



TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Toxikus fémionok analitikai célú kimutatására tervezett cisztein tartalmú oligopeptid kölcsönhatása higany(II)ionokkal

KÉSZÍTETTE:

Bálint Sára

Vegyész MSc szak

TÉMAVEZETŐ:

Dr. Jancsó Attila

egyetemi adjunktus

Szegedi Tudományegyetem, TTIK, Szervetlen és Analitikai Kémiai

Tanszék, 2014

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
I. Bevezetés	2
II. A munka háttere, irodalmi áttekintés.....	3
II.1. A higany és vegyületeinek mérgező hatása	3
II.2. A Cys-Xaa-Xaa-Cys fémion-kötő szekvencia és szerepe metalloproteinekben ...	5
II.3. Oligopeptidek kölcsönhatása higany(II)ionokkal.....	8
II.4. Toxikus fémionok érzékelésére alkalmas oligopeptid-, fehérje- vagy sejt-alapú szenzorok.....	10
III. Célkitűzések	12
IV. Kísérleti rész	13
IV.1. Felhasznált anyagok.....	13
IV.2. Szilárd fázisú peptidszintézis	13
IV.3. pH-potenciometria	15
IV.4. UV-Vis spektroszkópia	16
IV.5. Mágneses magrezonancia-spektroszkópia (NMR-spektroszkópia)	17
IV.6. Fluorimetria.....	18
IV.7. Induktív csatolású plazma tömegspektrometria (ICP-MS).....	20
V. Eredmények és tárgyalásuk	23
V.1. Egyensúlyi mérések a higany(II) – Ac-DCSSCY-NH ₂ (DY) rendszerben.....	23
V.2. A higany(II) – DY kölcsönhatás tanulmányozása UV-spektroszkópiával.....	26
V.3. A higany(II) – DY kölcsönhatás tanulmányozása ¹ H NMR-spektroszkópiával	31
V.4. Fluorimetriás mérések a higany(II) – DY rendszerben	37
V.5. DY-NTG rendszer higany(II)-kötő sajátosságának jellemzése	41
V. Összefoglalás.....	46
VI. Irodalomjegyzék.....	47
VII. Függelék	51
Köszönetnyilvánítás	54

I. Bevezetés

Az utóbbi években egyre inkább a környezeti kémiai kutatások fókuszába került a nehézfém-ionok érzékelésére és eltávolítására alkalmas módszerek fejlesztése. Mind az eltávolításra, mind a kimutatásra elterjedten használt, hatékony módszereknek előnyeik mellett hátrányaik is vannak. A szennyezett területek kezelésére alkalmazott fizikai-kémiai technológiák rendszerint nagy mennyiségű, nehézfém-tartalmú mérgező iszap vagy egyéb hulladék keletkezését eredményezik. Ezek kezelése további vegyszereket és energiát igényel, és költségei is nagyon magasak. A fémionok kimutatására használt robusztus, modern analitikai technikák hátrányait pedig a laboratóriumhoz kötött drága műszerek, és a kezelésükhöz szükséges jól képzett munkaerő jelentik. A hatékony nagyműszeres módszerek melletti alternatívaként felmerülhet olyan kémiai szenzorok alkalmazása is, melyek a fémiont hatékonyan és szelektíven megkötni képes biomolekulákat tartalmaznak receptorként. A szoft karakterű fémionok megkötését célzó molekulák tervezéséhez mintául szolgálhatnak olyan metalloproteinek, illetve metalloenzimek, melyekben a fémionok kötőhelyeit ciszteinek tiolcsoportjai alakítják ki. Egy peptid vagy peptid származék próbamolekula esetében, a fémionok hatékony megkötését biztosító ciszteinek mellett olyan csoport(ok) beépítése is szükséges, melyek a fémion megkötésének hatására valamilyen, optimálisan koncentráció-arányos, analitikai válaszjelet produkálnak. Egy ilyen egyszerű, rövidláncú próba peptid higany(II)ionokkal való kölcsönhatását tárgyalja a diákköri dolgozat.

környezetbe.^[1,2] Szennyező higanyforrás a fosszilis tüzelőanyagok égetése, a cementgyártás, a fém-szulfid ércek olvasztása, az arany kivonása és egyes ipari fémek előállítás is.^[3] A higanyvegyületek többségének használata jelenleg az Európai Unióban vagy korlátozott, vagy be van tiltva. Régebben szerves higany származékokat alkalmaztak pl. a mezőgazdaságban növényvédőszerként, illetve számos szervetlen higany vegyületet fertőtlenítő, gombaölő, baktériumölő, vizelethajtó szerként.^[2] Ezeket a vegyületeket a fejlődő országokban még ma is használják szappanokban, krémekben. További higany-szennyezés források lehetnek a fogászatban használatos amalgámtömés, elektronikai eszközökből kiszabaduló fémhigany, a hagyományos izzók és festékek is. Etil-higanyt tartalmaznak a thiomersal tartalmú védőoltások, ám ennek a vegyületnek rövid az élettartama a szervezetben.

A belélegzett higanygőznek akár 80%-a is fel tud szívódni, képes átjutni a vér-agy gáton és a placentán, így megtámadja az idegrendszert.^[4] A bélben a higany nagy része higany-szulfiddá alakul, ami ártalmatlan és kiürül az szervezetből. A szájon át a szervezetbe kerülő higany(II)ionokat tartalmazó vegyületek dózisének 7-15%-a, a bőrön át bejutott dózis 2-3%-a képes abszorbeálódni.^[4]

A higany(II)ionok nem képesek átjutni a vér-agy gáton és a placentán, de pl. az anyatej közvetítésével bekerülhetnek a csecsemő szervezetébe. Az ionos formák kötődhetnek tiolcsoportot tartalmazó molekulákhoz, enzimekhez, szerkezeti fehérjékhez, s így befolyásolják azok funkcióit.

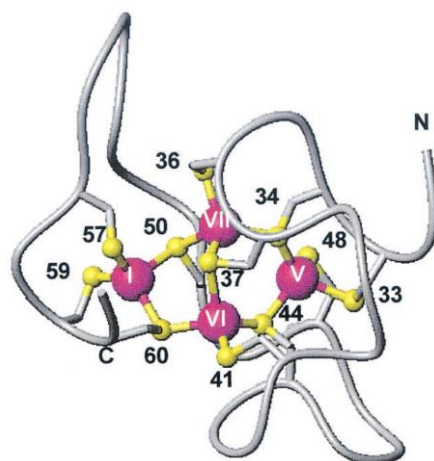
A legmérgezőbb szerves higany származékok pl. halfogyasztással juthatnak a környezetből szervezetünkbe. A metil-higany, a bélből ~95%-ban felszívódik.^[4] Lipofil és hidrophil kettős sajátsága miatt könnyen átjut a vér-agy gáton, így megtámadhatja az idegrendszert. Lassú folyamatban képes leadni a metilcsoportot és szervetlen fémionná alakulni. Kén tartalmú vegyületekhez, tiolcsoporthoz nagy az affinitása, így gyakran komplexet képez. Ilyen módon kötődhet akár enzimek, létfontosságú fehérjék aktív centrumában is pl. a cisztein aminosavak oldalláncához. Kinetikai labilitása miatt gyorsan eloszlik a szervezetben. Az etil-higany tulajdonságai és mérgező hatásai is nagyon hasonlóak a rokon metilszármazékéhoz, azonban nagyobb mennyiségben és gyorsabban képes átalakulni szervetlen higannyá.

Akut higanymérgezésnél a következő tünetek jelentkezhetnek: rossz közérzet, nehézlégzés, hányás, hasmenés, de akár agyi vizenyő és halál is bekövetkezhet. Bőrön át történő felszívódás okozta higanymérgezés tünetei az ingerlékenység, fáradtság, étvágytalanság és ezek mellett ekcémás bőrtünetekkel is találkozhatunk. A higany elsősorban a gyermekeket és a magzatot támadja, fejlődési rendellenességet, súlyos idegrendszeri károkat

is okozhat. A krónikus mérgezés ingerlékenységgel, remegéssel jár, a fogak feketednek, a vérkeringés legyengül, a szellemi koncentráció és a mozgáskoordinációs képességek csökkennek, a központi idegrendszer is károsodhat, a hallás és a látás legyengül.^[5]

II.2. A Cys-Xaa-Xaa-Cys fémion-kötő szekvencia és szerepe metalloproteinekben

Az élő szervezetek nehézfémionok elleni védekezésben szinte minden rendszertani szinten (emberek, állatok, magasabb rendű növények, prokarióták) potenciálisan szerepet játszó metallotioneinek, olyan kis molekulatömegű (6-7 kDa) fehérjék, melyek kiemelkedően magas kén- és fémion-tartalommal (~10 m/m%) rendelkeznek.^[6] Ismétlődő Cys-X-Cys vagy Cys-X-X-Cys szekvenciák jellemzik őket, melyekben X ciszteintől eltérő aminosavakat jelöl. A fehérje egymáshoz közeli cisztein tiolátcsoportjainak koordinálódása a fémionokhoz jellegzetes polimetallikus-tiolát klasztereket eredményez (2. ábra). A fenti szekvenciákat tartalmazó oligopeptid szakaszok X egységei ritkán vesznek részt a fémionok megkötésében. A ciszteinek száma és elhelyezkedése a molekulában, valamint a fémionokkal alkotott kémiai kötések adják a metallotioneinek szokatlan szerkezeti tulajdonságait és reaktivitását.

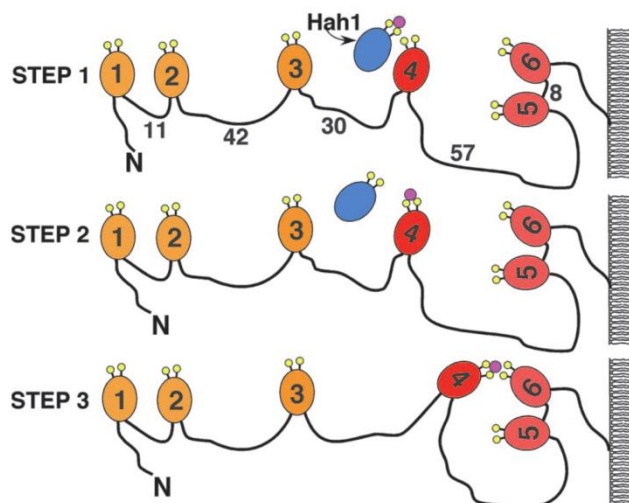


2. ábra: MT-2 metallotionein fémkötő klasztere emlősökben [7]

A metallotioneinek szekvenciabeli hasonlóságuk és filogenetikus kapcsolataik alapján több csoportba oszthatók (MT-1, MT-2, MT-3, MT-4),^[6] melyek mindegyike megtalálható az emlősökben.^[6] A metallotioneinekkel végzett több évtizedes, kiterjedt kutatások ellenére pontos fiziológiai funkcióik máig nem teljesen tisztázottak. Eddigi ismereteink alapján fontos elemei a fémion-háztartásnak, részt vesznek bizonyos fémionok tárolásában, szállításában, ill. toxikus d10 fémionok eltávolításában (pl. a higany detoxifikálás emlősökben^[8]). Képesek erélyes oxidáló hatású gyökök semlegesítésére, valamint feltételezhető, hogy a sejtek redoxi állapotának szabályozásában és az energia metabolismusban is szerepet játszanak.^[9]

Az élő szervezetekben a metallotioneinekhez elsősorban Zn(II)-, Cd(II)- és Cu(I)ionok kapcsolódnak, de laboratóriumi körülmények között további fémionok megkötődését is kimutatták. A tiolát kötőhelyekhez való fémion-affinitás $\text{Hg(II)} > \text{Ag(I)} \cong \text{Cu(I)} > \text{Cd(II)} > \text{Zn(II)}$ sorrendben csökken, ami megegyezik a szerves tiolátokra vonatkozó sorrenddel.^[10]

A CXXC szekvencia a metallotioneninek mellett számos fémion szállító-, raktározó-, ill. dajkafehérjében megtalálható. Ezek közé tartoznak pl. a higany(II)-kötő MerP fehérje,^[11] mely a bakteriális higany detoxifikáló rendszer része,^[12] a P1-típusú ATPáz ZntA és CadA fehérjék,^[13] a bakteriális vagy humán ATP7A és ATP7B fehérjék,^[14] ill. további réz-chaperon fehérjék, mint a bakteriális CopZ és Atx1, vagy az Atx1-gyel analóg humán Atox1 (HAH1).^[15] A rendszerint hurkokban található CXXC szakasz meglehetősen flexibilis, s így szerkezetét a fém-centrum koordinációs geometriája, és az X-aminosavak minősége is befolyásolhatja.^[16]

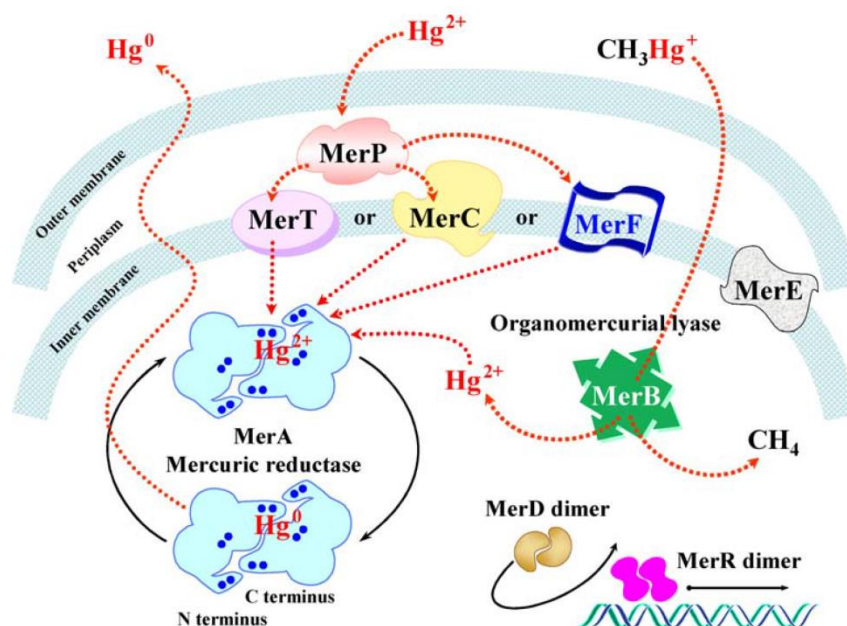


3. ábra: A réz(I) HAH1 chaperonról az ATP7B fehérjére való átjutásának egyik lehetséges módja^[17]

A P1-típusú nemhézsfémion transzporter ATPáz fehérjék nagy méretű N-terminális fémion-kötő doménnel rendelkeznek, amely ismétlődő GMXCXXCXXXIE motívumokat tartalmaz.^[14] Ezek cisztein egységei felelősek a nehézfémionok megkötéséért. Az ismétlődő szakaszok száma fehérjétől függően eltérő lehet. A P1-ATPázok két legfontosabb képviselője az ATP7A és az ATP7B, melyek mutációi felelősek a Menkes-kór (ATP7A) és a Wilson-kór kialakulásáért (ATP7B). Az ATP7B hat N-terminális rézkötő szakaszt tartalmaz, melyek közül a 4. fragmens réz(I)ionokat vesz át a sejtplazma réz-chaperon fehérjétől, az ugyancsak CXXC kötő-helyet tartalmazó HAH1-től (3. ábra).^[17]

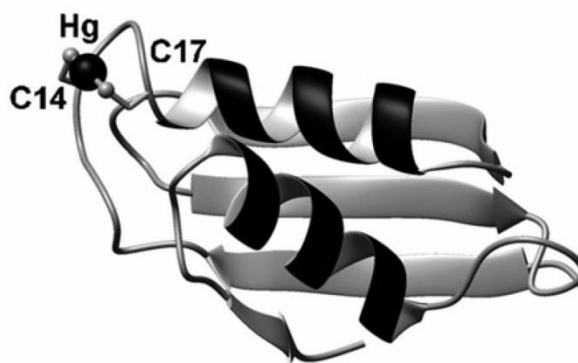
A baktériumokban működő higany detoxifikáló rendszer elemeit kódoló gének a *mer* operon-on találhatók.^[18] Az operon kifejeződését a DNS operátor régiójához kapcsolódó

MerR regulátor fehérje szabályozza, s az említett gének transzkripciója a detoxifikálás folyamatában szerepet játszó fehérjék (MerT, MerP, MerA, MerB, MerD, MerC, MerF) termelődéséhez vezet.^[12,18] Minden *mer* fehérje cisztein aminosavakat alkalmaz (valószínűleg kizárólagosan) a szerves vagy szervetlen higany megkötésére.^[12] Higany(II) távollétében a MerR represszorként működik és a *mer*-operon operátor régiójához kötődve meggátolja a detoxifikáló rendszer génjeinek átírását. Megnövekedett higany(II) koncentráció esetén azonban a MerR fehérjéhez is higany(II)-kötődik, ami a regulátor, illetve a kapcsolódó DNS konformációjának megváltozásához vezet. Ennek révén a MerR aktiválja az operonon található gének transzkripcióját.^[12,18]



4. ábra: A mer operonról keletkező fehérjék és funkcióik^[19]

A Gram-negatív baktériumokban működő higany detoxifikáló rendszert és a *mer* operonhoz köthető fehérjék szerepét az 4. ábra mutatja be sematikusán.^[19] A periplazmába jutó higany(II)-t a 72 aminosavból álló MerP köti meg, amit tovább ad a belső membránban elhelyezkedő transzport fehérjéknek. A fémion koordinációjáért egy GMT**CXXC** szekvencia felelős, melyben ¹⁹⁹Hg NMR mérések tanúsága szerint a Hg(II) lineáris koordinációs geometriát kialakítva kapcsolódik a két cisztein tiolátcsoportjaihoz (5. ábra).^[11]



5. ábra: A *Shigella flexneri* MerP fémkötő-helyének szerkezete (pdb: 1afj)^[11]

A higany(II) belső membránon keresztüli transzportját egy vagy több transzmembrán fehérje, a MerT, MerC és MerF (és esetleg a MerE) végzi.^[19] Ezek közül a legnagyobb méretű MerC 161 aminosavból épül fel és négy a membránba beágyazódott transzmembrán hélixet tartalmaz.^[18] A fehérje négy ciszteint tartalmaz, melyek közül az első pár (Cys22 és Cys25) közvetlenül a membrán sejtplazmával érintkező részén, de még a membránon belül található. A másik két cisztein a 127-es és 132-es pozíciókban a fehérje sejtplazmába nyúló szakaszán helyezkedik el. Célzott mutagenezis vizsgálatokkal kimutatták, hogy utóbbi két aminosav jelentősége a higany(II) transzportja szempontjából elhanyagolható, ugyanakkor a membránba ágyazott CXXC szakasz „szállítja” a fémionokat a periplazmából a sejtplazmába.^[18]

A sejt belsejében a higany(II) elemi higannyá redukálódik a MerA (higany-reduktáz) segítségével.^[20] A MerA protein felépítését tekintve a multidomén katalitikus fő egységből és egy N-terminális doménből (NmerA) áll.^[20] Utóbbiban egy vagy két CXXC motívumot tartalmazó szakasz (GMTCXXC) ismétlődik, ami a szoft fémion számára kötőhelyet biztosít a fehérjében. Az NmerA feladata elsősorban az, hogy a higany(II)ionokat összegyűjtse (más tiol tartalmú fehérjéktől vagy kismolekulatömegű tiol vegyületektől), majd azt a katalitikus egységnek továbbítsa, ahol a $\text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{Hg}^0$ redukció történik.^[20] A keletkező elemi higany már képes kидiffundálni a sejtől.

