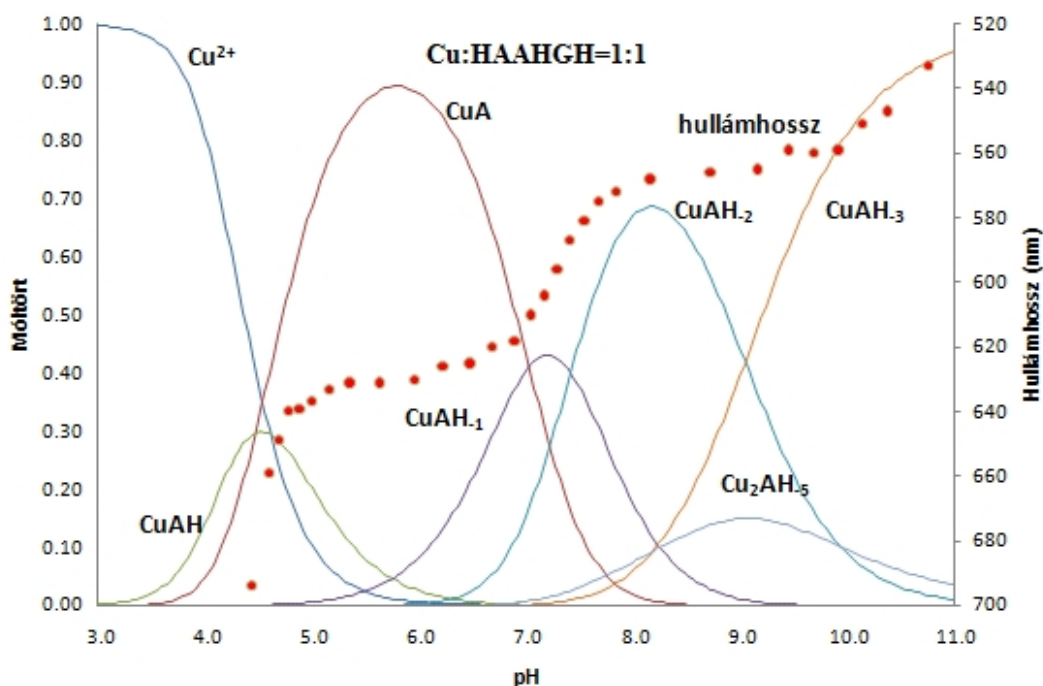
A CuA összetételű komplexben a fémion három imidazolcsoporthoz koordinálódik. A CuAH/CuA deprotonálódására jellemző állandó jóval kisebb, mint a szabad ligandumra jellemző deprotonálódási állandó, ami alátámasztja a harmadik imidazol nitrogén deprotonálódását. A CuA komplex képződése kedvező, stabilitása nagyobb, mint a két



**12. ábra:** a CuAH (a.) és CuA (b.) összetételű komplexek sematikus szerkezete

imidazolcsoporton keresztül koordinálódó HGGH-, HVVH- és HGH-komplexeké. Ez megfelel azon korábbi megfigyeléseknek, hogy a koordinálódó imidazolcsoportok számának növelése növeli a kialakuló komplex stabilitását. A kialakuló CuA komplex stabilitása a HXHYH szekvenciát tartalmazó peptidek MA összetételű komplexeinek stabilitásánál is nagyobb, melyek azonban a korábban vizsgált multihisztidin tartalmú peptidek közül a legstabilabbaknak bizonyultak.

Jelentős mennyiségű komplex van jelen fiziológiás pH-tartományban (pH~6), melyet az eloszlás görbén is megfigyelhetünk (13. ábra).