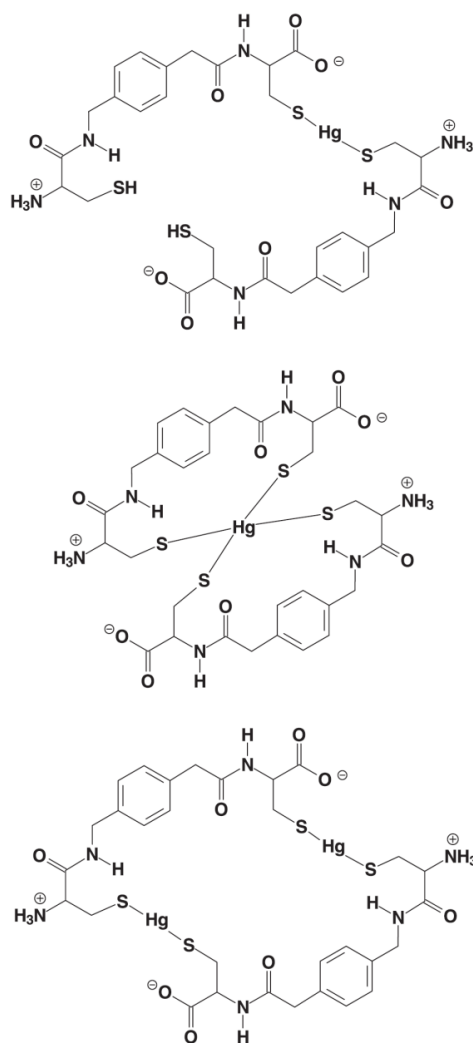
II.3. Oligopeptidek kölcsönhatása higany(II)ionokkal

Rövid láncú cisztein-tartalmú oligopeptidek higany(II)-komplexeinek egyensúlyi és oldatszerkezeti vizsgálatával kapcsolatos eredményekről igen kevés irodalmi adat áll rendelkezésre, melynek valószínűsíthető oka egyrészt a ligandumok oxidációra való hajlama lehet, valamint az a tény, hogy a higany(II)ionok rendkívül erős kötődése nehezíti a kölcsönhatások vizsgálatát. Ezt alátámasztják a cisztein-higany(II)kölcsönhatásra

meghatározott kiemelkedő stabilitási adatok,^[21] illetve ezt tükrözi az is, hogy a higany(II) 2,3-dimerkaptopropanollal alkotott komplexe a legstabilisabb egymagvú BAL-komplex.^[22] Hadjiliadis és kutatócsoportja különböző, *N*- és *C*-terminálisan védett cisztein-tartalmú tetrapeptidek higany(II)komplexeit állította elő.^[23] Többféle oldatszerkezeti vizsgálattal különböző szerkezetű komplexeket határoztak meg, melyekben a cisztein-tiolát donorcsoportokon kívül néhány esetben hisztidinek oldallánci imidazoljának koordinációját is kimutatták. A tiolát-csoportok terminális ligandumként és két fémcentrumot összekötő hídként is képesek voltak higany(II)ionok megkötésére.

Nakamura munkatársaival egy Cys-X-Y-His szekvenciát tartalmazó oligopeptidet tanulmányozott.^[24] A peptidek egy kétmagvú szerkezetben a két higany(II) centrumhoz vagy makrokelát kialakításával tudtak koordinálódni, vagy a tiolát, mint hídligandum kapcsolta össze a két higany(II)iont, míg a hisztidin imidazol oldallánca vagy koordinálódott az egyik centrumhoz, vagy nem. Ngu-Schwemlein és munkatársai tanulmányozták a higany(II) kötődését cisztein, hisztidin és triptofán aminosavakhoz, illetve az ezekből alkotott di- és tripeptidekhez.^[25] A cisztein tiolát-donor csoportjával tapasztalták a legerősebb kölcsönhatást.

Egy későbbi tanulmányban két cisztein egységet tartalmazó tripeptidek higany(II)-ionokkal való kölcsönhatását vizsgálták (6. ábra).^[26] A $\text{Hg}(\text{peptid})_2$ komplexek (2 vagy 4 koordinálódó csoportot tartalmazó komplexek) képződési állandója jelentősen nagyobbak adódott, mint a $\text{Hg}(\text{peptid})$ összetételű komplexeké (2 koordinálódó csoport). A Cys-Trp-Cys szekvenciájú tripeptidre meghatározott stabilitási állandó nagyobb volt, mint amit a Cys-Gly-Cys tripeptid esetében mértek, ami azt tükrözi, hogy a ciszteinek közötti aminosav is befolyásolja a komplexek szerkezetét, illetve stabilitását.

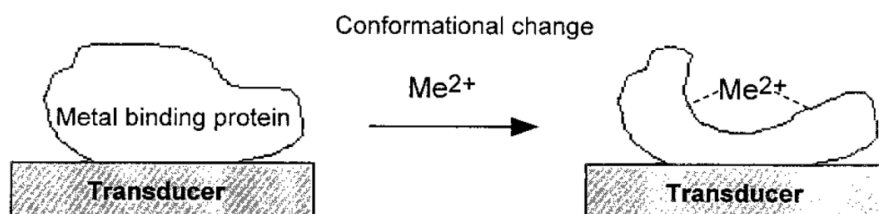


6. ábra: D-ciszteinil-tripeptidok higany(II)-komplexei ^[26]

II.4. Toxikus fémionok érzékelésére alkalmas oligopeptid-, fehérje- vagy sejt-alapú szenzorok

A toxikus fémion szennyeződések eltávolítása mellett azok kimutatása is fontos feladat. Számos olyan analitikai technika (pl.: ICPV, ICPMS) létezik, amivel a nehézfémionok kimutathatók, azonban ezek bonyolult és drága eljárások.^[27] Ezekkel szemben olyan fehérje- vagy sejt-alapú bioszenzorok használata, amely képesek szelektíven megkötni a nehézfémionokat, egyre nagyobb teret nyerhet a jövőben. A szenzorok alkalmazásának számos előnye lehet: szelektívek, a fentebbi technikáknál olcsóbbak, hordozhatóak lehetnek és azonnali jelet szolgáltathatnak. A makromolekula, illetve sejt-alapú bioszenzorok mellett a nehézfémionokat hatékonyan és szelektíven megkötni képes oligopeptidok is potenciálisan alkalmasak lehetnek toxikus fémionok detektálásában.^[28]

Cherian és munkatársai egy fehérje-alapú fémion-szenzort vizsgáltak. A nehézfémionok kimutatására egy AgNt84-6 fehérjét terveztek, ami egy szilícium-nitrid konzol arany bevonatú részén keresztül képes kapcsolódni a fémionokhoz.^[29] A vizsgálatok során azonban azt tapasztalták, hogy a szenzor csak HgCl_2 és ZnCl_2 0,1 mM-os oldatában ad érzékelhető jelet, de pl. MnCl_2 esetén vagy nincs, vagy nagyon gyenge a reakció a fémion és a fehérje között. Két fehérje-alapú szenzort tanulmányoztak Bontidean és munkatársai, amelyekben a fehérjék különböző kötőhellyel rendelkeztek a nehézfémionok számára.^[30] A szenzorok akkor jelzeték a fémionok jelenlétét, ha a kötésben konformációs változás következett be (4. ábra). A két szenzor szelektivitása és érzékenysége különböző volt réz(II), higany(II), cadmium(II) és cink(II)ionok jelenlétében. A GST-SmtA fehérje képes volt mind a négy említett ion érzékelésére, amíg a MerR fehérje kiemelt szelektivitást mutatott higany(II)ionokra.



7. ábra: Protein-alapú bioszenzor koncepciója a nehézfémionok megkötődésének hatására bekövetkező konformáció-változás mérésére^[30]

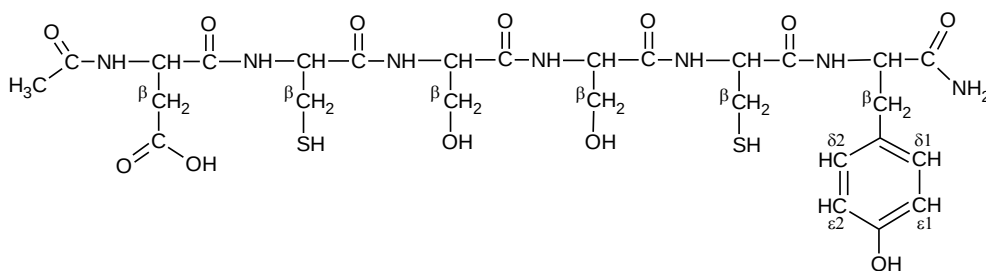
Potenciometriás elven működő szenzort tanulmányoztak González-Bellavista és munkatársai, aminek előnye, hogy szárazon tárolható és hosszú élettartamú.^[31] A szenzorban a fém-ionofor metallotioneinek poliszulfon-mátrixba ágyazódnak be, aminek segítségével pH 2 – 6 között 10^{-5} M koncentrációig az Ag^+ -ionok szelektíven kimutathatók.

White és munkatársai egy fluoreszcens MerP alapú kemoszenzort fejlesztettek ki.^[32] A MerP-hurokból származó aminosavak egyikéhez kapcsolódik a Hg^{2+} , míg a Trp (donor), illetve a danzilcsoport (akceptor) a fémion-érzékelésben szerepet játszó fluoroforok a peptidben. A szenzor a választ a FRET-képesség (fluoreszcencia rezonancia energia transzfer) megváltozása révén adja. A higany(II)ionok kötődése kvencseli a molekula fluoreszcenciáját. A szenzor képes a cink(II)-, cadmium(II)- és ezüst(I)ionok kimutatására is, viszont alkáli- illetve alkáliföldfémionok hatására nem ad választ.

III. Célkitűzések

Diákköri munkám csoportunk egy olyan kutatási témájába illeszkedik, amelynek célja toxikus fémionok megkötésre alkalmas rövid láncú peptidek, tervezése és előállítása. Ezek a kismolekulák, megfelelő „érzékelő egységgel” ellátva immobilizált formában alkalmasak lehetnek nehézfémionok kimutatására. A megtervezett peptidek és a kiválasztott fémionok vizes oldatbeli kölcsönhatásának vizsgálatával képet kaphatunk a fémion megkötésének hatékonyságáról, a kialakuló komplexek szerkezetéről, és a kölcsönhatást kísérő analitikai válaszról. Az ilyen módon megismert, optimális esetben előnyös tulajdonságok remélhetőleg jellemzőek maradnak a hordozón rögzített ligandumra is, ami alkalmassá teheti az adott rendszert fémion-érzékelésre.

A dolgozatban tárgyalt vegyület egy CXXC motívumot tartalmazó hexapeptid, melynek szekvenciája: Ac-Asp-Cys-Ser-Ser-Cys-Tyr-NH₂ (Ac-DCSSCY-NH₂, DY) (8.ábra). A peptid tervezésekor a CXXC szekvencia erős szoft fémion-kötő sajátságaiból indultunk ki. A vegyület C-terminális végén, azaz közvetlenül a hordozóhoz történő rögzítési hely mellett található fluorofór tirozin a fémion megkötődésére adott potenciális „választ” hivatott biztosítani, de a kölcsönhatás karakterizálását is segítheti. A fenil-alanin, tirozin és triptofán, mint fluorofór aminosavak közül (a fluorofór jelleg ebben a sorrendben nő) a legkevésbé hidrofób karaktere miatt esett a tirozinra választásunk. A triptofán, bár jobb fluorofór, de jóval erősebb hidrofób karakterrel is rendelkezik, ugyanakkor a peptid vizsgálhatósága miatt fontos szempont volt a jó vízoldhatóság, melyet az *N*-terminális helyzetű poláris aszparaginsav, illetve a ciszteinek közötti két szerin egység is elősegít.



8. ábra: A vizsgált Ac-Asp-Cy-Ser-Ser-Cys-Tyr-NH₂ peptid sematikus szerkezete

Munkám célja tehát az volt, hogy karakterizáljuk az Ac-DCSSCY-NH₂ próbapeptid kölcsönhatását higany(II)ionokkal vizes oldatban, megvizsgáljuk a fémion megkötésének hatását a ligandum fluoreszcenciájára, valamint tanulmányozzuk a ligandum higany(II)-kötő képességét szilárd hordozón immobilizált formájában is.

IV. Kísérleti rész

IV.1. Felhasznált anyagok

A kutatócsoportunk által tervezett peptidet a CASLO-tól (Dánia) szereztük be, és további tisztítás nélkül használtuk. A tisztaságát ESI-MS és NMR mérésekkel ellenőriztük. A peptid törzsoldat koncentrációját pontenciometriás titrálással határoztuk meg.

A mérésekhez használt fémion törzsoldatokat $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ és $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ analitikai mérlegen való tömegbemérése révén készítettük. A higany-perklorát oldat készítéséhez ismert koncentrációjú perklorosavat használtunk, hogy a fémion hidrolízisét visszaszorítsuk. A fémion törzsoldatok pontos koncentrációját komplexometriás titrálással határoztuk meg. A felhasznált NaOH mérőoldat kereskedelmi forgalomban kapható. Koncentrációját sav-bázis titrálással kálium-hidrogén-ftalát standard-re határoztuk meg. A minták ionerősségének beállításához 0,1M koncentrációban NaClO_4 -ot használtunk. A minták pontos pH-jának beállításához különböző koncentrációjú NaOH, illetve HClO_4 -oldatokat használtunk. Az ^1H -NMR minták készítéséhez ioncserélt víz és D_2O (9:1) elegyét, külső referensként TSP-t (3-trimetilszilil-propanoátot) alkalmaztunk.

IV.2. Szilárd fázisú peptidszintézis

Az Ac-DCSSCY-NH_2 oligopeptidet (rövidítve: DY) immobilizált formájában tanszékünkön állítottuk elő szilárd fázisú peptidszintézissel, Fmoc-stratégiát követve. A szilárd fázisú peptidszintézis aminosavak heterogén közegben történő kapcsolásának láncolata. A szilárd hordozó egy polietilén-glikol (PEG) láncokkal módosított polisztirol/divinilbenzol gyanta volt, amely a PEG láncok végén amino-alkil csoportokat tartalmazott. A 0,27 mmol/g borítottságú gyantából 0,50 g-ot használtunk fel a szintézishez. A szilárd hordozó kiválasztásánál fontos szempont volt annak jó duzzadó képessége vizes közegben, valamint, hogy a szintézis végén, oly módon tudjuk eltávolítani az egyes aminosavak védőcsoportjait, hogy a peptid ne hasadjon le a hordozóról.

A gyanta előkészítésére nem volt szükség, mivel az aminocsoportok nem tartalmaztak semmilyen védőcsoportot. A szabad kapcsolási helyek jelenlétéről Kaiser-teszt^[33] elvégzésével bizonyosodtunk meg, mely a szabad aminocsoportok és a ninhidrin közötti színreakción alapul. A teszt során egy kisméretű kémcsőbe, néhány gyantaszemcséhez 50-50 μl -t csepegtettünk a következő oldatokból: (1) fenol (4 g fenolt oldunk 1 ml abszolút etanolban); (2) tiszta piridin; (3) ninhidrin (0,25 g ninhidrint oldunk 5 ml abs. etanolban). Az elegyet 2 percig 80 °C-os vízfürdőbe merítettük. Eredményes kapcsolás esetén nem

tapasztaltunk színváltozást, ami azt jelentette, hogy nem maradt szabad aminocsoport a gyantán. Amennyiben a szemcsék kék elszíneződését tapasztaltunk (pozitív teszt), meg kellett ismételnünk a kapcsolási lépést. A kapcsolási reakciók előtt a gyantát *N*-metil-2-pirrolidon (NMP) oldószerben duzzasztottuk. A gyanta borítottság értékéből kiszámítható a kapcsoláshoz szükséges aminosav építőkő mennyisége. A szintézis hatékonysága érdekében azonban mindig 3-4-szeres felesleget alkalmaztunk.

Az első aminosav (Tyr) kapcsolását kétszer ismételtük, háromszoros aminosav-felesleggel. A reakció lejátszódásához az aminosav mellett O-benzotriazol-tetrametiluronium-hexafluorofoszfát (HBTU) kapcsolószert, 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) aktiválószert és a diizopropil-etilamin (DIPEA) szerves bázist tartalmazó NMP-s oldatra volt szükség. A HBTU a másik két reagens jelenlétében aktív észtert képez az aminosavval, mely így karboxilcsoportján keresztül könnyen reakcióba léphet a szabad aminocsoportokkal. A szintézislépés során háromszoros HBTU és HOBt, valamint hatszoros DIPEA felesleget alkalmaztunk, a reakcióelegyet pedig kétszer 60 percig kevertettük. A kapcsolást követően a gyantát NMP-vel, diklórmétánnal és metanollal mostuk, majd újabb Kaiser-tesztet végeztünk a kapcsolás sikerességének ellenőrzésére. A következő lépésben acetileztük az esetlegesen szabadon maradt (el nem reagált) aminocsoportokat. Ezzel az úgynevezett „capping” eljárással meggátoltuk, hogy a sorban következő aminosav a hibás helyekre kötődjön. Az acetilezéshez a gyantát diklórmétánban duzzasztottuk, majd 10% (v/v) ecetsavanhidridet és 10% (v/v) DIPEA-t tartalmazó oldatban 2×15 percig állni hagytuk, időnként megkevertük. Az újabb kapcsolás előtt a gyantán lévő aminosav bázisérzékeny Fmoc-védőcsoportját el kellett távolítani. A gyantát NPM-ben duzzasztottuk, majd a lehasítást 20% (v/v) piperidin NMP-s oldatával végeztük el (3+3+10 perc), amit NMP-vel való mosás követett. Az eddigi lépéseket ismételve végeztük el a hexapeptid teljes szintézisét, a további aminosavakat (Cys, Ser, Ser, Cys, Asp) egyszeri kapcsolással építettük be négyszeres aminosav felesleg jelenlétében. Az utolsó sikeres kapcsolás után eltávolítottuk az Fmoc-védőcsoportot, majd az így szabaddá tett terminális aminocsoportokat acetileztük, biztosítva a peptidlánc *N*-terminális végének lezárását.

A szintézist követően az aminosavak oldalláncainak védőcsoportjait el kellett távolítani anélkül, hogy a gyanta és a hexapeptid közötti kötést felszakítanánk. A védőcsoportok lehasításához használt elegy 92% trifluor-ecetsavat (TFA), 2,5% vizet, 2,5% 1,2-etánditiolt (EDT), 2% fenolt és 1% triizopropil-szilánt (TIS) tartalmazott. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 4 órán át kevertettük, majd a gyantát TFA-val, metanollal,

diklórmétánnal és ismét metanollal mostuk, ezt követően pedig egy éjszakán át exszikkátorban szárítottuk.

IV.3. pH-potenciometria

A pH-potenciometriás méréseket pH mérésre alkalmas ionszelektív üvegelektróddal végeztük. A cella elektromotoros erejét az üvegelektród külső felületével érintkező, tehát az analizálandó oldat H^+ -ionaktivitása, pH-ja, szabja meg ^[34]. A titrálások során a fogyott mérőoldat, azaz a fogyott lúganyagmennyiség függvényében mérjük a mintánk pH-ját. A módszer révén olyan reakciók tanulmányozhatók, melyek révén változik az oldat hidrogénion-aktivitása. A vizsgált peptid (de)protonálódási folyamatai az üvegelektróddal elérhető pH $\sim 2 - 11$ tartományban játszódhatnak le, azaz potenciometriásan vizsgálhatók. A fémion-ligandum kölcsönhatás révén a vizsgált pH-tartományban hidrogénionok disszociál(hat)nak a peptidről, amely ugyancsak detektálható, és következtetni lehet a kölcsönhatás erősségére, a képződő komplexek jellemző összetételére különböző pH és fémion-ligandum arány mellett. A méréseket azonos körülmények között végeztük el, a hőmérséklet $25^\circ C$, míg az ionerősség $0,1\text{ M}$ ($NaClO_4$) volt. Mivel a mérendő peptid igen érzékeny az oxidációra, argon atmoszférát alkalmaztunk. A gázpalackból érkező gáz áthaladt egy pirogallott tartalmazó lúgoldaton és egy vizes mosón, mielőtt bevezettük a mérőcellába, melyet egy fóliával is lefedtünk, és ez alatt is argon atmoszférát biztosítottunk.

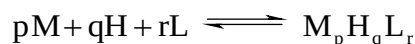
A titrálások kivitelezéséhez egy számítógép által vezérelt, Metrohm Dosimat 765 típusú automata burettából és egy Orion 710A pH-mérőből álló rendszert alkalmaztunk. A kísérletekhez használt Orion Ross Ultra semi micro pH-elektród kalibrációját $c = 0,01\text{ M}$ koncentrációban $HClO_4$ -et és $0,1\text{ M}$ koncentrációban $NaClO_4$ -et tartalmazó oldattal végeztük. Az adatokat egy számítógépes szoftver segítségével értékeltük, amely a módosított Nernst-egyenlet alapján számol, a nemlineáris legkisebb négyzetek módszere szerint

$$E = E_0 + \log K [H^+] + J_H[H^+] + J_{OH}K_w/[H^+]$$

ahol J_H és J_{OH} az elektród savi és lúgos hibáját, valamint a diffúziós potenciálok okozta hibát korrigáló illesztési paraméterek, K_w a vízionszorzat.