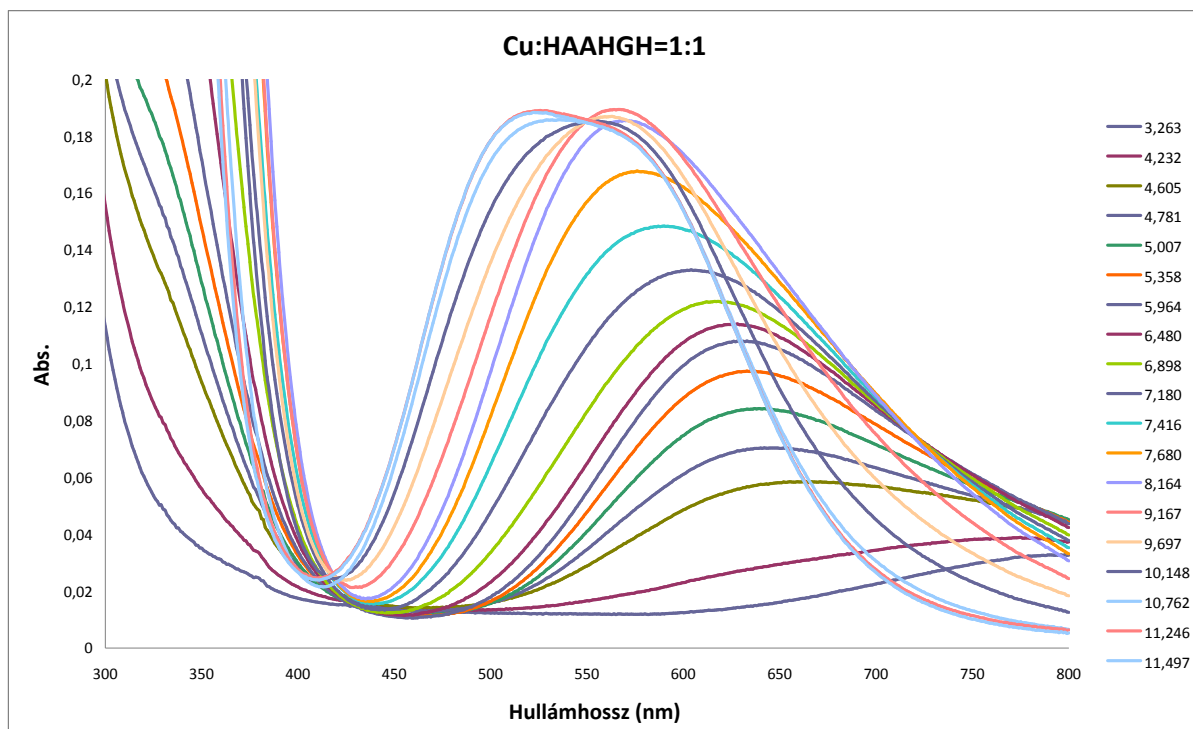
Ha a pH-értékét emeljük, megkezdődik az amidnitrogének deprotonálódása. Az eloszlás jól tükrözi, hogy a  $\text{CuAH}_2$  összetételű komplex mennyisége jelentős, míg a  $\text{CuAH}_1$  összetételű komplex kisebb koncentrációban van jelen. Az amidnitrogének deprotonálódása lépcsőzetesen megy végbe. A  $\text{CuAH}_2$  összetételű komplex az  $\text{Im}(\text{N})$ ,  $\text{N}^-$ ,  $\text{N}^-$ ,  $\text{Im}(\text{N})$  koordinációval valósulhat meg a legvalószínűbben. A  $\text{pH} \sim 9$  értéken felvett UV-látható fotometria spektrum  $\lambda_{\text{max}}$  értéke is ezt támasztja alá (7. táblázat).

**7. táblázat:** A Cu(II)-komplexek UV-látható spektrális paraméterei (a  $\lambda_{\text{max}}$  nm-ben, a moláris abszorbanancia ( $\epsilon$ )  $\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2$  egységben értendő)

|              | Cu:HAAHGH                |                          |           | Cu:HGGHGH |           |           |
|--------------|--------------------------|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|              | 1:3                      | 1:1                      | 2:1       | 1:3       | 1:1       | 2:1       |
| <b>pH=6</b>  | 619 (73)                 | 626 (71)                 | 632 (44)  | 627 (87)  | 637 (75)  | 650 (46)  |
| <b>pH=9</b>  | 559 (118)                | 565 (117)                | 572 (113) | 561 (147) | 566 (152) | 577 (122) |
| <b>pH=11</b> | 519 (103),<br>560 (váll) | 524 (116),<br>561 (váll) | 563 (132) | 556 (146) | 562 (164) | 574 (132) |