A vizsgálatokat pH $2 - 11,3$ tartományban végeztük. Minden minta esetében két párhuzamos mérést hajtottunk végre, titrálásonként 60-80 mérési ponttal. A titrálásokhoz készített törzsoldatban a peptid koncentrációja $c \sim 0,001\text{ M}$ volt. A kizárólag a peptidet tartalmazó minták vizsgálata mellett 0,5:1, 1:1, 2:1 fémion-ligandum arányok alkalmazásával végeztünk titrálásokat.

A rendszerekben képződő részecskék az alábbi általános egyensúlyi folyamattal, ill. képződési állandóval jellemezhetők,



$$\beta_{M_p H_q L_r} = \frac{[M_p H_q L_r]}{[M]^p [H]^q [L]^r}$$

ahol M a fémiont, L pedig a nemprotonált ligandum molekulát jelöli. Az egyenletben, és a továbbiakban mindenhol, a töltések jelölésétől az egyszerűség kedvéért eltekintünk, azonban ezek minden egyes részecskére könnyen kiszámíthatók, ha figyelembe vesszük, hogy a teljesen protonált semleges ligandum a H_4L képlettel írható le. A lépcsőzetes protonálódási és a bruttó komplexképződési állandók ($\beta_{M_p H_q L_r}$) meghatározását a PSEQUAD nevű számítógépes program segítségével végeztük

IV.4. UV-Vis spektroszkópia

UV-Vis spektroszkópiával az olyan kromofor csoportot tartalmazó anyagokat tudjuk vizsgálni, melyek az elektromágneses sugárzás UV-látható tartományába eső sugárzással gerjeszthetők.^[34] A gerjesztéshez szükséges energiát, illetve a fényelnyelés mértékét mérjük a módszer alkalmazása során. A fémkomplexek fényelnyelése főként a molekulapályák közötti átmenetektől, ún. töltésátviteli sávokból, illetve a fémionok d-d pályái közötti elektronátmenetektől származik. A mérési tartomány rendszerint ~190 – 800 nm-ig (illetve detektortól függően ~1100 nm-ig) terjed. Egy adott fémion komplexeinek abszorpciós spektrumát számos tényező befolyásolja, melyek közé tartozik a koordinálódó ligandum(ok) minősége, illetve a komplex geometriája is.

Az oldatbeli vizsgálatoknál (is) számolni kell azzal, hogy nem csak a kromofor csoport abszorbeálhatja a fényt, a küvetának és az oldószernek is lehet fényelnyelése, amellyel a spektrumokat korrigálni kell. Ezt rendszerint egy olyan referencia oldat készítésével oldjuk meg, amely mindenben megegyezik a mintával, csak a kromofort nem tartalmazza. Ennek spektrumát kivonjuk a minták spektrumából. Az abszorpciós spektrumon a különböző csoportokra jellemző sávok egymással átfedésben lehetnek. Kvantitatív meghatározások a Lambert-Beer törvény alkalmazásán alapulnak, ami rendszerint csak híg oldatokban érvényes.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Ez az összefüggés teremt kapcsolatot a minta oldatbeli kromofor-koncentrációja és a mért abszorbancia között, ahol ε a moláris abszorbancia, l az optikai úthossz (a fény által megtett út), általában a kuvetta hossza.

Méréseinket az UV tartományban, $\lambda = 200\text{-}400$ nm között végeztük egy Thermo Scientific Evolution 220 spektrofotométeren. A DY peptidet és a higany(II)ionokat tartalmazó rendszerben a cisztein egységek tiol- és tiolátcsoportjaihoz, a tirozin oldalláncához (protonált ill. deprotonált formában) rendelhető átmenetek, valamint a tiolát-fémion töltésátviteli sáv^[35] változását figyeltük az alkalmazott pH és fémion-ligandum arány függvényében. A méréseket azonos körülmények között ($t = 25$ °C, $I = 0,1$ M NaClO₄) végeztük. A peptid oxidációra való hajlama miatt, a mérőcellát egy argonnal megtöltött üvegcsőben helyeztük el, és a mintába, a pH-potenciometriás mérésekhez hasonlóan egy pirogallolt tartalmazó lúgoldaton és egy vizes mosón keresztül átvezetett argont buborékolattunk. Az üvegcsőben az argon atmoszférát minden mérés előtt ellenőriztük (az égő gyufa elaludt az argonnal teli csőben).

IV.5. Mágneses magrezonancia-spektroszkópia (NMR-spektroszkópia)

Az egyik leghatékonyabb szerkezetvizsgáló és kvalitatív analitikai módszer. Csak olyan atommagokat tartalmazó anyagok vizsgálhatók NMR-spektroszkópiával, amelyek eredő magspinje zérustól eltér ($I \neq 0$).^[34] Az eredő magspinnel rendelkező atommagok mágneses momentummal is rendelkeznek. Az NMR-spektroszkópia a mágneses mag és a külső mágneses tér közötti kölcsönhatáson alapul. A magok mágneses momentuma külső mágneses tér hatására iránykvantáltan áll be, a mag spinkvantumszáma $2I+1$ értéket vehet fel. A magok mágneses momentuma Larmor-frekvenciával (ω) precesszál a külső mágneses tér iránya, mint tengely körül.

Az atommagok a körülöttük lévő elektronhéjak, elektronjaival, sőt a környezetükben elhelyezkedő atommagokkal is kölcsönhatásba lépnek, ami megváltoztatja az NMR-paramétereket. A külső mágneses tér diamágnesességet indukál a magot körülvevő elektronfelhőben, amely a mag helyén megváltoztatja a külső mágneses tér értékét. A különböző elektroneloszlás eltérő rezonanciafrekvenciákat eredményez az atommagok NMR-spektrumában. A rezonanciafrekvenciának a kémiai szerkezettől függő változását kémiai eltolódásnak nevezzük. A kémiai eltolódást csak valamilyen referens maghoz viszonyítva tudjuk meghatározni. Ismert molekulák vagy funkciós csoportok spektrumát összevetve az ismeretlen vegyület spektrumával kvalitatív információt kaphatunk. Az azonos kémiai környezettel rendelkező és mágnesesen is ekvivalens magok azonos jelet mutatnak a spektrumon. A mért jelek intenzitása arányos a jeleket kiváltó mágneses magok számával. Az

NMR-spektrum az egymáshoz közel elhelyezkedő mágneses magok közötti kölcsönhatást is tükrözi. Ilyenkor az egyes jelek egymáshoz közeli vonalakra hasadnak, a felhasadás során létrejövő jelek száma, a kölcsönhatást létrehozó spinrendszer energianívóinak számától függ ($2nI + 1$), a vonalak intenzitása az átmenetek valószínűségével arányos. A felhasadt jelek közti energiakülönbség az ún. csatolási állandó, amely a spinek kölcsönös térbeli helyzetére utal. Az elemzésnél figyelembe kell venni, hogy a magok közötti spin-spin kölcsönhatás eredményeképpen létrejött felhasadás nagyon hasonló a kémiai eltolódáshoz, a különbség, hogy az előbbi a külső mágneses tér erősségétől független, míg az utóbbi annak értékével változik. Az egyes jelek megjelenését, kémiai eltolódását, csatolási állandókat a molekulához koordinálódó fémionok befolyásolhatják. Ezekből a változásokból következtethetünk a koordinációra, a koordinálódó csoportokra és a molekula geometriájára is.

A ^1H NMR mérések Bruker Avance DRX 500 spektrométeren (^1H frekvencia: 500,13 Hz) készültek. A DY ligandum fémiont nem tartalmazó oldataiban, illetve a különböző összetételű higany(II) – peptid rendszerekben is vettünk fel pH-függő spektrumokat, illetve egy kiválasztott pH-n ($\text{pH} \sim 6$) a fémion koncentráció (fémion-ligandum arány) változtatásával is végeztünk kísérleteket. A minták peptid koncentrációja $c \sim 0,001$ M volt, a peptid mintákat 0,01 M koncentrációjú HClO_4 oldatban készítettük el, mely tartalmazott 10 V/V% D_2O -t is. Az oldatok pH-ját 0,1 és 0,01 M-os NaOH illetve HClO_4 oldatok segítségével állítottuk be.

IV.6. Fluorimetria

Az UV-látható fénnel gerjesztett molekulák relaxációja fény emisszióval járhat, ez a jelenség a molekuláris fotolumineszcencia. Elektronátmenetektől függően megkülönböztetjük a fluoreszcenciát, amelynek során az elektron megengedett átmenetek révén jut vissza az alapállapotba, és a foszforeszcenciát, amelynek során spintiltott átmenet következik be egy magasabb spinmultiplicitású (rendszerint triplet) állapotba.^[34]

A fluoreszcencia jelensége során az UV vagy látható fény hatására elnyelt fotonok a molekula elektronjait gerjesztik, majd a molekula ebben a gerjesztett állapotban csak néhány nanomásodpercig tartózkodik, ezután az alapállapotba relaxálódik. Amikor az elektron az alacsonyabb energiájú állapotba ugrik, fotont bocsáthat ki, melynek energiája az elnyelttel azonos vagy annál kisebb, azaz az abszorbeált foton hullámhossza mindig alacsonyabb, mint az emittált fotoné. Minden fluorofór anyag más és más hullámhosszúságú fénnel besugározva készíthető fluoreszkálásra, és az emittált fénysugárzás spektruma is eltérő anyagról anyagra. Az emisszió detektálása a gerjesztő fénysugárra merőlegesen történik, így

megakadályozzuk, hogy a gerjesztő fény a detektorba jusson. A mintát a fényforrás és a detektor közé helyezzük. A megfelelő hullámhosszúságú fény kiválasztására monokromátort alkalmazunk.

Megkülönböztetünk gerjesztési és emissziós fluoreszcencia spektrumokat. Az előbbit úgy állítjuk elő, hogy az emisszió fényintenzitását egyetlen hullámhosszon mérjük, miközben a gerjesztési hullámhosszt folyamatosan változtatjuk. Az emissziós spektrumot pedig úgy kapjuk, hogy az emittált fény intenzitását a hullámhossz függvényében mérjük, miközben a mintát egyetlen hullámhosszon gerjesztjük. A két spektrum alakja megegyezik és általában egymásra tükörszimmetrikus, de a Stokes eltolódás miatt az emissziós spektrum a gerjesztési spektrumhoz képest a vörösebb tartomány felé tolódik el.

A fluoreszcenciát mutató molekulák többsége delokalizált π -elektronokat tartalmaz. Nukleofil szubsztituensek növelik a fluoreszcenciát azzal, hogy segítik az elektronátmenetet az alapállapot és a gerjesztett állapot között, vagyis növelik a π -elektronok delokalizációját. Az eletrofil szubsztituensek viszont rendszerint csökkentik vagy kioltják a hatást. A fluoreszcencia intenzitása az anyagi minőségen túl a molekula környezetére is érzékeny. Az oldószer pH-jára, polaritására és a hőmérsékletére is érzékenyen változhat az emissziós intenzitás. A hőmérséklet csökkentése, vagy az apoláros közeg rendszerint növeli az intenzitást.

A fluoreszcencia érzékeny a fluorofór csoport közvetlen környezetére is, pl. ha egy másik molekula vagy molekularészlet kerül a közelbe. Ezen tulajdonságok alapján a módszer igen jól alkalmazható kémiai folyamatok vagy konformációs átalakulások, aggregáció, disszociáció követésére. Három aminosav oldalláncának van jelentősebb fluoreszcenciája: a triptofánnak, a tirozinnak és a fenil-alaninnak. Ezen aminosavak fluoreszcenciájának vizsgálata alkalmas peptidek, fehérjék tanulmányozására olyan folyamatokban, amikor az említett egységek oldalláncainak környezete megváltozik az adott folyamatban.

A méréseket azonos körülmények között ($t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 0,1\text{ M NaClO}_4$) végeztük egy Hitachi F-4500 típusú spektrofluoriméteren (résszélesség: 5 ill. 10 nm). Mintáinkat a spektrofotometriás vizsgálatoknál leírtak szerint állítottuk össze, és gátoltuk meg a ligandum esetleges oxidációját. A mérések során alkalmazott peptid koncentráció $c = 3,0 \times 10^{-5}\text{ M}$ volt. A vizsgálatokat két eltérő pH-n (pH = 2.0 illetve pH = 6.0) végeztük állandó peptid koncentráció mellett a higany(II) koncentrációját változtatva. Olyan mérősorozatokat is végeztünk, ahol a minták a ligandum koncentrációjára vonatkoztatva egy ekvivalens kadmium(II)iont is tartalmaztak.

IV.7. Induktív csatolású plazma tömegspektrometria (ICP-MS)

Az ICP-MS kombináció az egyik leghatékonyabb atomi ionforrást (induktív csatolású plazma, ICP) és az egyik legérzékenyebb detektort (tömegspektrométer) kapcsolja össze, melyekből az elem- és izotópanalitika egyik legnagyobb teljesítőképességű műszere lesz.^[36] Az ICP-MS gyors, tranziens jelek (10-100 ms/scan) mérésére is alkalmas, multielemes technika, amely izotóp információt is szolgáltat. A kimutatási határa nagyon alacsony (ppt, vagy az alatti) a periódusos rendszer mintegy 70-75 elemére, a dinamikus linearitási tartománya 8-9 nagyságrend. A módszerre jellemző a nagy szelektivitás és szelektív érzékenység. Ezzel szemben a módszernek vannak nem figyelmen kívül hagyható hátrányai is, pl.: a főelemekre a precizitás nem mindig megfelelő, a minta oldott sótartalma nem haladhatja meg a 0,1-0,2 %-ot hagyományos oldatbeporlasztásos mintabevitel esetén. Fontos az is, hogy az izobár és a többatomos ionok spektrális zavarást okoznak, ami csak részben kerülhető el.

Az ICP-MS technika olyan tömegspektrometriás módszer, melyben az induktív csatolású plazma tölti be az ionforrás szerepét. Az ionforrás működéséhez nincs szükség vákuumra, így egyszerűbb a mintavétel. A minta általában aeroszol formájában lép be a plazmába, ahol a nagy hőmérsékletnek köszönhetően a jelen lévő komponensek disszociálódnak, atomizálódnak illetve ionizálódnak, ezáltal elemi ionok detektálására van lehetőség. Előnyt jelent a módszer érzékenysége szempontjából, hogy az elemek többsége legalább 90 %-ban ionizálódik a plazmában. Az ICP ionforrásokban az egyszeres töltésű ionok lényegesen nagyobb mértékben képződnek, mint a többszörös töltésűek. Működési elvük szerint megkülönböztetünk pneumatikus, ultrahangos és nagynyomású hidraulikus porlasztórendszereket. Ezen mintabeviteli módszerek teszik lehetővé a folyadék és szilárd minták finom eloszlású aeroszol formában történő plazmába juttatását, hogy a minta komponenseinek disszociációja, atomizációja és gerjesztése a plazmán való áthaladás során teljes mértékben megtörténjék.

A plazmából vett ionok szétválasztását a tömeganalizátor végzi tömeg/töltés arányuk alapján. A teljes plazmamennyiség mintázásához nagyon nagy pumpateljesítmény kellene, ezért egy furattal ellátott, vízűtött kónuszon keresztül szívják be a plazmaalkotók egy részét. A furaton áthaladó semleges és ionos részekből álló szuperszonikus gáznyaláb az expanziós térbe jut, ahol kúpszerűen kitágul. A második furatos kónusz az első mögött található, amely célja egy második pumpálási lépcsőt biztosítani. A gáznyalábból a semleges részecskék diffúzióval távoznak, és a vákuumszivattyú eltávolítja őket, a töltött részecskék pedig továbbhaladnak az ionoptika felé. Az elektrosztatikus lencserendszer feladata, hogy

elválassza a pozitív töltésű ionokat a megmaradt semleges atomoktól és a fotonoktól, valamint a negatív töltésű részecskéktől, másrészt a pozitív ionok nyalábját köteget, fókuszálja az analizátorban elérhető legjobb tömegfelbontás érdekében. A „foton stop” egy, a rendszer tengelyében elhelyezett, fotonokat blokkoló lemez, amire azért van szükség, mert a plazmából egyenes vonalon haladó fotonok a detektorban jelet generálnának.

A tömeg/töltés arány alapján az egyes ionok azonosíthatóak lesznek, így egyértelmű minőségi információhoz juthatunk. A mért jelnek egy ismert koncentrációjú standard minta jelével történő összehasonlításából számíthatjuk ki az adott komponens koncentrációját. A leggyakrabban használt analizátorok a kvadrupólus, a kettős fókuszálású és a repülési idő (TOF) analizátor. A legtöbb készülékben a tömeganalizátorból kilépő ionokat egy elektronsokszorozó detektálja.

ICP-MS méréseinket egy Agilent 7700x típusú készüléken végeztük. A vizsgálatokhoz használt minták előkészítése egy általános protokoll alapján történt. A DY-NTG gyantából ~10,0 mg-ot ($\pm 1\%$) 15 ml-es Falcon-tesztcsövekbe mértünk, melyre argon gázt vezettünk annak érdekében, hogy a peptid oxidációjának kockázatát minimálisra csökkentsük. A mérésekhez használt fémion-oldatokat szilárd sóikból készített törzsoldatok hígításával készítettük el. A törzsoldatok koncentrációit általában komplexometriás titrálásokkal határoztuk meg, illetve adott esetben (HgCl_2) pontos beméréssel készítettük. A mérésekhez szükséges hígított fémion-oldatok koncentrációinak tervezéséhez kiszámoltuk a már peptidet is tartalmazó gyanta elméleti borítottságát (100 %-os sikerességű kapcsolásokat feltételezve) az alábbi képlet segítségével:

$$L = \frac{L_i}{1.0 + L_i \times M_{\text{ad}}}$$

ahol L ill. L_i a gyanta borítottsága a szintézis után és előtt, M_{ad} pedig az immobilizált peptid molekulatömege. Ezek alapján a DY-NTG borítottsága 0,227 mmol/g. Az V.5. fejezetben bemutatott mérések eredményeinek tárgyalásához előnyös a fémion-kötő képességet jellemző elméleti kapacitást is definiálni, amely ugyancsak 0,227 mmol/g, amennyiben minden egyes peptidlánchoz egy higany(II)ion kötődését feltételezzük. Amennyiben a fémion-kötő képességet a higany(II)ionok tömegére vonatkoztatjuk, akkor a maximális fajlagos kapacitás 45,53 mg / 1g gyantának adódik. A mérésekhez használt HgCl_2 -oldatok koncentrációját $7,57 \times 10^{-5} - 6,81 \times 10^{-4}$ M tartományban, a pH-t pedig 2,0-6,0 között változtattuk. A pH-értékek beállítását kombinált üvegelektrod és pH-mérő segítségével végeztük, melyet standard pufferek segítségével előzőleg kalibráltunk. A pH > 2,0 oldatok elkészítéséhez a

következő puffer rendszereket használtuk: pH = 4,0 - ecetsav/Na-acetát, pH = 6,0 - MES/NaOH (MES: 2-(N-morfolino)etánszulfonsav). A pontos pH-értékeket 0,1 M NaOH oldat segítségével állítottuk be. Az fémion-oldatokat argon gázzal átbuboréktattuk, majd 10,0 cm³-es részleteket öntöttünk a kimért gyantákra. 120 perc forgatás után a mintákat 15 percig centrifugáltuk 5000 rpm fordulatszámon, majd az oldatok tisztájából 2-2 cm³-t vettünk ki a további vizsgálatokhoz. A mintarészletek pontos hígításával készült oldatok fémion koncentrációit ICP-MS-sel mértük meg. A műszer kalibrálásához higany(II) standard oldatot, illetve a többféle fémiont tartalmazó kísérletek esetén egy multieleemes standard-et használtunk, melyek hígításával kalibrációs oldatsorozatot készítettünk.

V. Eredmények és tárgyalásuk

V.1. Egyensúlyi mérések a higany(II) – Ac-DCSSCY-NH₂ (DY) rendszerben

Vizsgálatainkat a szabad peptid (de)protonálódási állandóinak meghatározásával kezdtük. A DY ligandum négy deprotonálódó csoporttal rendelkezik, a savas karakterű Asp egység mellett 2 bázikus Cys aminosavat és egy erősebben bázikus Tyr-t tartalmaz a molekula. A meghatározott protonálódási állandókat, illetve a peptid pK_s értékeit az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: A ligandum protonálódási állandóinak, illetve higany(II) komplexek képződési állandóinak logaritmusai az utolsó tizedes jegyekre vonatkozó becsült hibákkal (*I* = 0,1 M NaClO₄, *T* = 298 K)

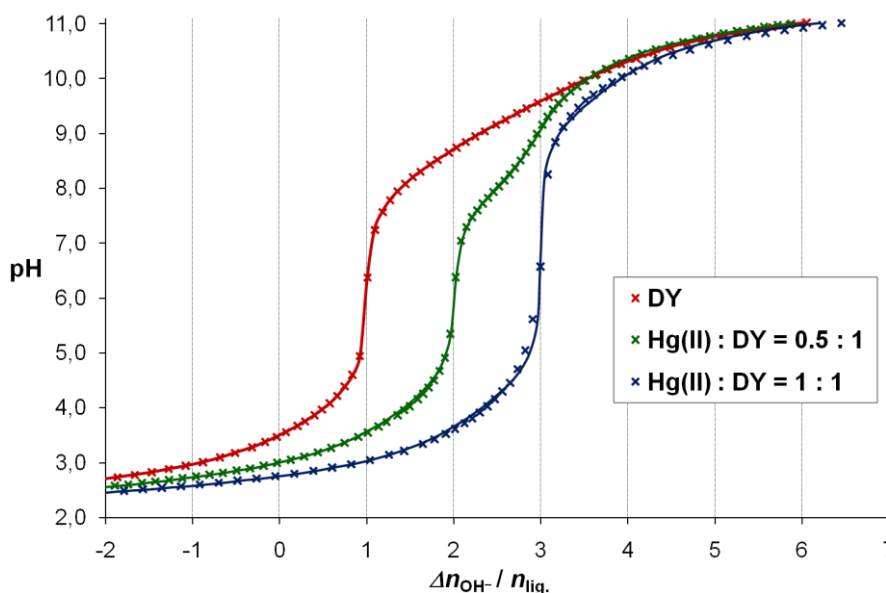
H _q L _r	lgβ	pK _s	M _p H _q L _r	lgβ*
HL	10,05(2)	10,05	HgH ₂ L	53,85 [#]
H ₂ L	19,29(2)	9,24	HgHL	49,7(1)
H ₃ L	27,56(2)	8,27	HgL	40,1(1)
H ₄ L	31,36(2)	3,80	HgH ₃ L ₂	72,7(3)
			HgH ₂ L ₂	64,8(1)
			HgHL ₂	54,8(2)
			HgL ₂	43,6(3)

* A HgH₂L részecske becsült stabilitási állandójának rögzítésével számolt adatok.

[#] Egy rokon ligandum higany(II) komplexének stabilitását alapul véve megbecsült érték.

A fémkomplexek képződési állandóit a higany(II) – DY arány változtatásával 6 titrálásból határoztuk meg. A fémion felesleget tartalmazó rendszer 2,7-es pH-tól széles pH tartományban csapadékos volt, így ezeket a méréseket nem vettük figyelembe az értékelés során.

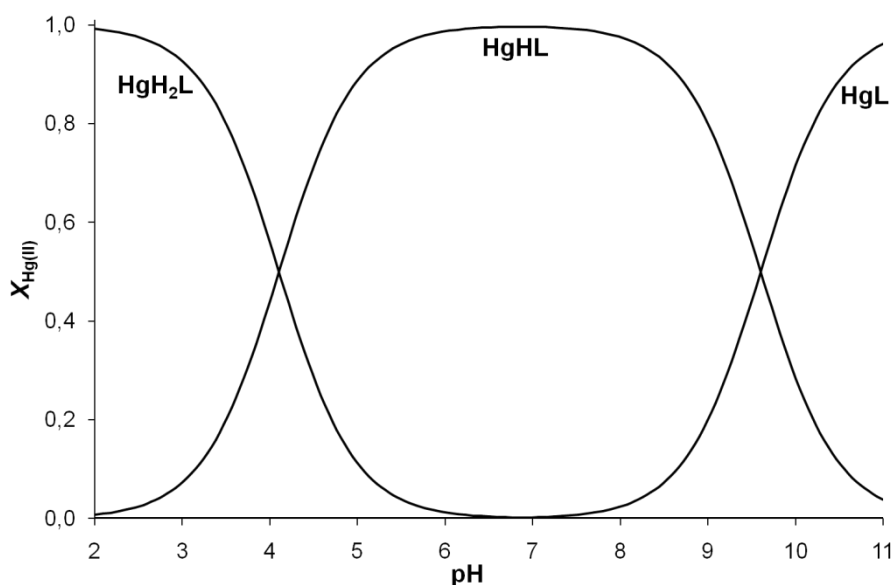
A szabad ligandumhoz képest az 1:1 fémion-ligandum összetételű rendszerben jelentős extra lúgfogyást tapasztaltunk már savas körülmények között is. Ez az extra lúgfogyás a ligandumra nézve kb. 2 ekvivalens mennyiségű, így feltehetően a két Cys oldallánci tiolátcsoportjai koordinálódnak a fémionhoz (9.ábra). A ligandum felesleg jelenlétében mért extra lúgfogyás az első inflexiós pontig egy ekvivalens a ligandumra nézve. Ez, a spektroszkópai vizsgálatokkal együtt azt sugallja, hogy a ligandum ~50 %-a kötött, míg a maradék 50 % szabad formában van az oldatban. Semleges pH felett azonban a titrálási görbén egy karakterisztikus második lépcső figyelhető meg, amelyet sem a szabad ligandum esetében, sem 1:1 aránynál nem tapasztaltunk (9.ábra). Ennek alapján pH ~ 7 felett bisz-komplexek jelenlétét feltételezzük.



9. ábra: A szabad ligandum és a Hg(II) : DY különböző arányú rendszerek normált titrálási görbéi
($I = 0,1\text{M NaClO}_4$, $T = 298\text{ K}$)

A higany(II)-ionokat tartalmazó oldatok titrálásait legjobban leíró modellt, és a meghatározott komplexek képződési állandóit ($\lg\beta$) az 1. táblázat mutatja. Meg kell jegyezni, hogy a higany(II)ionoknak a peptidhez való rendkívül jelentős affinitása miatt már egészen savas körülmények között is a fémion teljes mennyisége komplexált formában van jelen (lásd lentebb). Emiatt, kizárólag a titrálási adatokból, a stabilitási állandók meghatározása nem lehetséges. Jó közelítésre ad azonban lehetőséget egy CXXC szekvenciát tartalmazó tetrapeptid – higany(II) rendszerben az ML összetételű törzskomplexre meghatározott állandó ($\lg\beta_{\text{HgL}} = 40,0$),^[37] melyet, mint közelítő értéket, a higany(II) – DY rendszerre elfogadva megtudtuk becsülni a modellünkben szereplő legsavasabb körülmények mellett képződő mono-komplex képződési állandóját. Ezt az értéket a titrálási adatok illesztése során rögzítve (azaz nem változó paraméterként alkalmazva) a többi részecske becsült képződési állandója is kiszámolható. Hangsúlyozni kell, hogy az ilyen módon meghatározott termodinamikai képződési állandók csak durva közelítések, azonban az egyes komplexek egymásba való átalakulását jellemző pK értékek pontosan adatokként elfogadhatók.

Az ilyen módon kiszámolt $\lg\beta$ értékek felhasználásával eloszlásgörbék tudunk szerkeszteni, melyek a fentebb leírtak értelmében helyesnek tekinthetők.

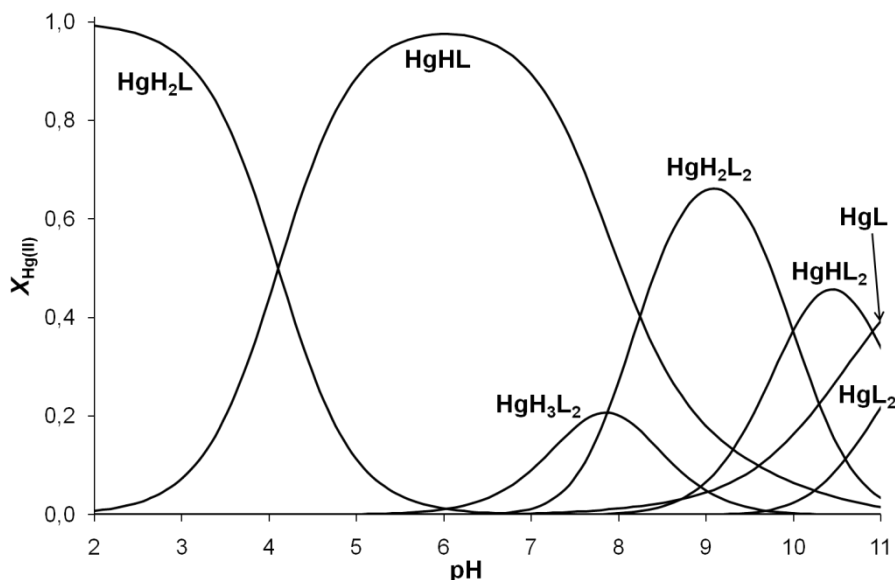


10. ábra: A Hg(II) : DY 1:1 arányú rendszer eloszlásgörbéi
($c_{DY} = 0,001 \text{ M}$, $I = 0,1 \text{ M NaClO}_4$, $T = 298 \text{ K}$)

Az ligandumhoz képest egy ekvivalensnyi fémiont tartalmazó rendszerben látjuk, hogy a higany(II)ionok alacsony pH-n azonnal kötődnek a ligandumhoz (10.ábra). pH ~ 4 körül az Asp karboxil csoportjának deprotonálódására jellemző pH-tartományban a HgH_2L komplex HgHL részecskévé alakul, s a folyamat során feltehetőleg az említett Asp aminosav oldallánca deprotonálódik. 9-es pH felett egy további folyamat, valószínűsíthetően a tirozin oldallancának deprotonálódása révén képződik a HgL komplex. A ciszteinek tiolcsoportjainak deprotonálódását nem tudjuk követni a rendszerben, ezért feltehetően mind a kettő koordinálódik a fémionhoz.

Ligandum felesleg jelenlétében pH ~ 6 -ig az 1:1 összetételű rendszerrel megegyező komplexek képződnek (11.ábra). Titrálási adatsoraink megfelelő illesztéséhez pH ~ 6 fölött azonban már bisz-komplexek kialakulását kell feltételeznünk. A HgH_3L_2 komplexből kevés van jelen, összetétele alapján egy egyfogúként és egy kétfogúként kötődő ligandumot tartalmazhat, melyben a higany(II)ion egy $\{\text{HgS}_3\}$ típusú trigonális koordinációs környezetben helyezkedhet el. A részecske egy $pK = 7,9$ -es értékkel jellemezhető folyamatban a HgH_2L_2 összetételű, jóval dominánsabb részecskévé alakul. A HgH_2L_2 komplexben feltehetőleg már csak a ligandumok egy-egy tirozin oldallánca protonált. Azonban nem dönthető el egyértelműen, hogy ebben a komplexben mind a négy Cys-tiolát koordinálódik-e a higany(II)ionhoz, vagy továbbra is csak három, egy pedig szabadon van, ugyanis az említett pK -érték meglehetősen hasonló, mint a szabad ligandum ciszteineinek deprotonálódását jellemző állandók (lásd 1. táblázat). Lúgos pH-tartományban teljesen

deprotonálódott törzskomplexek válnak uralkodóvá (HgL , HgL_2). Ezek megkülönböztetése meglehetősen nehézkes 11-es pH körül, így a mono- és a bisz-komplexek PSEQUAD által számolt arányában nem lehetünk biztosak.

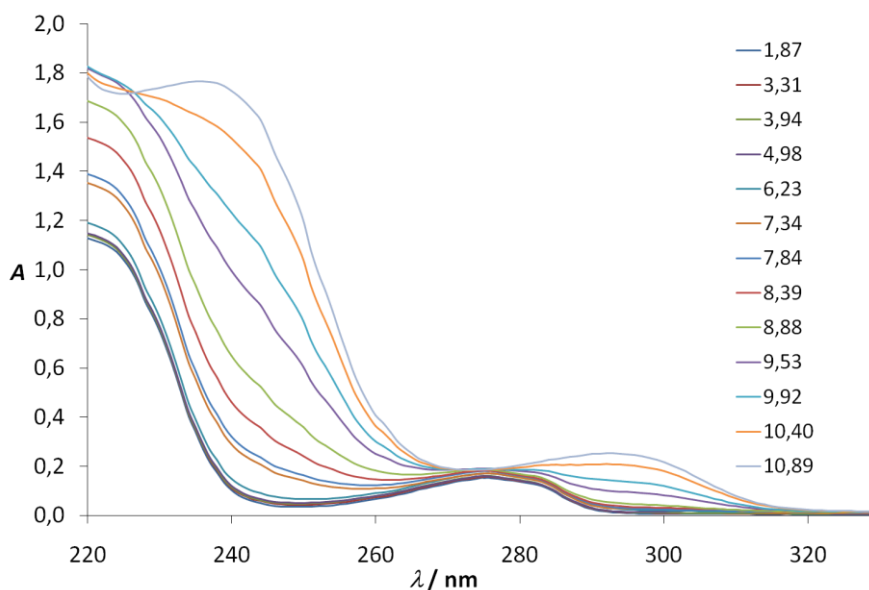


11. ábra: A $\text{Hg(II)} : \text{DY}$ 0,5:1 arányú rendszer eloszlásgörbéi
($c_{\text{DY}} = 0,001 \text{ M}$, $I = 0,1 \text{ M NaClO}_4$, $T = 298\text{K}$)

Fontos megállapítani, hogy a szabad ligandum Asp-karboxilcsoportjára és a Tyr egység fenolos OH-csoportjára jellemző pK értékekhez hasonló deprotonálódási állandók az egyes mono- illetve bisz-komplexekre is jellemzőek, és ezek csak kis mértékben tolódtak el a szabad ligandum pK -ihoz képest, így ezek a csoportok valószínűleg nem vesznek részt a higany(II)-koordinációban, sem 1:1 sem 0,5:1 fémion-ligandum arányánál.

V.2. A higany(II) – DY kölcsönhatás tanulmányozása UV-spektroszkópiával

A higany(II) : DY rendszer pH-függő UV-spektrumait három különböző: 0,5:1, 1:1 és 2:1 fémion : ligandum arányánál is vizsgáltuk 1,7 – 11 pH tartományban. Emellett felvettük a szabad ligandum spektrumait is hasonló pH-tartományban, hogy a spektrumok összehasonlításával következtethessünk a lejátszódó folyamatokra és a fémion koordinációs környezetére.

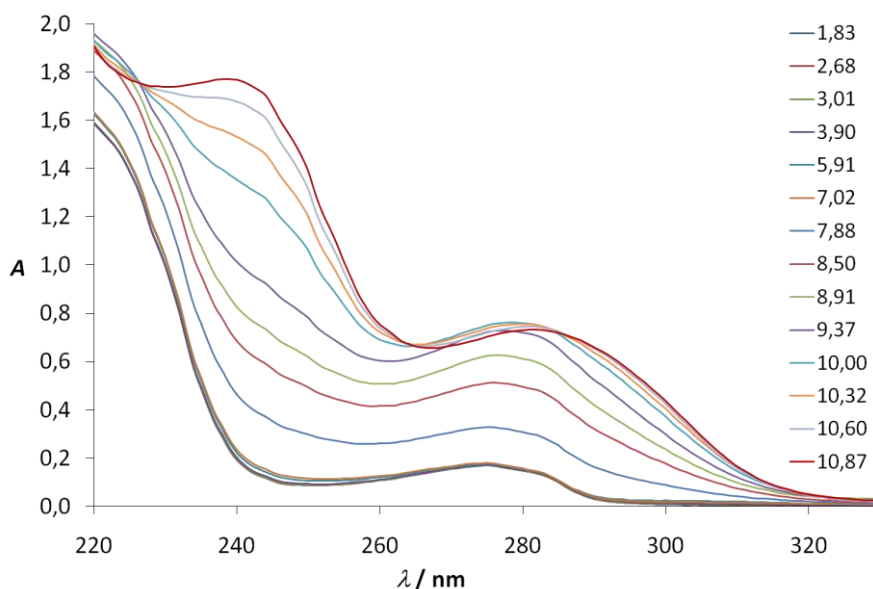


12. ábra: A DY peptid pH-függő UV-spektrumai
($T = 298 \text{ K}$, $c_{\text{DY}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$, $I = 0,1 \text{ M NaClO}_4$)

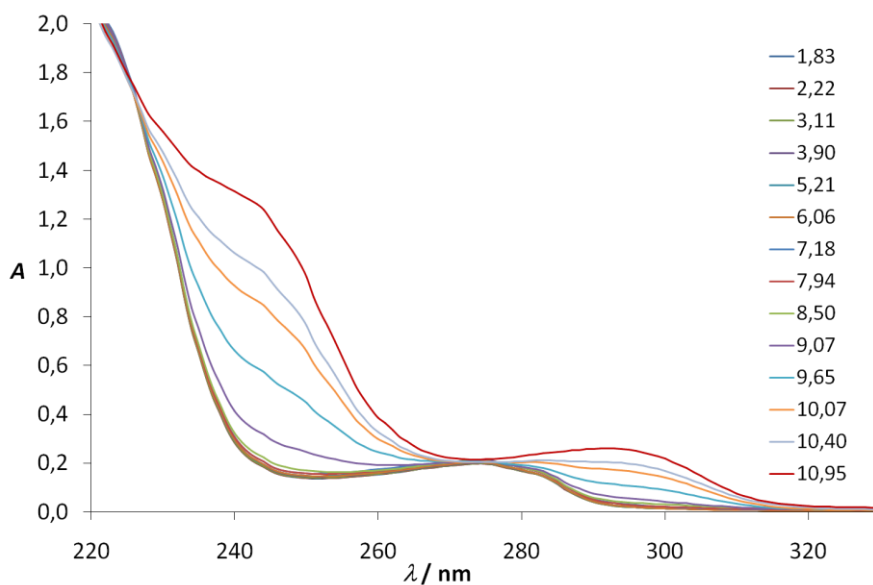
A peptid elektrongerjesztési spektrumában széles pH-tartományban ($\text{pH} \sim 2\text{--}6$) alig észlelhető változás (12. ábra), azonban 6-os pH felett a spektrumok alakja szignifikáns módon megváltozik. $\lambda = 240 \text{ nm}$ környékén az abszorbancia jelentős növekedése figyelhető meg, illetve magasabb pH-n 295 nm -nél is növekedést tapasztalunk az elnyelésben. Ezen átmenetek megjelenése egyrészt a két cisztein tiolcsoportjának ($\lambda_{\text{max}} \sim 235 \text{ nm}$),^[38] másrészt a tirozin oldalláncának deprotonálódásával magyarázható.^[39] A tiolcsoportok deprotonálódását jellemző nagy intenzitású átmenet $\lambda \sim 235\text{--}240 \text{ nm}$ környékén figyelhető meg.^[38] A tirozin oldallánc protonált formájára egy 270 nm -nél, míg deprotonált formájára lúgos közegben egy 295 nm -nél megfigyelhető elnyelési sáv jellemző.^[39] Ugyanakkor a tirozin oldallánc deprotonálódása 240 nm környékén is az abszorbancia szignifikáns növekedésével jár.^[40] A peptidben lévő karboxilcsoport, illetve annak deprotonált formája az UV-tartományban nem eredményez lényeges elnyelést, így nem látszik a spektrumon.