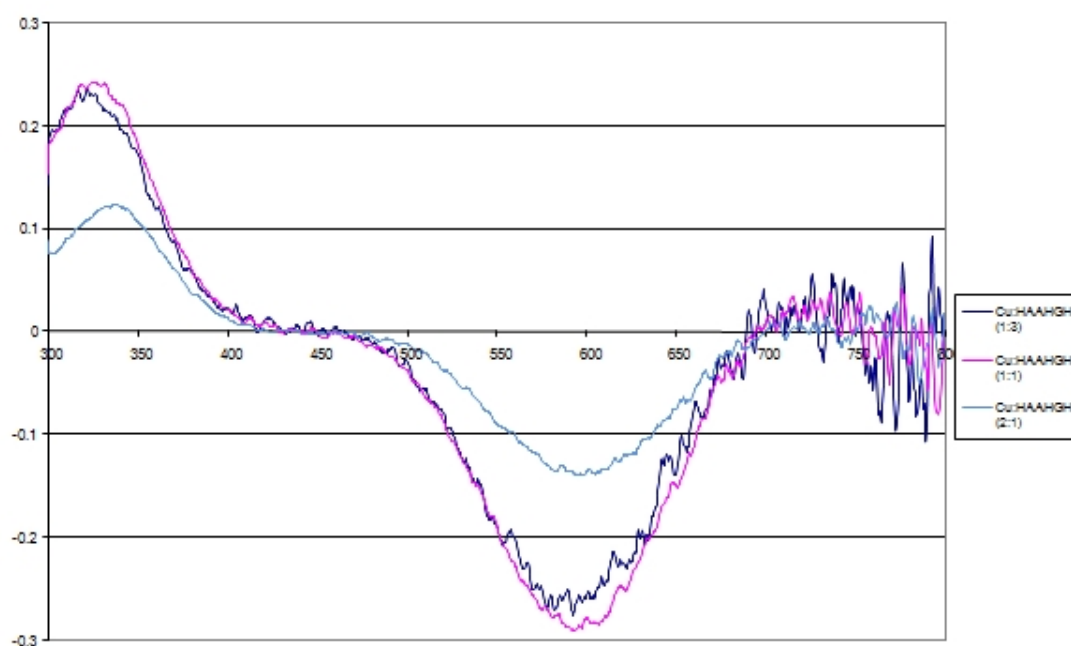
Ha a fentebb leírt koordinációs módot vesszük alapul, akkor a 2.5. pontban leírt empirikus függvényt alkalmazva számolhatunk egy  $\lambda_{\text{max}}$  értéket. Az így számított érték  $\sim 539$  nm. Ez hasonló a táblázatban leírt értékhez.

10-es pH érték fölött egy  $\sim 40$  nm-es eltolódás és széles sáv jelenik meg a spektrumban (14. ábra). Ez alátámasztja azt a feltételezést, hogy  $\text{pH} = 10$  felett többféle izomer szerkezetű  $\text{CuAH}_3$  összetétellel megadható komplex van jelen. Az élesebb csúcs 520 nm körül jelenik meg, ami megfelel az  $\text{N}^-$ ,  $\text{N}^-$ ,  $\text{N}^-$ ,  $\text{Im}(\text{N})$  koordinációnak.