A $0,5 : 1$ fémion:ligandum arányú sorozatban sem tapasztalunk eltérést az alacsonyabb pH tartományban felvett spektrumok között, azonban a mért intenzitások már 2-es pH -n is nagyobbak, mint a szabad ligandum esetében (13. ábra), ami arra utal, hogy a ligandum, legalábbis részben koordinálódik a fémionhoz. A szabad ligandumhoz képest megnövekedett abszorbancia a $\text{-S}^{\text{-}}\text{-Hg}^{2+}$ töltésátviteli sávhoz rendelhető. A savas pH-tartományban változatlan spektrumok azt jelzik, hogy nem játszódik le olyan folyamat a rendszerben, ami befolyásolná a fémion koordinációs módját. $\text{pH} \sim 7$ felett azonban markáns abszorbancia-növekedést tapasztalunk $\lambda \sim 240 \text{ nm}$ környékén és a $\lambda \sim 260\text{--}300 \text{ nm}$ tartományban is. Ezt

magyarázhatnánk a szabad ligandum spektrumában is észlelt tirozin és tiol-csoportok deprotonálódásának hatásával, azonban a szabad ligandum esetében a spektrum alakja 280 nm környékén nem változik a pH-val (13.ábra).



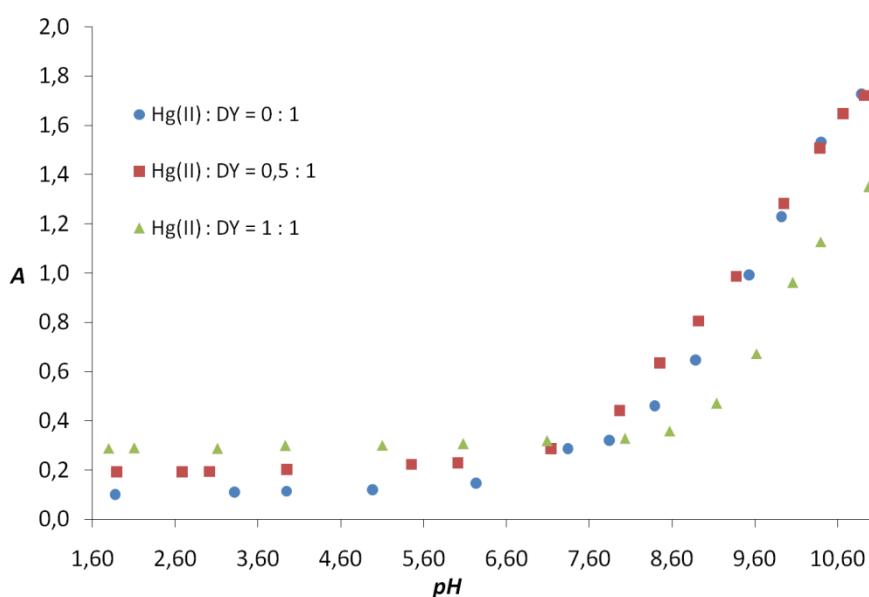
13. ábra: Hg(II) : DY 0,5 : 1 arányú rendszer pH-függő UV-spektrumai
($T = 298\text{ K}$, $c_{\text{DY}} = 1,0 \times 10^{-4}\text{ M}$, $I = 0,1\text{ M NaClO}_4$)



14. ábra: Hg(II) : DY 1 : 1 arányú rendszer pH-függő UV-spektrumai
($T = 298\text{ K}$, $c_{\text{DY}} = 1,0 \times 10^{-4}\text{ M}$, $I = 0,1\text{ M NaClO}_4$)

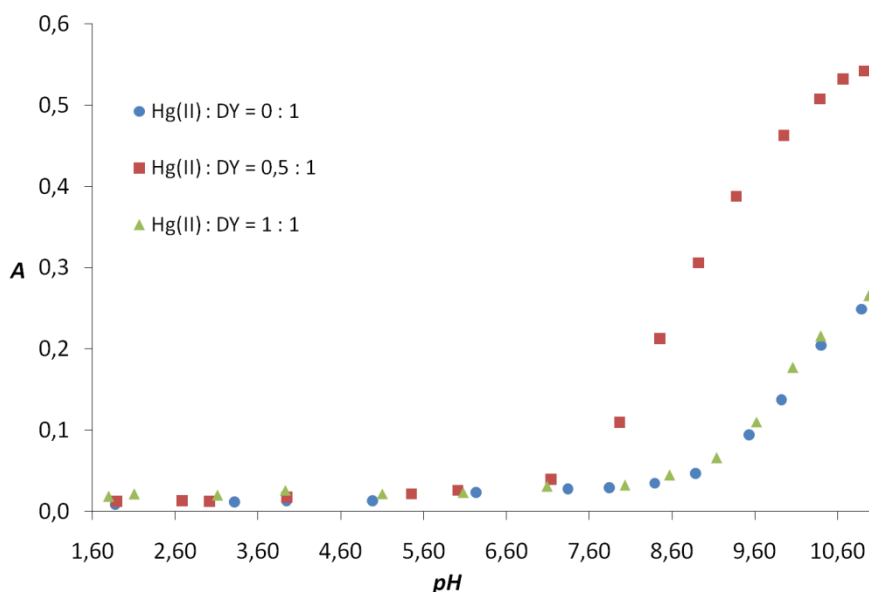
A ligandumhoz képest egy ekvivalens higanyt(II)-t tartalmazó minta spektrumában még magasabb intenzitásról indulunk (14. ábra), mint az előző esetekben, azaz a fentebb

említett töltésátviteli sáv intenzitása a több koordinálódott fémion miatt nagyobb. 8,5-es pH-ig a spektrumok alakja közel azonos, a pH további növelése azonban $\lambda \sim 240$ és 295 nm környékén a mért abszorbancia növekedését eredményezi. Eltérően a szabad ligandumnál tapasztaltaktól, ahol már pH ~ 7 -től megfigyelhető a tiolcsoportok deprotonálódását kísérő UV-elnyelés növekedése 240 nm környékén, a Hg(II):DY 1:1 rendszerben csak pH 9 felett kezd nőni az abszorbancia mind 240, mind 295 nm-nél. Érdekes megfigyelni, hogy a spektrumok intenzitása ~ 275 nm-nél gyakorlatilag változatlan. Mivel a tiolátok deprotonálódása már a titrálás kezdetén megtörtént, és a szabad ligandumhoz hasonlóan 275 nm-nél nincs változás a spektrum alakjában (14. ábra), a tapasztalt változások a – nagy valószínűséggel nem-koordinálódó – tirozin oldallánc deprotonálódásához rendelhetők.

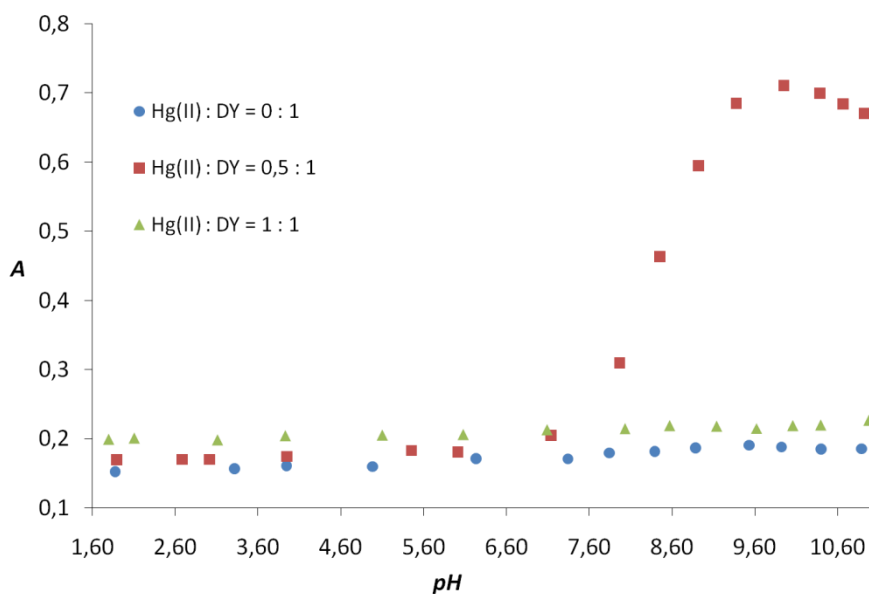


15. ábra: A Hg(II) : DY rendszerben különböző fémion-ligandum arányoknál mért abszorbancia értékek a pH függvényében 240 nm-en ($T = 298$ K, $c_{DY} \sim 1 \times 10^{-4}$ M, $I = 0,1$ M NaClO₄)

A 0,5 : 1 fémion:ligandum arányú rendszerben felvett spektrumok 7-es pH-ig a szabad ligandumra és az 1 : 1 összetételű rendszerre jellemző spektrumok átlagai (15. ábra). Semleges pH fölött azonban a ligandum-felesleg jelenlétében mért spektrumok alakja teljesen eltér a másik két rendszerben mérttől (16-17. ábrák).



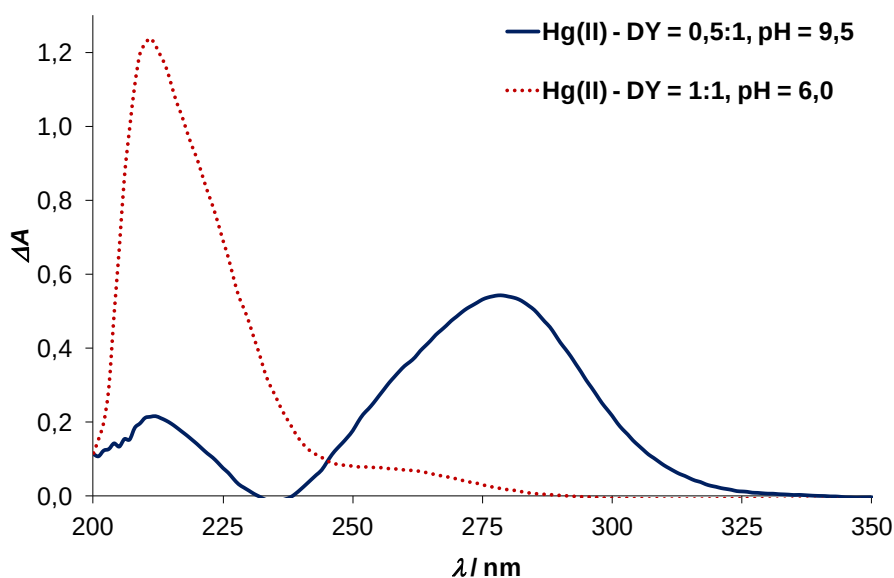
16. ábra: A Hg(II) : DY rendszerben különböző fémion-ligandum arányoknál mért abszorbanca értékek a pH függvényében 295 nm-en ($T = 298\text{ K}$, $c_{\text{DY}} \sim 1 \times 10^{-4}\text{ M}$, $I = 0,1\text{ M NaClO}_4$)



17. ábra: A Hg(II) : DY rendszerben különböző fémion-ligandum arányoknál mért abszorbanca értékek a pH függvényében 275 nm-en ($T = 298\text{ K}$, $c_{\text{DY}} \sim 1 \times 10^{-4}\text{ M}$, $I = 0,1\text{ M NaClO}_4$)

A $\{\text{HgS}_2\}$ típusú koordinációra jellemző töltésátviteli sáv maximum irodalmi adatok alapján 220 nm környékén jellemző.^[37,40] Ezt az átmenetet már pH ~ 2 -nél is megfigyelhetjük a fémion tartalmú spektrumainkon (13-14. ábrák), így arra következtetünk, hogy a $\{\text{HgS}_2\}$ koordinációjú komplexek már ilyen alacsony pH-n kialakulnak. Ugyancsak referenciák alapján több tiolátsoport koordinálódása a fémionhoz kisebb energiájú átmenetet eredményez, a trigonális komplex töltésátviteli sávja $\lambda \sim 240\text{-}250\text{ nm}$ -nél^[35,41] (15. ábra), míg

a (torzult) tetraéderes higany(II)-komplexekre jellemző sáv $\lambda \sim 285$ nm-en jelentkezik.^[41,42] A higany(II) : DY 0,5:1 rendszerben 275-280 nm körüli elnyelési maximum hely egyértelműen jelzi egy második ligandum koordinációját (13. és 17. ábrák), amelyben jellemzően négy tiolát csoport koordinálódhat a fémionhoz torzult tetraéderes geometriát kialakítva. A pH 10 felett tapasztalt enyhe vörös eltolódás (13. ábra) a nem-koordinálódó tirozin oldalláncok deprotonálódásának következménye. A $\{\text{HgS}_2\}$ koordinációs szférájú mono-, illetve a $\{\text{HgS}_4\}$ típusú bisz-komplexekre jellemző töltésátviteli sávok ($\lambda_{\text{max}} \sim 220$ nm és $\lambda_{\text{max}} \sim 280$ nm) még jobban szemléltethetők különbségi spektrumokkal. Ezeket úgy nyerhetjük, hogy a higany(II) : DY 1:1 illetve 0,5:1 összetételű rendszerekben adott pH-n mért spektrumokból kivonjuk a szabad ligandum azonos körülmények mellett felvett spektrumát (18. ábra), és ezzel eltávolítjuk a kizárólag a ligandumra jellemző átmeneteket.

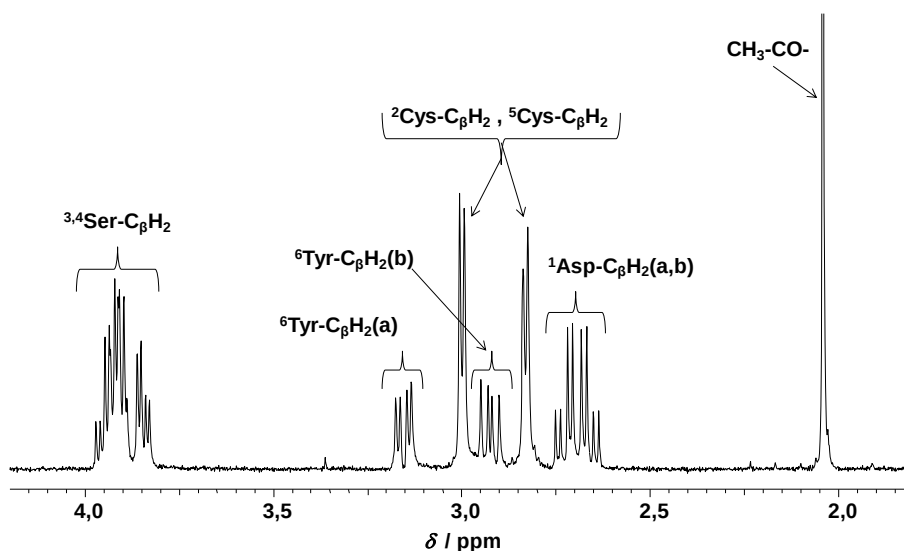


18. ábra: Különbségi spektrumok a Hg(II) : DY 1:1 és 0,5:1 összetételű rendszerekben. A fémion-tartalmú minták spektrumaiból a szabad ligandum azonos pH-n mért spektrumait vontuk ki.

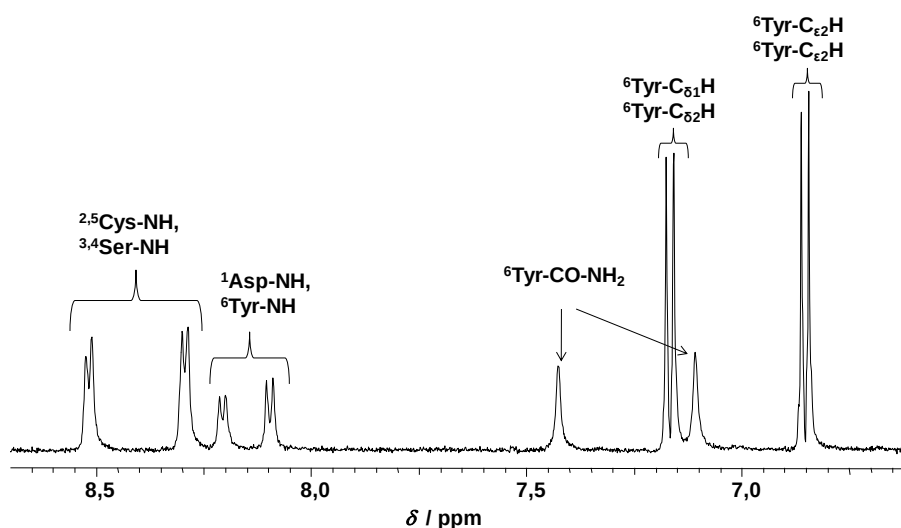
($T = 298$ K, $c_{\text{DY}} \sim 1 \times 10^{-4}$ M, $I = 0,1$ M NaClO₄)

V.3. A higany(II) – DY kölcsönhatás tanulmányozása ¹H NMR-spektroszkópiával

A fémion-peptid kölcsönhatást mágneses magrezonancia-spektroszkópiával is tanulmányoztuk. A fémiont nem tartalmazó mintában (21-22. ábrák), illetve a Hg(II) : DY 0,5:1 és 1:1 arányú rendszerekben ¹H-NMR spektrumok pH-függő sorozatát vettük fel (lásd F1-4. ábrák). A mérések kivitelezéséhez alkalmazott vízelnyomás (presat) következtében az egyes aminosavak H₂O/HDO maradék jelhez közel eső CH_α rezonanciáit nem tudtuk megfelelően detektálni, így ezeket nem használtuk következtetéseink levonásához.



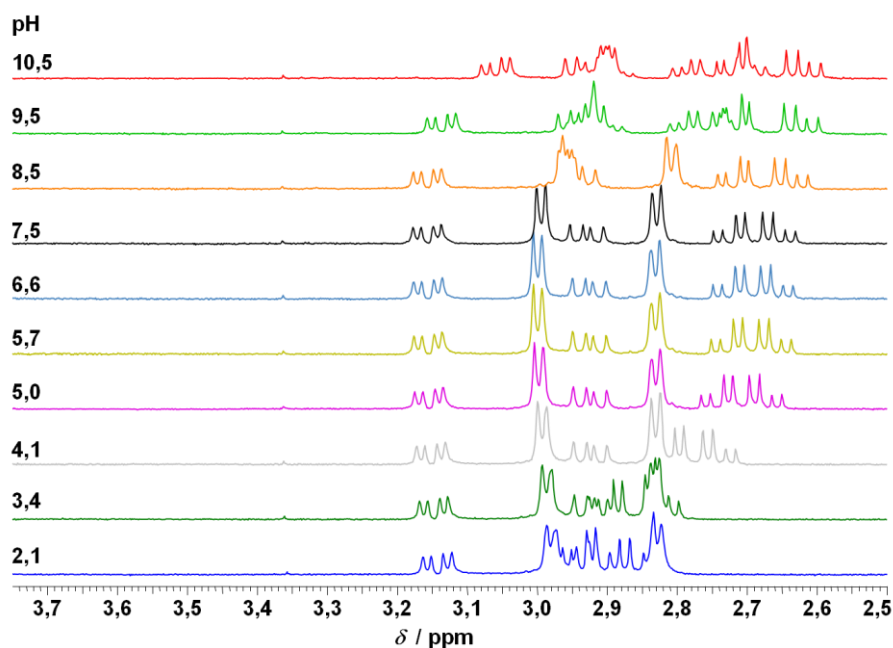
19. ábra: A DY peptid ^1H -NMR spektrumának kiválasztott tartománya pH~5,7
($T = 298\text{ K}$, $c_{\text{DY}} \sim 1,0 \times 10^{-3}\text{ M}$, 10/90 V/V% $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$)



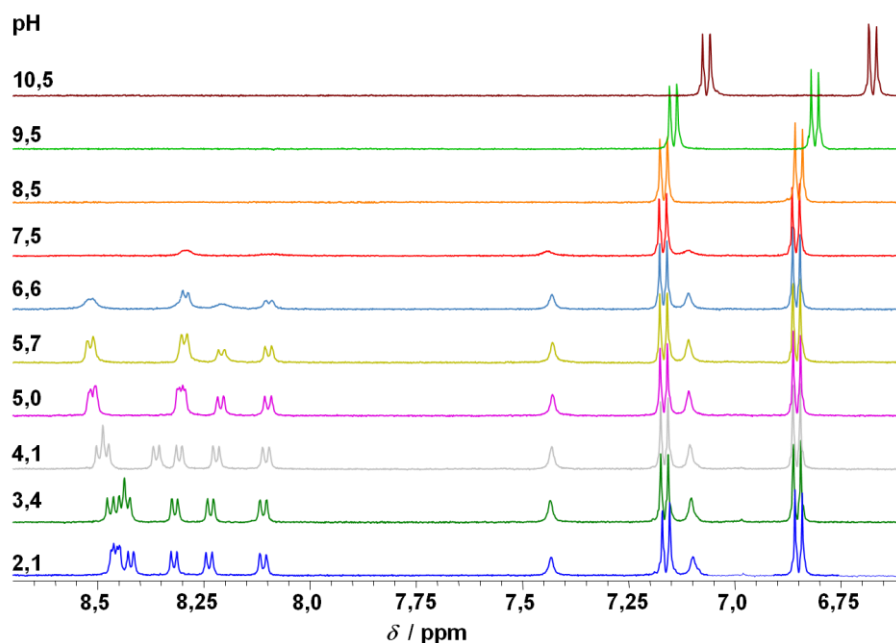
20. ábra: A DY peptid ^1H -NMR spektrumának kiválasztott tartománya pH~5,7
($T = 298\text{ K}$, $c_{\text{DY}} \sim 1,0 \times 10^{-3}\text{ M}$, 10/90 V/V% $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$)

A peptid deprotonálódási folyamatai ^1H -NMR spektroszkópiával kiválóan követhetők, amihez az aszparaginsav, a két cisztein és a tirozin oldalláncok C_βH_2 protonjainak jelei adják a legtöbb információt (19-20. ábrák). Ebből a szempontból a tirozin hidroxifenil-csoportja protonjainak aromás tartományban megjelenő rezonanciái is hasznosak lehetnek. Savas pH-tartományban az aszparaginsav C_βH_2 protonjainak jelei a pH növelésével párhuzamosan eltolódnak a kisebb ppm értékek felé a deprotonálódásuk hatására (21. ábra). Bázikus pH-tartományban a ciszteinek és tirozin oldallánci $-\text{SH}$, illetve $-\text{OH}$ csoportjai deprotonálódnak, amelynek eredménye a megfelelő C_βH_2 proton-rezonanciák és a tirozin C_δH és $\text{C}_\epsilon\text{H}$ jeleinek

eltolódása ugyancsak a nagyobb terek felé (21-22. ábrák). Meg kell jegyezni, hogy az említett protonok kémiai eltolódásait valamelyest befolyásolhatja a szomszédos aminosavak oldallánci funkcióscsoportjainak protonáltsági állapota is.