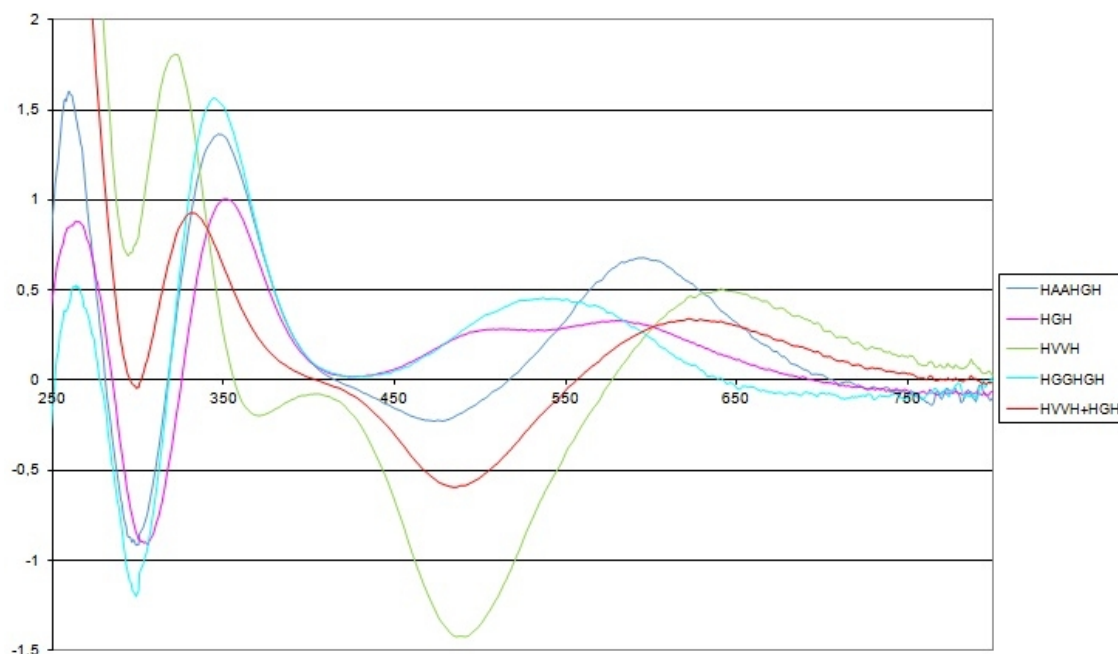
**14. ábra:** A Cu(II):HAAHGH 1:1 rendszer UV-látható fotometriás spektrumai

A CD-spektrumok azonban jóval több információt szolgáltatnak. 6-os pH-értéken egy kis intenzitású negatív Cotton-effektusú széles csúcs jelenik meg ~600 nm-en (15. ábra). A spektrum hasonló lefutású a korábban vizsgált HGGHGH peptid esetében is. Ez a  $\text{CuAH}_{-1}$  összetételű komplexekhez rendelhető, amire utal, hogy már megjelenik a  $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{N}^-$  töltésátviteli sávhoz tartozó spektrális csúcs.



**15. ábra:** A Cu:HAAHGH 1:3, 1:1 és 2:1 rendszerek pH~6 értéken felvett CD-spektrumai

A pH emelésével egy széles pozitív Cotton-effektusú csúcs jelenik meg szintén ~600 nm hullámhossz értéknél (16. ábra). Hasonló lefutású spektrum jellemzi a Cu(II)-Ac-HGH-NHMe rendszer CuAH<sub>2</sub> összetételű komplexét, ami arra utal, hogy a HGH szekvenciájú rész a fő fémionkötőhely.

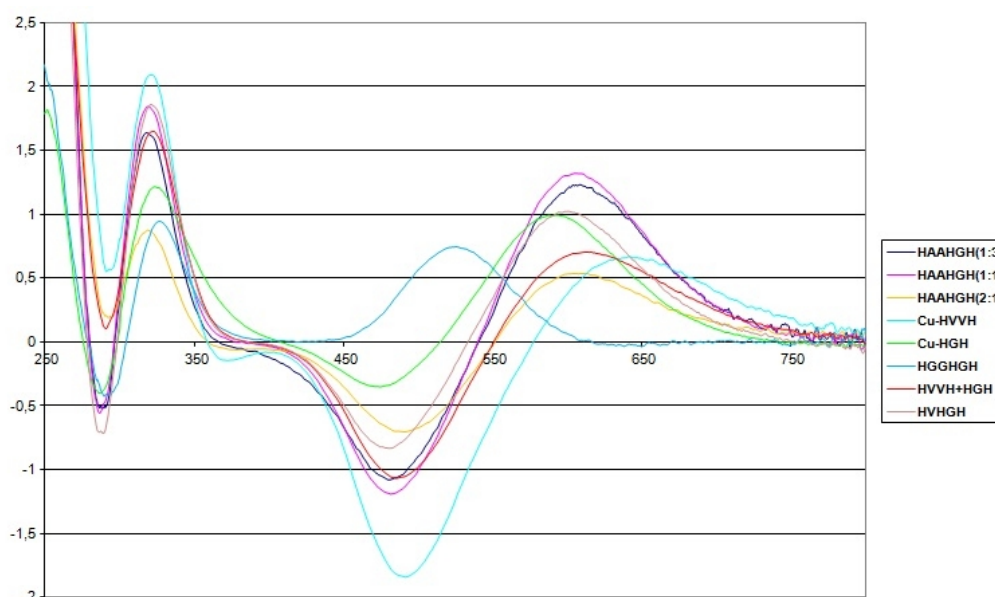


**16. ábra:** A Cu(II)-ionnal alkotott komplexek pH~9 értéken felvett CD-spektrumai

A pH további növelése jelentős változást eredményez a CD-spektrumban (17. ábra). Ez már a CuAH<sub>3</sub> összetételű komplexhez rendelhető spektrum. 603 nm hullámhossz értéknél egy pozitív, míg 480 nm hullámhossz értéknél negatív Cotton-effektus figyelhető meg. A lefutása hasonló, mint a mindkét végen védett HGH, a HVVH és a HVHGH szekvenciájú peptidek CuAH<sub>3</sub> összetételű komplexéhez rendelhető spektrumok. Ugyanakkor jelentős eltérés figyelhető meg a HGGHGH szekvenciájú peptid azonos összetételű komplexéhez rendelhető spektrumában, ahol nagy intenzitású pozitív Cotton-effektusú csúcs jelenik meg 520 nm hullámhossz értéknél.

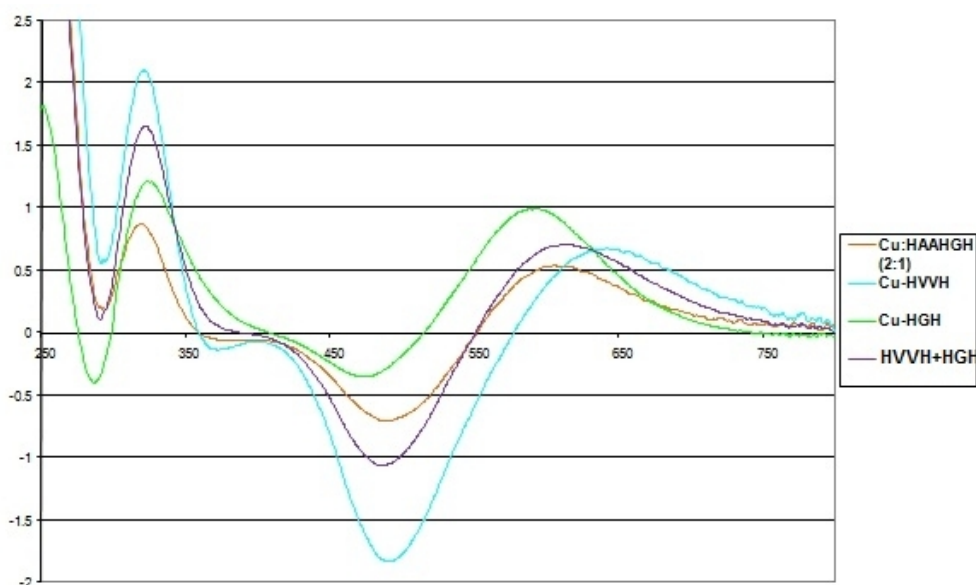
Ez a megfigyelés azt támasztja alá, hogy a CuAH<sub>3</sub> összetételű komplex esetén izomer szerkezetű komplexek képződnek. A HAAHGH szekvenciájú peptid esetén akár a C-terminális részen lévő, akár a közbenső hisztidin aminosav imidazol nitrogénjéhez koordinálódik a fémion hasonló spektrum várható, hasonlóan a HGH, illetve a HVVH szekvenciájú peptidek komplexei esetén. Ugyanakkor a Cu(II)-ion kötődése a HGGHGH szekvenciájú peptid esetén a közbenső hisztidin aminosav imidazol nitrogénjéhez ellentétes

Cotton-effektust eredményez, mivel az N-terminális részen lévő hisztidin aminosavat glicin követi.



**17. ábra:** A Cu(II)-ionnal képződő komplexek pH~11 értéken felvett CD-spektrumainak összehasonlítása

Ha az egyes arányok esetében kapott spektrumokat vizsgáljuk, jól látható, hogy az 1:3, 1:1 és 2:1 arányok pH=8 értékig nem térnek el jelentősen. 9-es pH-érték fölött azonban a 2:1 arányhoz tartozó spektrum eltérést mutat (18. ábra). Ez két fémion megkötérése utal. Ha a HVVH és HGH szekvenciájú peptidekhez tartozó spektrumokat összeadjuk, akkor a 2:1 arányhoz tartozó spektrumhoz hasonló lefutású spektrumot kapunk. Ez arra utal, hogy két Cu(II)-ion is koordinálódik a ligandumhoz, a HAAH, illetve a HGH szekvenciájú részen.