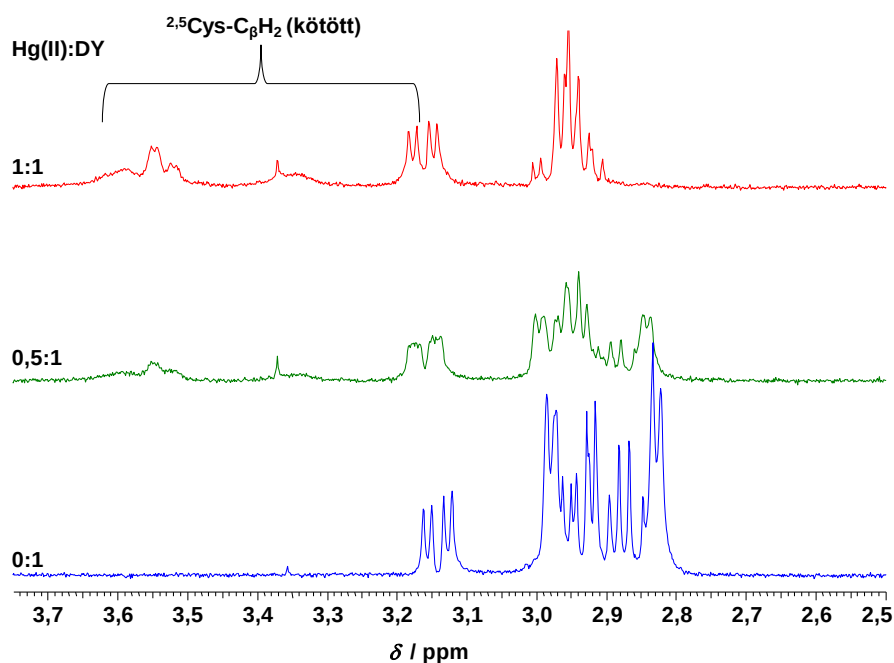


21. ábra: A DY peptid pH-függő ^1H -NMR spektrumainak “alifás” tartománya
($T = 298\text{ K}$, $c_{\text{DY}} \sim 1,0 \times 10^{-3}\text{ M}$, 10/90 V/V% $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$)



22. ábra: A DY peptid pH-függő ^1H -NMR spektrumainak “aromás” tartománya
($T = 298\text{ K}$, $c_{\text{DY}} \sim 1,0 \times 10^{-3}\text{ M}$, 10/90 V/V% $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$)

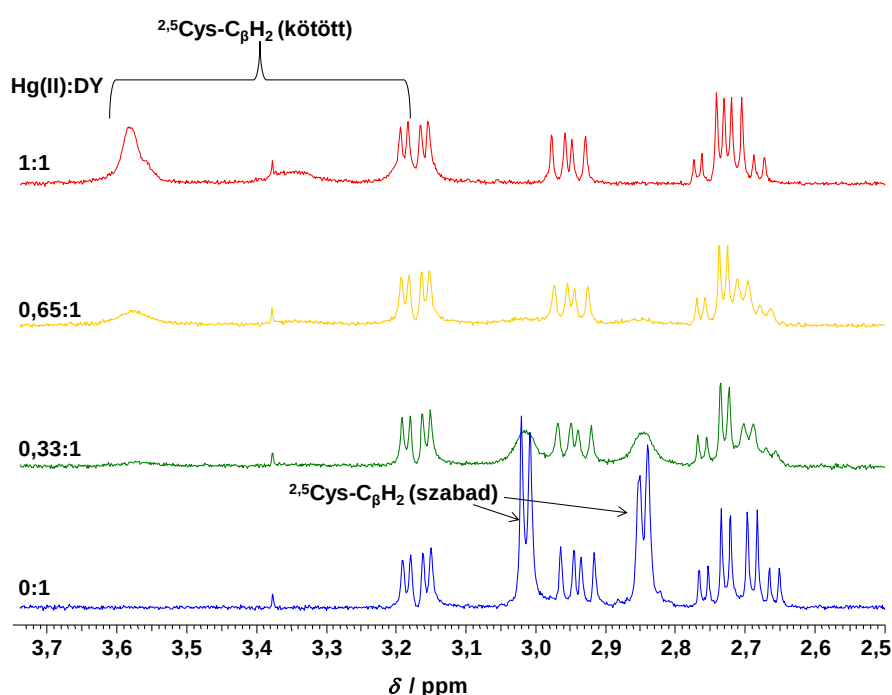
A fémiont is tartalmazó rendszerekben 0,5:1, illetve 1:1 fémion:ligandum arányok mellett felvett pH-függő ^1H -NMR spektrum sorozatokat az F1-F4. ábrákon (Függelék) mutatjuk be. A spektrumok értelmezése, és a szükséges információ kinyerése azonban könnyebb, ha nem ezeket elemezzük, hanem kiválasztott pH-értékeknél hasonlítjuk össze a különböző fémion : ligandum arányú minták NMR spektrumait a szabad liganduméval. Már 2-es pH-n megfigyelhető, hogy a fémion jelenlétében mért spektrumok szignifikánsan eltérnek a szabad ligandumétól (akár a 0,5:1, akár az 1:1 arányt elemezzük) (23. ábra). Ezzel szemben a tirozin aminosavhoz rendelhető rezonanciákat egy enyhe kiszélesedésen kívül nem befolyásolja a fémion jelenléte. A ciszteinek C_βH_2 protonjainak rezonanciái 1:1 arány mellett már egyáltalán nem figyelhetők meg $\delta \sim 2,8 - 3,0$ ppm között, azonban nagyobb kémiai eltolódásokkal ($\sim 3,2 - 3,7$ ppm között) új, széles jelek fejlődnek ki. Ezeket egyértelműen a fémionhoz kötött cisztein-tiolátok C_βH_2 protonjaihoz rendelhetjük. A 0,5:1 Hg(II):DY arány esetén mért spektrumon a szabad és kötött C_βH_2 -rezonanciák egyszerre láthatók, ami a ligandum (közepesen) lassú cseréjére utal a két állapot között. Hasonló jelenséget korábban már több ízben megfigyelt kutatócsoportunk két ciszteint tartalmazó oligopeptidek higany(II)ionokkal való kölcsönhatásának vizsgálatakor.^[31,32]



23. ábra: : A DY ^1H -NMR spektrumának részletei a Hg(II)-DY arány függvényében, pH $\sim 2,0$
($T = 298$ K, $c_{\text{DY}} \sim 1,0 \times 10^{-3}$ M, 10/90 V/V% $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$)

pH $\sim 5,7$ -nél egy részletesebb spektrumsorozatot vettünk fel a fém-ligandum arány változtatásával (24. ábra). A pH-t állandó értéken tartva fokozatosan adagoltuk a peptidhez a

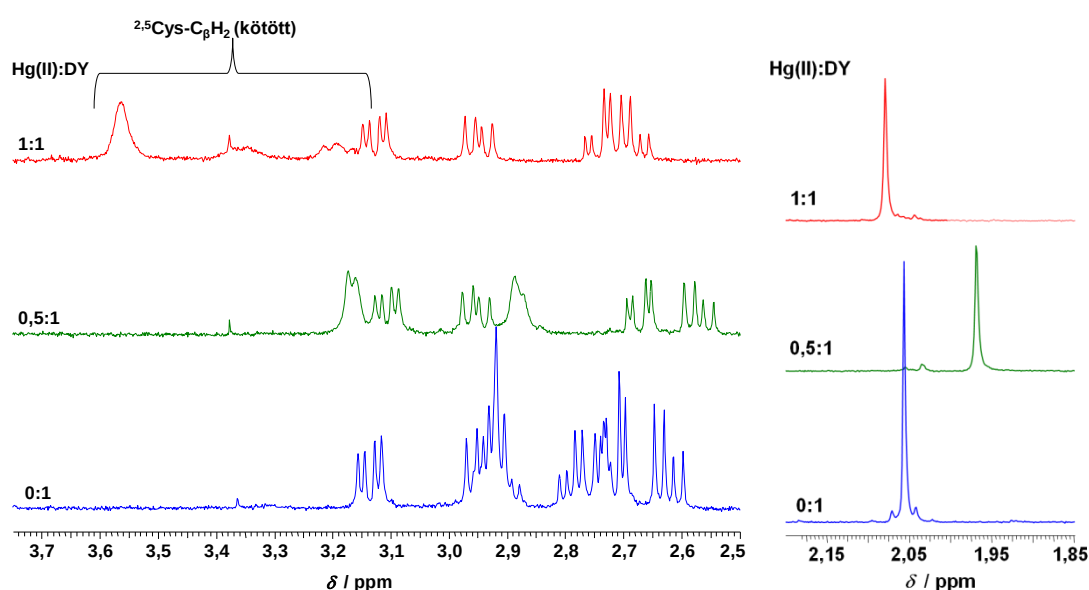
Hg(ClO₄)₂-oldatot. Az aszparaginsav és a tirozin aminosavak jelei enyhén kiszélesednek, de a legnagyobb változást a higany(II)ionok adagolásának hatására a ciszteinek jelein láthatjuk. A szabad ligandumra jellemző jelek fokozatosan eltűnnek, és nagyobb ppm értékeknél új jelek fejlődnek ki. Ez, a korábbiakhoz hasonlóan, azt sugallja, hogy lassú/közepesen lassú cserében lévő részecskék vannak jelenen a rendszerben. Ugyanakkor a kötött cisztein egységekben a fémion közelében lévő protonok rezonancia jeleinek szelektív kiszélesedését figyelhetjük meg.



24. ábra: : A DY ¹H-NMR spektrumának részlete a Hg(II)-DY arány függvényében, pH ~ 5,7
(T = 298 K, c_{DY} ~ 1,0×10⁻³ M, 10/90 V/V% D₂O/H₂O)

Lúgos pH tartományban több kiválasztott pH-n is összevetettük a spektrumokat (pH ~ 8,5, 9,5 és 10,5) (25. ábra és F5-6. ábrák), hiszen ebben a pH-tartományban feltételezzük bisz-komplexek képződését. Az UV-vizsgálatainkkal összhangban a ligandum felesleget tartalmazó minta spektrumai nem írhatók le a szabad és kötött forma jeleinek keverékeként. Ezt elvileg magyarázhatjuk azzal, hogy a cseresebesség nő abban a pH-tartományban, ahol a szabad ciszteinek deprotonálódnak. Ezt tapasztalta csoportunk néhány korábban vizsgált 12-tagú peptid higany(II) koordinációjának NMR-vizsgálatakor is.^[43,44] A másik lehetséges magyarázat, hogy bisz-komplexek vannak jelen a rendszerben. Az a tény, hogy a 0,5:1 Hg(II):DY rendszerben nem csak 1:1 összetételű komplex(ek) és a szabad ligandum van jelen a -CH₃ védőcsoport rezonanciáin látszik a legegyszerűbben. Ugyanis a védőcsoport

tartozó szingulet nem a szabad peptid, illetve a monokomplexben kötött ligandum jeleihez tartozó kémiai eltolódás értékek között, hanem mindkettőnél alacsonyabb ppm értéknél jelenik meg (lásd a 25. ábra jobb oldalán). Ez ugyan nem jelzi azt, hogy csak bisz-komplex van jelen a rendszerben ligandum felesleg esetén, de azt egyértelműen mutatja, hogy képződnek ilyen részecskék szignifikáns mennyiségben. Figyelembe kell venni, hogy a cseresebesség is változik a pH növelésével, ami szintén befolyásolhatja a rezonanciákat. A ligandum felesleg jelenlétében mért spektrumon az aszparaginsav jelei is kisebb ppm értékek felé tolódtak el a szabad ligandum és az 1:1 rendszer azonos jeleihez képest. A felgyorsult cseresebesség miatt a ciszteinek $C_\beta H_2$ -rezonanciái kiátlagolt jelek.



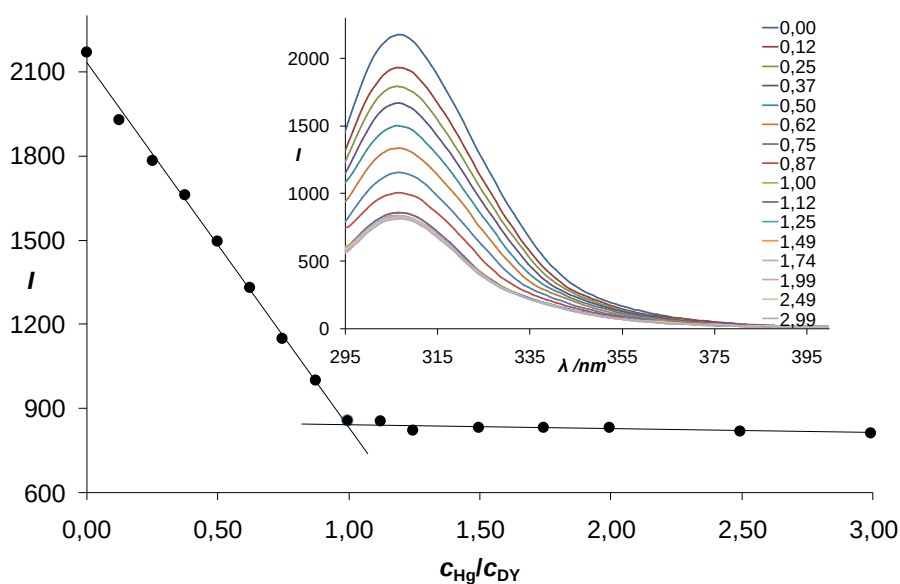
25. ábra: A DY 1H -NMR spektrumának részletei a Hg(II)-DY arány függvényében, pH $\sim 9,5$
($T = 298\text{ K}$, $c_{DY} \sim 1,0 \times 10^{-3}\text{ M}$, 10/90 V/V% D_2O/H_2O)

A Hg(II):DY 1:1 rendszerben a kötött ligandum aszparaginsav karboxil-csoportjának és a tirozin $-OH$ csoportjának deprotonálódása ugyanolyan pH-tartományban figyelhető, meg mint a szabad ligandum esetén (F3. ábra). Tehát a 1H -NMR spektrumok is azt bizonyítják, hogy ezek a csoportok nem koordinálnak a fémionhoz. A felvett spektrumsorozaton széles cisztein $C_\beta H_2$ -rezonanciák figyelhetők meg, a szabad ligandumhoz képest magasabb ppm értékeknél, ami a pH növekedésével nem változik szignifikánsan. Ennek alapján $\{HgS_2\}$ koordinációjú komplexek jelenléte feltételezhető a teljes vizsgált pH-tartományban.

V.4. Fluorimetriás mérések a higany(II) – DY rendszerben

A fluorimetriás mérésekkel azt tanulmányoztuk, hogy a higany(II)ionok koordinációja a ligandumhoz milyen módon befolyásolja annak fluoreszcenciáját, azaz kihasználható-e ez a hatás potenciálisan fémion-érzékelésre.

A mérések során két pH-n vizsgáltuk a Hg(II) : DY arány változásának hatását a ligandum fluoreszcenciájára. A DY törzsoldatából $c \sim 30 \mu\text{M}$ koncentrációjú $V = 3,0 \text{ cm}^3$ térfogatú mintát készítettünk, amelyhez folyamatosan adagoltuk a higany(II)ionok oldatát, úgy, hogy a Hg(II):DY arány 0:1 és 3:1 között változott. Minden mintának felvettük az UV-spektrumát is, hogy utólag a fluorimetriás spektrumok intenzitását a gerjesztési és elnyelési hullámhosszon mért abszorbanciával korrigálni tudjuk.^[45] Minden méréssorozatnál párhuzamos méréseket végeztünk, melyeket átlagoltuk, és ezeket az eredményeket ábrázoltuk illetve értékeltük ki.



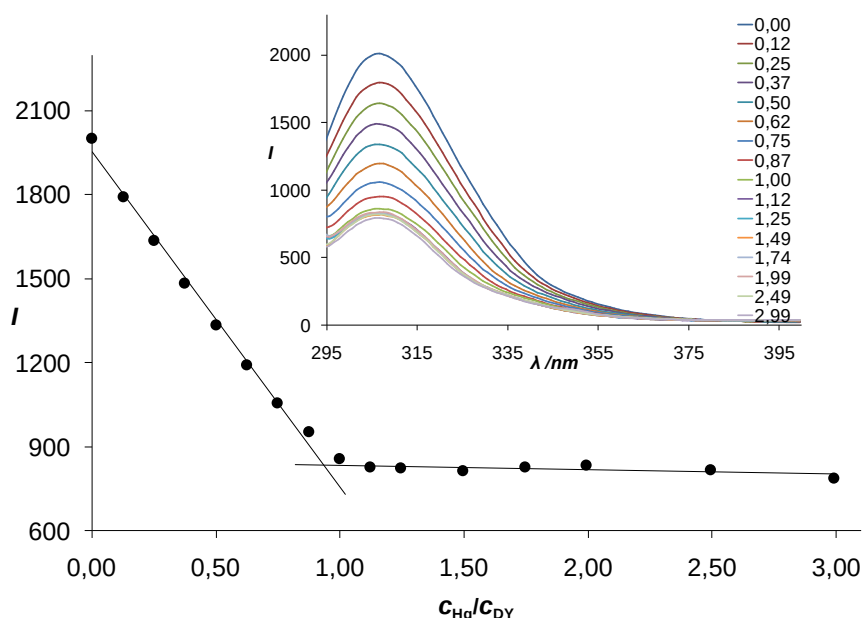
26. ábra: A DY 307 nm-en mért fluoreszcenciás intenzitása a higany(II) : DY arány függvényében pH = 2,0-nél.

Az inzerten a felvett spektrumsorozat látható.