**18. ábra:** A Cu(II):HAAHGH 2:1 arányú rendszerének pH~11 értéken felvett CD-spektrumának összehasonlítása

## 4. Összefoglalás

Egyetemünk Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában három hisztidint tartalmazó terminálisan védett hexapeptideket (Ac-His-Ala-Ala-His-Gly-His-NH<sub>2</sub> és Ac-His-Gly-Gly-His-Gly-His-NH<sub>2</sub>) állítottunk elő, és vizsgáltuk őket Ni(II)- és Cu(II)-ionok jelenlétében. A kialakuló komplexeket pH-potenciometriás, UV-látható spektrofotometriás, és CD-spektroszkópiás módszerekkel vizsgáltuk.

A savas tartományban MAH, illetve MA összetételű komplexek keletkeznek. A fémion mindkét komplexben a hisztidin imidazolnitrogénjéhez koordinálódik, ami jelentősen megnöveli a komplexek stabilitását. Fiziológias pH-n az MA összetételű komplex jelentős mennyiségben van jelen.

A pH növelésével azonban megkezdődik az amidnitrogének deprotonálódása. A Cu(II)-komplexek estében lépcsőzetes deprotonálódás következik be, míg a Ni(II)-komplexek esetén az amidnitrogének egy lépésben deprotonálódnak. Az MAH<sub>3</sub> összetételű komplexek esetén mindkét fémion vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy izomer szerkezetek keletkeznek, de a HXXH szekvenciájú térrészen való koordináció lehet a kedvezményezettebb.

A fémionokkal végzett vizsgálatok során kétmagvú komplexek keletkezése is leírható. A két fémion a HXXH, illetve a HGH szekvenciájú részekben koordinálódhat úgy, hogy a hisztidinek imidazolnitrogénjein, illetve amidnitrogéneken keresztül kötődik a ligandumhoz.

A Ni(II)-HAAHGH rendszerek esetén NMR vizsgálatok, míg a Cu(II)-HAAHGH rendszerek esetén ESR vizsgálatok elvégzése során még több információ nyerhető a kialakuló komplexek szerkezetéről, a fémion koordinációjáról.

## 5. Summary

In our University's Bioinorganic Chemical Research group we have synthesized three histidine containing protected hexapeptides (Ac-His-Ala-Ala-His-Gly-His-NH<sub>2</sub> and Ac-His-Gly-Gly-His-Gly-His-NH<sub>2</sub>) and analyzed them in the presence of Ni(II)- and Cu(II)-ions. pH-potenciometric, UV-visible and circular dichroism (CD) spectroscopic measurements were used to study the formed complexes.

In the acidic pH range MAH and MA complexes were formed. In these cases the metal ion coordinates only to the imidazole rings, which significantly increases the stability of the complexes. At physiological pH value the MA complex is present in significant quantity.

However, by increasing pH the deprotonation of amide nitrogens starts. In the case of copper(II) complexes the amide nitrogen deprotonation occurs stepwise, while in the case of nickel(II) complexes the deprotonation takes place in a cooperative process. For the MAH<sub>3</sub> complex the formation of isomeric complex structures is possible but the preferred binding site is the HXXH sequence of both peptides.

In the metal ion – ligand systems dinuclear complexes were also formed. The two metal ions can bind to the HXXH and HGH sequences of the peptides. The coordination of the metal ions occurs through the histidine imidazole nitrogens and the amide nitrogens.

In the Ni(II)-HAAHGH system NMR measurements, while in the Cu(II)-HAAHGH system EPR spectra can provide more information about the structures of the formed complexes and the coordination modes of the metal ions.

## 6. Irodalmi hivatkozások

1. Kiss Tamás, Gajda Tamás, Gyurcsik Béla: *Bevezetés a bioszervetlen kémiába*, Nemzeti Tankönyvkiadó Zrt., Budapest (2007)
2. U. Ermler, *Dalton Trans.*, 3451-3458. (2005)
3. R. K. Gouch, T. W. Kensler, L. W. Oberlew and J. R. J. Sorenson, *Biochemical and Inorganic Copper Chemistry*, **1**, Adenine, New York, p. 139 (1986).
4. M. C. Linder, *Biochemistry of Copper*, Plenum Press, New York, (1991).
5. W. Kaim, B. Schwederski, *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, John Wiley & Sons, INC, England, 2004
6. R. H. Holm, P. Kennepohl, E. I. Solomon, *Chem. Rev.*, **96**, 2239, (1996)
7. D. P. Barondeau, C. J. Kassmann, C. K. Bruns, J. A. Tainer, E. D. Getzofl, *Biochemistry*, 2004, **43**, 8038
8. M. E. Krauser, A. M. Glass, T. A. Jackson, J. S. Laurence, *Inorg. Chem.*, 2010, **49(2)**, 362-364
9. S. Rajkovic, C. Kállay, R. Serényi, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, *Dalton Trans.*, 5059-5071. (2008)
10. S. Tímári, Cs. Kállay, K. Ősz, I. Sóvágó, K. Várnagy, *Dalton Trans.*, 1962-1971. (2009)
11. C. Kállay, Z. Nagy, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, I. Sóvágó, *Bioinorg. Chem. and Appl.*, 1-9 (2007)
12. B. Bóka, A. Myari, I. Sóvágó, N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 113-122. (2004)
13. D. Sanna, G. Micera, Cs. Kállay, V. Rigó, I. Sóvágó, *Dalton Trans.*, 2702-2707. (2004)
14. D. Valensin, F. M. Mancini, M. Luczkowski, A. Janicka, K. Wisniewska, E. Gaggelli, G. Valensin, L. Lankiewicz, H. Kozlowski, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 16 (2004)
15. M. Luczkowski, K. Wisniewska, L. Lankiewicz, H. Kozlowski, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2266 (2002)
16. C. Kállay, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, *Inorg. Chim. Acta.*, **362**, 935-945. (2009)
17. Gran, G., *Acta Chem. Scand.*, **4**, 559 (1950)

18. Asztalos József Attila *Szakdolgozat* (2012)
19. R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2154. (1963)
20. Zékány, L.; Nagypál, I., (Ed. Leggett, D.J., Plenum Press, New York) *Computation Methods for the Determination of Formation Constants*, 291 (1985)
21. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **6**, 1195-1200. (1985)
22. H. Sigel and R. B. Martin, *Chem. Rev.*, **82**, 385 (1982).
23. E. W. Wilson Jr. and R. B. Martin, *Inorg. Chem.*, **9**, 528 (1970)
24. J. M. Tsangaris and R. B. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4255 (1970)
25. J. W. Chang and R. B. Martin, *J. Phys. Chem.*, **73** (1969)
26. Tímári Sarolta *Doktori (PhD) értekezés* (2012)
27. M. Klewpatinond, J. H. Viles, *FEBS Letters*, **581**, 1430-1434. (2007)
28. C. Kállay, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, *Dalton Trans.*, 4545-4552. (2006)

## Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni *Dr. Fábíán István* tanszékvezetőnek, hogy lehetővé tette számomra dolgozatom elkészítését az általa vezetett Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, *Dr. Várnagy Katalin* egyetemi docensnek munkám során nyújtott sok-sok segítségét, türelmét, hogy bármilyen kérdéssel nyugodtan fordulhattam hozzá, valamint azt a tudást, melyet közös munkánk során kaptam tőle.

Köszönöm *Tímári Sarolta* predoktori ösztöndíjas, *Grenács Ágnes* és *Turi Ildikó* PhD hallgatóknak, hogy a műszerek kezelését elsajátíthattam, kérdéseimre készségesen válaszoltak.

Köszönöm *Dr. Kállay Csilla* tudományos főmunkatársnak, hogy megismertetett a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport munkájával.

Továbbá köszönöm minden, a *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportba* tartozó *oktatónak* és *hallgatónak*, hogy ilyen kellemes légkörben végezhettem munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm *családomnak* és *szeretteimnek*, hogy mindig mellettem álltak.

Dolgozatom a TÁMOP-4.2.2/B-10/-1-2010-0024 számú pályázat anyagi támogatásával valósult meg.