($\lambda_{\text{ex}} = 278 \text{ nm}$, $c_{\text{DY}} \sim 30 \mu\text{M}$, $T = 298 \text{ K}$, $I = 0,1 \text{ M NaClO}_4$)

Az 2-es pH-n felvett sorozat esetében mind a minta, mind az adagolt fémion oldat pH-ja azonos volt, és kis ligandum koncentráció miatt a fémion-ligandum kölcsönhatásnak ezen a pH-n gyakorlatilag nincs mérhető pH-effektusa. Így nem volt szükség pH-állításra az egyes mérések között. A higany(II) koordinációja a tiolesoportokhoz kvencseli a szomszédos tirozin aminosav fluoreszcenciáját (26. ábra). Azaz, a szabad ligandumhoz higany(II)ionokat adagolva a szabad peptidre jellemző fluoreszcenciás intenzitás monoton módon csökken.

Azonban a Hg(II):DY 1:1 arány elérése után további fémion adagolás hatására nem csökken tovább az intenzitás. Ez összhangban van a korábbi fejezetekben leírt módszerekkel nyert eredményekkel, miszerint savas körülmények között egy higany(II)ion koordinálódik a ligandumhoz.

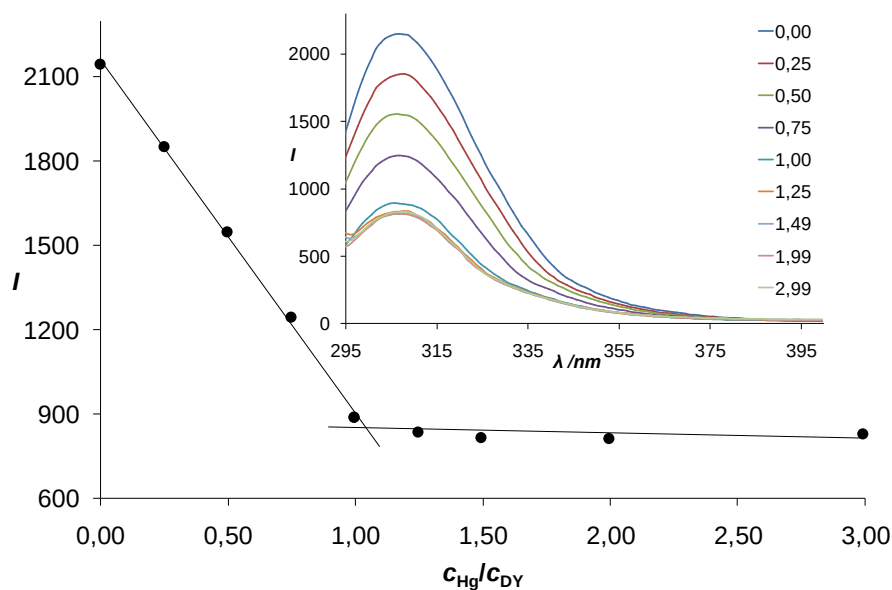


27. ábra: A DY 307 nm-en mért fluoreszcenciás intenzitása a higany(II) : DY arány függvényében pH = 6,0-nál.

Az inzerten a felvett spektrumsorozat látható.

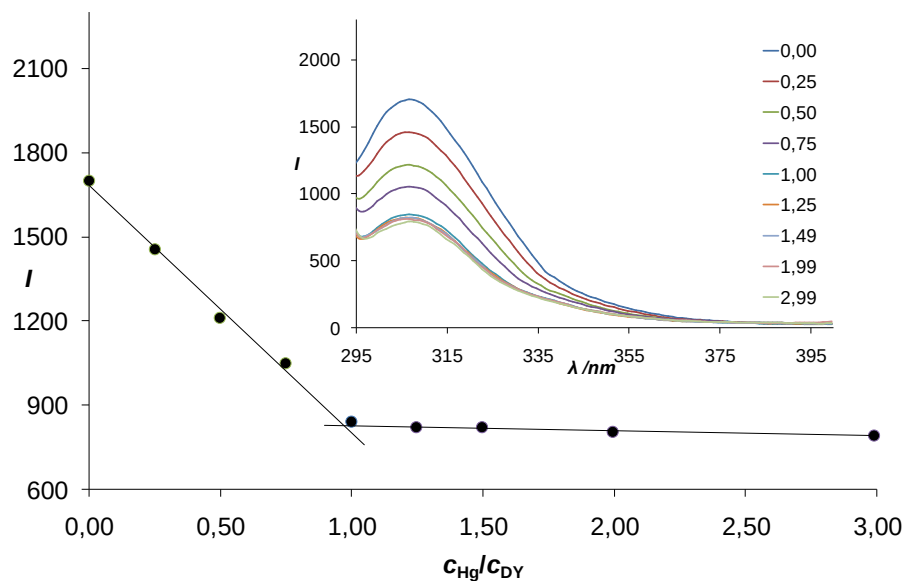
($\lambda_{ex} = 278$ nm, $c_{DY} \sim 30$ μ M, $T = 298$ K, $I = 0,1$ M NaClO₄)

A 6-os pH-n végzett kísérletsorozatnál a pH állandó értéken tartását NaOH-oldattal ($c \sim 0,01$ M) végeztem. Ugyanazt a jelenséget, azaz a fluoreszcenciás intenzitás monoton csökkenését látjuk, mint az alacsonyabb pH esetén (27. ábra), ami alátámasztja, hogy ilyen körülmények között sincs más összetételű (fémion-ligandum arányt tekintve) részecske jelen a rendszerben. A mért intenzitás értékek valamivel alacsonyabbak, mint a 2-es pH-n végzett kísérletnél, aminek az oka pl. az lehet, hogy a közeg pH-ja akár a karboxilcsoport protonáltsági állapotán, vagy a ligandum konformációján keresztül befolyásolja a tirozin fluoreszcenciáját.

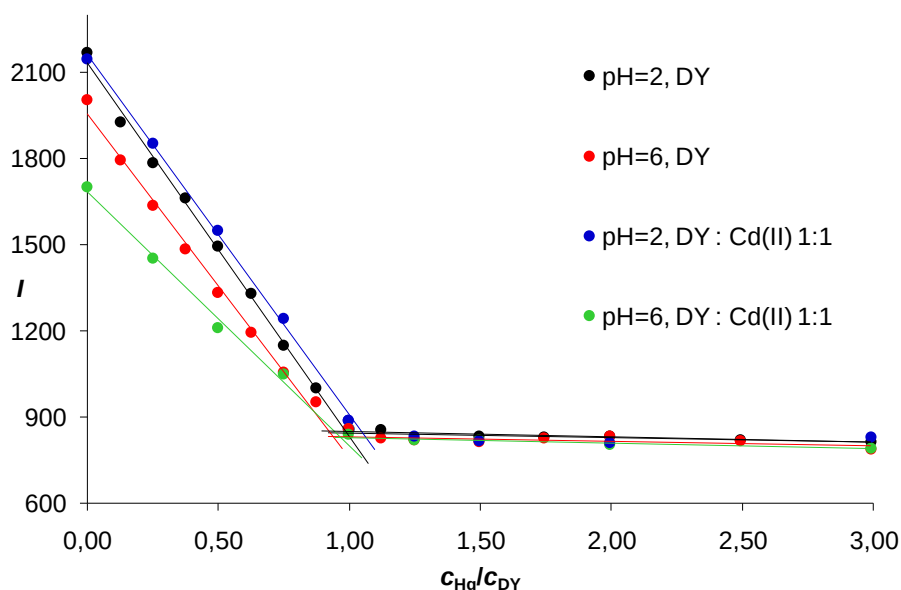


28. ábra: A DY 307 nm-en mért fluoreszcenciás intenzitása a kadmium(II) : DY 1:1 rendszerben a higany(II) : DY arány függvényében pH = 2,0-nél. Az inzerten a felvett spektrumsorozat látható.
 $(\lambda_{\text{ex}} = 278 \text{ nm}, c_{\text{DY}} \sim 30 \mu\text{M}, T = 298 \text{ K}, I = 0,1 \text{ M NaClO}_4)$

A fluoreszcencia Hg(II):DY aránytól való függését olyan oldatokban is tanulmányoztuk, ahol a minta kezdettől fogva a ligandummal ekvivalens mennyiségű kadmium(II)iont is tartalmazott. A 2-es pH-n végzett kísérletnél ugyanaz látható, mint a kadmium(II)ionok távollétében (28. ábra). Ennek magyarázata feltehetőleg az, hogy ilyen alacsony pH-n a kadmium(II)ionok nem kötődnek a peptidhez, így jelenlétük nem befolyásolja a higany(II)ionok koordinálódását. Egyéb két ciszteint tartalmazó oligopeptidek esetében a kadmium(II)ionok még nagyobb alkalmazott koncentrációk mellett is csak pH~3,5–4 felett koordinálódtak a ligandumokhoz.^[44,46] A méréssorozatot 6-os pH-n is elvégezve azt tapasztaljuk, hogy a kezdeti fluoreszcencia a savas mintához képest szignifikánsan eltérő (29. ábra). A kadmium(II) ezen a pH-n nagy valószínűséggel koordinálódik a ligandumhoz, azaz ebben az esetben nem egy egyszerűen a higany(II)ionok szabad peptidhez való koordinálódása történik, hanem a higany(II)ionok kiszorítják a kadmium(II)ionokat a Cd(II)-peptid komplexből. A DY:Hg(II) 1:1 arány elérése után a spektrum alakja ugyanolyan, mint az előző három esetben, azaz nincs jelen többmagvú komplex az oldatban (30. ábra).



29. ábra: A DY 307 nm-en mért fluoreszcenciás intenzitása a kadmium(II) : DY 1:1 rendszerben a higany(II) : DY arány függvényében pH = 6,0-nál. Az inzerten a felvett spektrumsorozat látható.
 ($\lambda_{\text{ex}} = 278 \text{ nm}$, $c_{\text{DY}} \sim 30 \mu\text{M}$, $T = 298 \text{ K}$, $I = 0,1 \text{ M NaClO}_4$)



30. ábra: A fluoreszcencia változása Hg(II) : DY arány függvényében kadmium(II)ionok jelen- és távollétében 307 nm-en két különböző pH-n ($c_{\text{DY}} \sim 30 \mu\text{M}$, $T = 298 \text{ K}$, $I = 0,1 \text{ M NaClO}_4$)

A Hg(II):DY rendszerben végzett fluoreszcenciás mérések megmutatták, hogy a ligandum potenciálisan alkalmas lehet analitikai alkalmazásra. A higany(II)ionok koordinálódása észlelhető és jól követhető változást eredményez a tirozin fluoreszcenciájában. A fémion koncentrációjával arányos jel-intenzitás csökkenést mérhetünk, de csak az 1:1 fémion-ligandum arány eléréséig.

V.5. DY-NTG rendszer higany(II)-kötő sajátosságának jellemzése

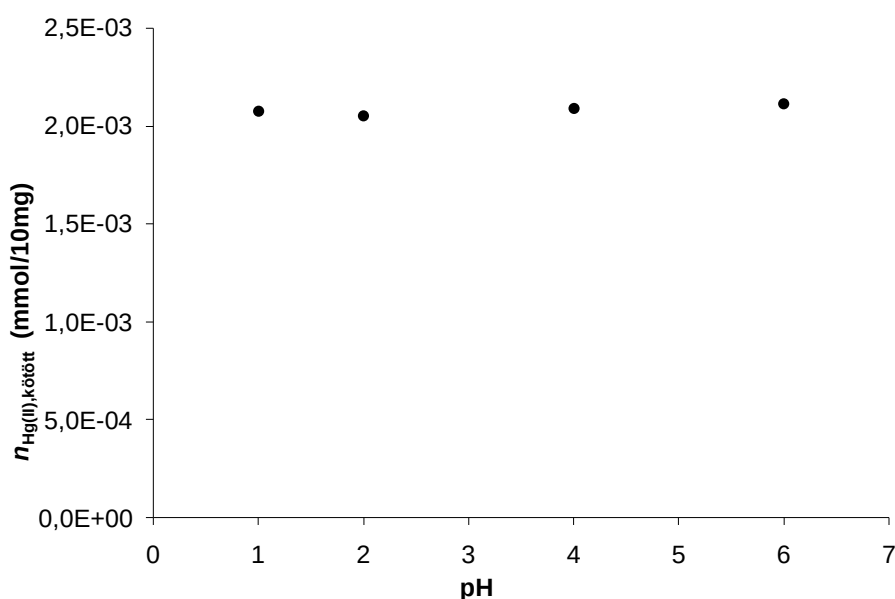
A DY hexapeptid fémion-megkötő sajátosságait egy hidrofíl karakterű gyantán rögzített formában (DY-NTG) is vizsgáltuk. A DY-NTG rendszer elméleti kapacitására, peptidenként 1 ekvivalens fémion megkötődését feltételezve, 0,227 mmol/g értéket számoltunk (tömegre vonatkoztatva 45,53 mg/g) (lásd IV.7.).

Az immobilizált peptid Hg(II)-kötő képességét az érintkezési idő, az alkalmazott pH ill. Hg(II) koncentráció (azaz, a fémion-peptid arány) függvényében tanulmányoztuk. Referenciaként elkészítettünk egy olyan hordozót is, amelynek aminocsoportjait acetileztük, így peptidláncot nem tartalmazott (Ac-NTG). A mérések többségénél alkalmazott savas körülmények között (pH = 2,0) megvizsgáltuk, hogy az Ac-NTG referencia milyen mértékben képes csökkenteni a higany(II)ionokat tartalmazó minták fémion-koncentrációját. Amennyiben a referencia elméleti fémion-kötő képességének 1 ekvivalens fémiont tekintünk Ac-NH-csoportonként, akkor ez 0,267 mmol/g (53,56 mg/g) kapacitásnak felel meg. A kísérletekhez 10,00 cm³ térfogatú higany(II)oldatokat használtunk, melyek az acetilezett aminocsoportok számához viszonyítva 150%-nyi mennyiségű fémiont tartalmaztak. Öt párhuzamos mérés alapján az Ac-NTG ezen mintákból a mérések hibahatárát már meghaladó mennyiségű higany(II)iont kötött meg, amelyből a referencia kapacitására 0,0354 mmol/g (7,10 mg/g) érték számolható, amely a fenti elméleti kapacitás ~13 %-a. A meghatározott kapacitás érték alapján feltételezhető, hogy kis mennyiségű higany(II)ion valamilyen gyenge kölcsönhatással képes kötődni a polimer mátrixhoz, pl. a PEG láncokhoz, ez a kölcsönhatás azonban nagy valószínűséggel nem játszik szerepet a DY peptiddel funkcionizált gyanta higany(II)-kötésében.

A DY-NTG-vel végzett kísérletsorozatok esetében rendszerint két párhuzamos mérést végeztünk, a mérési pontok közötti eltérés pedig minden esetben $\leq 10\%$. Ez alól kivétel a higany(II)-kötés pH-függésének vizsgálata, ahol a pH = 2,0-nél nyert adat alapján nem lett volna értelme több gyantát elhasználni a kísérletekhez.

Az immobilizált peptid Hg(II)-kötésének részletesebb tanulmányozásához szükségünk volt a megfelelő kontaktidő meghatározására, ami adott körülmények mellett a maximális higany(II)-megkötés eléréséhez szükséges időt jelenti. Ehhez ~10,0 mg gyantára 10,0 cm³ 2-es pH-jú különböző koncentrációjú HgCl₂ oldatokat mértünk, melyek koncentrációit oly módon állítottuk be, hogy a mintákban levő Hg(II) anyagmennyisége az elméleti fémion-kötő kapacitásra vonatkoztatva 150%, 200% ill. 300% legyen (150%: $c = 3,405 \times 10^{-4}$ M). A fémion feleslegre azért volt szükség, hogy a vizsgált oldatok az érintkeztetés után is jól mérhető koncentrációban tartalmazzanak higany(II)-ionokat. A kimért gyanta adagokat 15,

30, 45, 60, 120, 180 és 300 percig érintkeztettük a fémionok oldataival. Az elméleti kapacitáshoz képest 33, 66 és 100%-nak megfelelő higany(II) koncentráció jelenlétében is végeztünk kísérleteket 60 és 120 perc várakozási időket alkalmazva. Az ICP-MS mérésekkel visszamért Hg(II) koncentrációk elemzésével megállapítottuk, hogy 1:1 fémion : ligandum arányig 60 perc után már nem változik a mintákban maradó Hg(II) mennyisége (próbamérések alapján minden bizonnyal rövidebb érintkeztetési idő is megfelelő lehet). A rögzített peptidhez viszonyított fémion-felesleg esetén azonban 120 perc szükséges, hogy az adott koncentrációra (fémion-peptid aránya) jellemző Hg(II)-megkötődést elérjük. Így a további kísérleteknél 120 perc kontaktidőt alkalmaztunk.

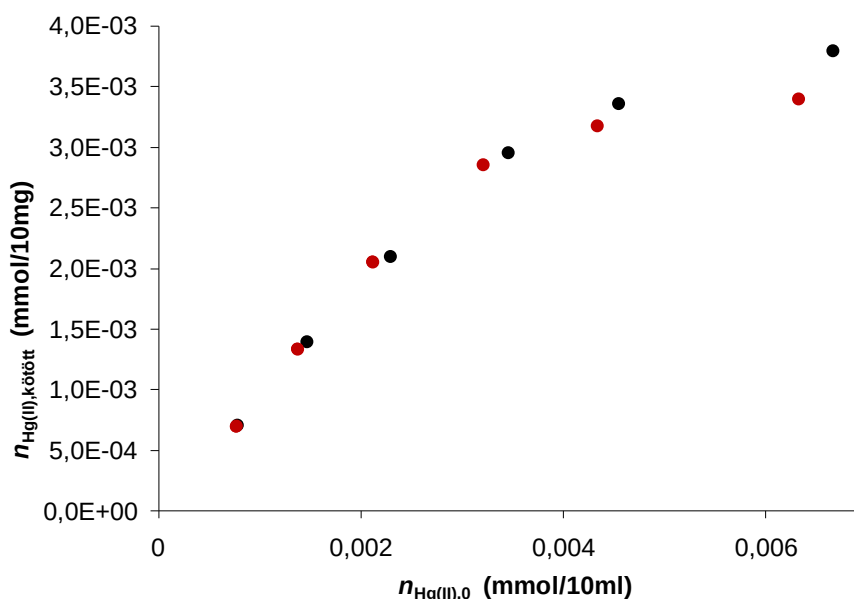


31. ábra: A pH változtatásának hatása a megkötött Hg(II) anyagmennyiségére
 $(m(\text{DY-NTG}) = 10,0 \text{ mg}, c_{\text{Hg(II)}} = 2,27 \times 10^{-4} \text{ M}, V = 10,0 \text{ cm}^3)$

A pH-függő oldatsorozat elkészítésekor az eddigi protokollt követve 10,0 mg gyantát és 10,0 cm³ HgCl₂ oldatot használtunk egy-egy minta összeállításához. A minták az elméleti kapacitás (0,227 mmol/g) 100%-ának megfelelő koncentrációban ($2,270 \times 10^{-4} \text{ M}$) tartalmaztak fémiont. Az oldatok pH-ít 1,0 – 6,0 között változtattuk. A higany(II)ionok már egészen savas pH-n (pH = 1; 2,0) képesek megkötődni az immobilizált peptiden (31. ábra), ahogy ezt az oldatban végzett vizsgálatoknál is tapasztaltuk, s a mért értékek a pH növelésével sem változnak. Ez nem meglepő, hiszen az egyes oldatok ICP-MS-sel visszamért koncentrációi alapján a DY-NTG a bemért Hg(II)-mennyiség $\geq 95 \%$ -át képes megkötni, amennyiben a fémiont 1 ekvivalenst nem meghaladó mennyiségben adagoljuk ($n_{\text{Hg(II)}, \text{kötött}} \sim 2,08 \times 10^{-3} \text{ mmol/10mg}$ gyanta; $n_{\text{Hg(II)}, \text{bemért}} \sim 2,15 \times 10^{-3} \text{ mmol/10mg}$ gyanta) (31. ábra).

A higany(II) koncentráció hatásának vizsgálatakor is pH = 2,0-n végeztük a méréseket Hg(II) : DY-NTG 1 : 3 és 3 : 1 arányok között, melyeket a gyanta elméleti kapacitására (0,227 mmol/g) vonatkoztatva határoztunk meg.

Az ICP-MS mérések eredményeit ábrázolva megfigyelhető, hogy a kiindulási fémion koncentráció függvényében a megkötött higany(II) anyagmennyisége egy telítési jellegű görbét ad (32. ábra). Érdekes azt is észrevenni, hogy az egy ekvivalensnek megfelelő fémion mennyiségig ($\sim 2,2 \times 10^{-3}$ mmol/10ml) a pontokra meglehetősen jó illeszkedéssel az origóból kiinduló egyenest illeszthetnénk. (A kis számú mérési pont miatt ezeket az egyeneseket nem jelöltük az ábrán.) Azaz, $\sim 1 : 1$ Hg(II) : DY-NTG arányig a rögzített peptid a minták Hg(II)-tartalmának ~ 95 %-át megköti, ami 0,207 mmol/g (41,63 mg/g) kapacitást jelent. A fémion koncentrációt növelve, azaz a bemért DY-NTG peptid tartalmához viszonyított Hg(II)-felesleg jelenlétében a megkötött fémion anyagmennyisége tovább nő, azonban a görbe telítésbe hajlik. Ez további, kisebb affinitású kötőhelyek jelenlétét feltételezi a DY-NTG-n. Oldatbeli vizsgálataink eredményei azt mutatták, hogy a ligandum nem képes egynél több fémion koordinálására, azaz a DY-NTG esetében a második fémion megkötődése egyértelműen a peptid rögzítéséből, ill. a rögzített molekulák közelségéből fakadó új tulajdonság. Érdekes azt is megjegyezni, hogy a második fémion feltehetőleg nehezebben megközelíthető koordinációs helyre kötődik, vagy a koordinációja kinetikailag lassú szerkezetváltozás révén játszódik le. Erre utal ugyanis az a tény, hogy 1:1 Hg(II):DY-NTG arány felett az egyensúly eléréséhez több időre van szükség, mint kisebb koncentrációknál. Az eredmények egyértelműen azt tükrözik, hogy a DY-NTG képes a higany(II)ionok hatékony megkötésére már egészen savas körülmények között is, és az elméleti kapacitásnál kisebb mennyiségű fémiont tartalmazó mintákból a fémion-megkötés lineárisan növekszik az alkalmazott koncentrációval.



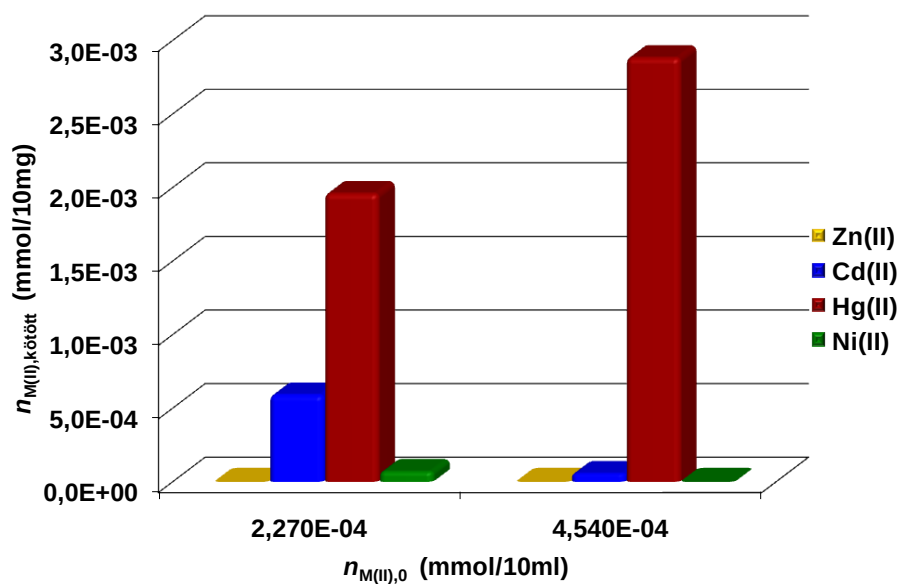
32. ábra: A higany(II) koncentráció változtatásának hatása a megkötött fémion anyagmennyiségére. A fekete és bordó szimbólumok két párhuzamos mérésorozat mérési pontjai.

($m(\text{DY-NTG}) = 10,0 \text{ mg}$, $\text{pH} \sim 2,0$, $V = 10,0 \text{ cm}^3$)

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy különböző fémionokat egyzerre tartalmazó oldat alkalmazásával milyen mértékű fémion-szelektivitást mutat a gyanta. Az alkalmazott oldatok négy fémiont (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) tartalmaztak. A mérésorozatok során az oldatok pH-ít ~ 6 -ra állítottuk MES puffer segítségével, hiszen a kutatócsoportunkban korábban végzett vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a higany(II)-vel ellentétben a többi fémion nem képes nagyon savas közegben a peptidhez koordinálódni. A fémionokat a gyanta elméleti kapacitásához viszonyítva közel azonos, mindegyik fémionra nézve egy ekvivalensnyi, illetve két ekvivalensnyi koncentrációban alkalmaztuk.

Az eredményeket értékelve megállapítható, hogy ha a DY-NTG-hez képest a minta 1-1 ekvivalens mennyiségben tartalmazza a négy fémiont, a higany(II)-tartalom több, mint 90 %-a megkötődik (33. ábra). Emellett azonban csak a kadmium(II)ionok kis mennyisége (~ 24 %-a) képes koordinálódni az immobilizált ligandumhoz, a másik két fémion koncentrációja gyakorlatilag változatlan marad a vizsgált mintákban. A jelenség hasonló a peptidhez képest feleslegben higany(II)iont tartalmazó mintáknál tapasztaltakhoz (lásd 32. ábra), hiszen az immobilizált peptid ebben az esetben is képes egy ekvivalensnél több fémion megkötésére. Csoportunkban korábban már tanulmányozták a DY-NTG kölcsönhatását kadmium(II)ionokkal és megállapították, hogy két ekvivalens fémion megkötődése is lehetséges fémion felesleg alkalmazásakor.^[47] A négy fémionból két-két ekvivalensnyi mennyiséget tartalmazó oldatokban a Ni(II) és a Zn(II) mellett a Cd(II) koncentráció sem változik a gyantával való érintkeztetés során, azonban Hg(II)-ből, összhangban a koncentráció

függésnél tapasztaltakkal, több mint egy ekvivalens képes kötődni az immobilizált ligandumhoz.



33. ábra: A megkötött Hg(II)-, Cd(II)-, Ni(II)-, Zn(II)- anyagmennyiség az alkalmazott fémionok koncentrációjának függvényében. A feltüntetett koncentrációk a minták fémionjaira külön-külön vonatkoznak.

($m(\text{DY-NTG}) = 10,0 \text{ mg}$, $\text{pH} = 6,0$, $c_1 = 2,27 \times 10^{-4} \text{ M}$, $c_2 = 4,54 \times 10^{-4} \text{ M}$)

V. Összefoglalás

Diákköri munkámban az Ac-Asp-Cys-Ser-Ser-Cys-Tyr-NH₂ (DY) peptid higany(II)ionokkal való kölcsönhatását tanulmányoztuk vizes oldatban. Eredményeim szerint kiemelkedő stabilitású monokomplexek már savas pH-tartományban képződnek. Bázikus körülmények között ligandum felesleg jelenlétében bisz-komplexek alakulnak ki, s a domináns részecskében a két ligandum {HgS₄} típusú koordinációval, (torzult) tetraéderes geometriát kialakítva kötődik a fémionhoz. Fluorimetriás vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a fémion kötődése 1:1 fémion : ligandum arányig jelentős mértékben kioltja a ligandum tirozin aminosavjának fluoreszcenciáját, mely érték felett az intenzitás tovább már nem változik számottevően. Noha a fluoreszcencia-erősítés potenciális analitikai alkalmazás szempontjából kedvezőbb lenne, a megfigyelt koncentráció-arányos fluoreszcencia csökkenés is alkalmassá teheti a rendszert higany(II)ionok detektálására. Kedvező, hogy a kioltás Hg(II) adagolásának hatására akkor is hasonló módon megtörténik, ha az oldat a peptidre nézve ekvivalens mennyiségű kadmium(II)ionot is tartalmaz. Ez Cd(II)→Hg(II) cserére utal a ligandumon. A gyanta hordozón rögzített peptid már 2-es pH-n is hatékonyan képes megkötni a higany(II)ionokat, s ez a megkötődés 1:1 Hg(II):DY arányig lineáris trendet követ. A Hg(II) mellett további három fémiont (Cd(II), Ni(II) és Zn(II)) tartalmazó oldatokból is kizárólag a Hg(II) képes koordinálódni az immobilizált peptidhez, amennyiben a gyanta elméleti kapacitásához képest a Hg(II) feleslegben van. Egy-egy ekvivalensnyi fémiont tartalmazó oldatokból a Hg(II) mellett kis mennyiségben a Cd(II) is képes megkötődni.

A rendszer potenciális fémion érzékelőként való alkalmazásának szempontjából kedvezőtlennek tűnik az oldatbeli vizsgálatoknál tapasztalt bisz-komplex képződés, illetve a második ekvivalens fémion koordinálódása az immobilizált peptidhez. Mivel a bisz-komplex képződés csak semleges pH felett jellemző, így a jelenség a pH helyes megválasztásával kiküszöbölhető. A peptid érzékelőként való alkalmazásakor az immobilizáció az analitikai jelet továbbítani képes felületen kell, hogy történjen (üveg, kvarc), ahol a borítottság (ligandum-sűrűség) jóval kisebb, mint a vizsgált gyanta esetében. Ezek a körülmények feltehetőleg közelebb állnak az oldatbeli vizsgálatokéhoz, azaz nem feltétlenül képes egy ilyen hordozón rögzített ligandumhoz is egy második fémion koordinálódni. Eredményeink alapján a DY ligandum egy alkalmas próbamolekulának tekinthető peptid alapú, fémion-érzkelő rendszerek fejlesztéséhez.

VI. Irodalomjegyzék

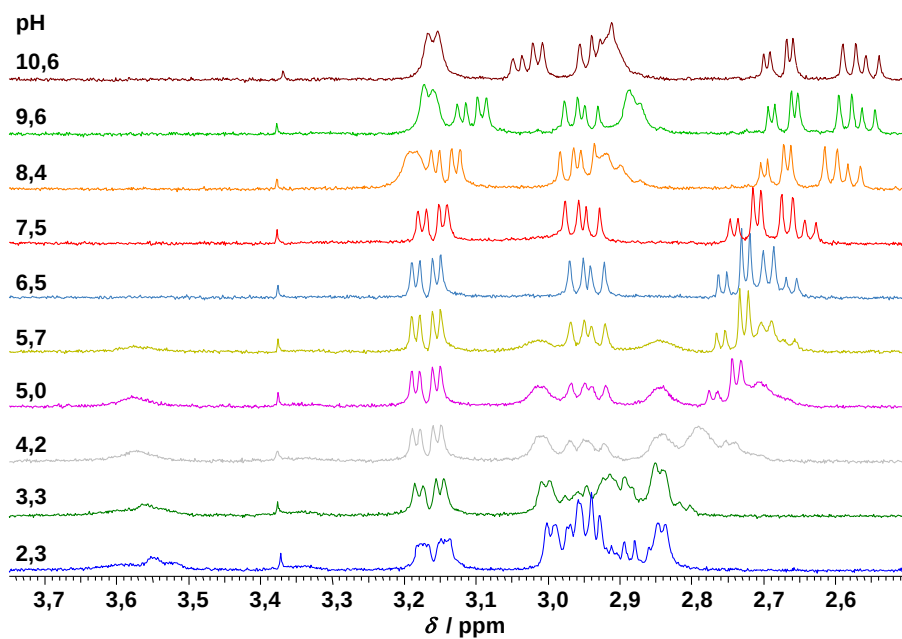
- [1] J.K. Schaefer, J. Letowski, T. Barkay, *mer-Mediated Resistance and Volatilization of Hg(II) Under Anaerobic Conditions*, Geomicrobiol. J. 19 (2002) 87-102.
- [2] K. A. Graeme Md, M. D. F. C. V. Pollack Jr, *Heavy Metal Toxicity, Part I: Arsenic and Mercury*, Journal of Emergency Medicine, 16(1) (1998) 45-56.
- [3] J.M. Pacyna, K. Sundseth, J. Munthe, K. Kindbom, S. Wilson, *Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020*, Atmospheric Environment 44 (2010) 2487–2499.
- [4] L. Patrick, *Mercury Toxicity and Antioxidants: Part I: Role of Glutathione and alpha-Lipoic Acid in the Treatment of Mercury Toxicity*, Altern. Med. Rev. 7(6) (2002) 456-471.
- [5] R. A. Bernhoft, *Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature*, Journal of Environmental and Public Health, 10 (2011).
- [6] N. Romero-Isart, M. Vasak, *Advances in the structure and chemistry of metallothioneins*, J. Inorg. Biochem. 88 (2002) 388–396.
- [7] Blindauer, M.D. Harrison, J.A. Parkinson, A.K. Robinson, J.S. Cavet, N.J. Robinson, P.J. Sadler, *A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity*, PNAS, 98 (2001) 9593-9598.
- [8] A. Leiva-Presa, M. Capdevila, P. González-Duarte, *Mercury(II) binding to metallothioneins Variables governing the formation and structural features of the mammalian Hg-MT species*, Eur. J. Biochem. 271 (2004) 4872–4880.
- [9] M. Vasak, D. W. Hasler, *Metallothioneins: new functional and structural insights*, Curr. Opin. Chem. Biol. 4 (2000) 177–183.
- [10] M.J. Stillman, *Metallothioneins*, Coord. Chem. Rev. 144 (1995) 461-511.
- [11] R.A. Steele, S.J. Opella, *Structures of the Reduced and Mercury-Bound Forms of MerP, the Periplasmic Protein from the Bacterial Mercury Detoxification System*, Biochemistry 36 (1997) 6885-6895.
- [12] T. Barkay, S. M. Miller, A. O. Summers, *Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems*, FEMS Microbiology Reviews 27 (2003) 355-384.
- [13] L. Banci, I. Bertini, S. Ciofi-Baffoni, X.-C. Su, R. Miras, N. Bal, E. Mintz, P. Catty, J.E. Shokes, R.A. Scott, *Structural Basis for Metal Binding Specificity: the N-terminal Cadmium Binding Domain of the P1-type ATPase CadA*, J. Mol. Biol. 356 (2006) 638-650

- [14] J.R. Forbes, G. His, D.W. Cox, *Role of the copper-binding domain in the copper transporter function of ATP7B, the P-type ATPase defective in Wilson disease*, J. Biol. Chem. 274 (1999), 12408-12413.
- [15] A.C. Rosenzweig, *Metallochaperones: Bind and Deliver*, Chemistry & Biology 9 (2002) 673-677.
- [16] S. Pires, J. Habjanic, M. Sezer, C. M. Soares, L. Hemmingsen, O. Iranzo, *Design of a peptidic turn with high affinity for Hg(II)*, Inorg. Chem. 51 (2012) 11339-11348.
- [17] J. R. Forbes, G. His, D. W. Cox, *Role of the Copper-binding Domain in the Copper Transport Function of ATP7B, the P-type ATPase Defective in Wilson Disease*, J. Biol. Chem., 274 (1999) 12408-12413.
- [18] N. L. Brown, J. V. Stoyanov, S. P. Kidd, J. L. Hobman, *The MerR family of transcriptional regulators*, FEMS Microbiol. Rev., 27 (2003) 145-163.
- [19] S. Silver, Le T. Phung, *A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32 (2005) 587–605.
- [20] R. Ledwidge, B. Patel, A. Dong, D. Fiedler, M. Falkowski, J. Zelikova, A. O. Summers, E. F. Pai, S. M. Miller, *NmerA, the Metal Binding Domain of Mercuric Ion Reductase, Removes Hg²⁺ from Proteins, Delivers It to the Catalytic Core, and Protects Cells under Glutathione-Depleted Conditions*, Biochem. 44 (2005) 11402-11416.
- [21] W.E. Van der Linden, C. Beers, *Determination of the composition and the stability constants of complexes of mercury(II) with amino acids*, Anal. Chim. Acta, 68 (1973) 143-154.
- [22] R. L. Coates, M. M. Jones, *Stability constants of the Hg²⁺-BAL complexes*, J. Inorg. nucl. Chem. 39 (1997) 677-678.
- [23] V. Magafa, G. Stavropoulos, P. Tsiveriotis, N. Hadjiliadis, *Interaction of Hg(II) with tetrapeptides containing cysteinyl and histidiny residues*, Inorg. Chim. Acta 272 (1998) 7-17.
- [24] H. Adachi, N. Ueyama, A. Nakamura, *¹⁹⁹Hg NMR investigation on the solution structure of Hg(II) complexes of oligopeptides containing cysteine and histidine residues*, Inorg. Chim. Acta 198-200 (1992) 805-811.
- [25] M. Ngu-Schwemlein, J. K. Merle, P. Healy, S. Schwemlein, S. Rhodas, *Thermodynamics of the complexation of Hg(II) by cysteinyl peptide ligands using isothermal titration calorimetry*, Thermochimica Acta, 496 (2009) 129-135.
- [26] X. Lin, J. Brooks, M- Bronson, M. Ngu-Schwemlein, *Evaluation of the association of mercury(II) with some dicysteiny peptides*, Bioorganic Chemistry, 44 (2012) 8-18.

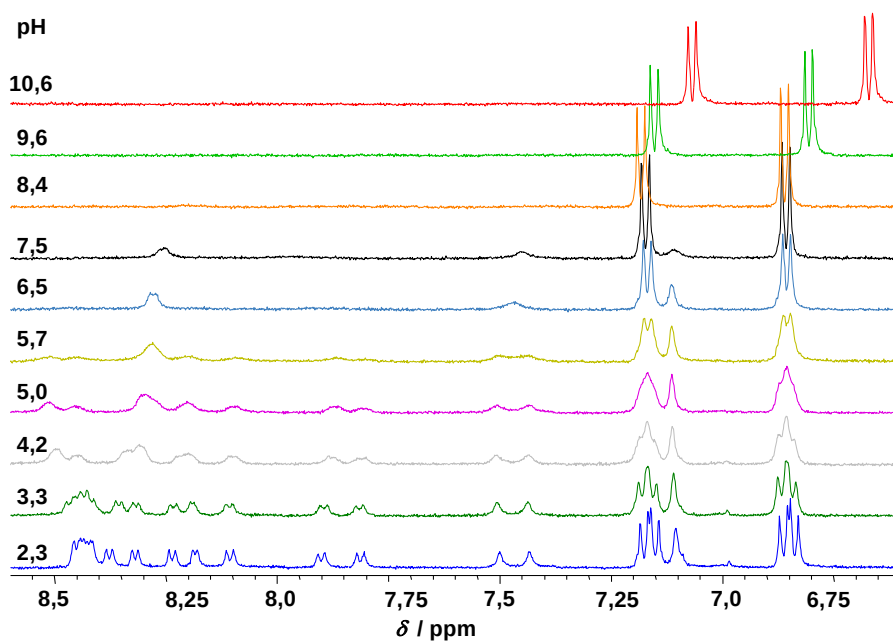
- [27] N. Verma, M. Singh, *Biosensors for heavy metals*, *Biometals* 15 (2005) 121-129.
- [28] L. Malachowski, J. L. Stair, J. A. Holcombe, *Immobilized peptides/amino acids on solid supports for metal remediation*, *Pure Appl. Chem.*, 76 (2004) 777-787.
- [29] S. Cherian, R. K. Gupta, B. C. Mullin, T. Thundat, *Detection of heavy metal ions using protein-functionalized microcantilever sensors*, *Biosensors and Bioelectronics* 19 (2003) 411-416.
- [30] I. Bontidean, C. Berggren, G. Johansson, E. Csoregi, B. Mattiasson, J. R. Lloyd, K. J. Jakeman, N. L. Brown, *Detection of Heavy Metal Ions at Femtomolar Levels Using Protein-Based Biosensors*, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4162-4169.
- [31] A. González-Bellavista, S. Atrian, M. Muñoz, M. Capdevila, E. Fábregas, *Novel potentiometric sensors based on polysulfone immobilized metallothioneins as metal-ionophores*, *Talanta*, 77 (2009) 1528-1533.
- [32] B. R. White, H. M. Liljestrand, J. A. Holcombe, *A 'turn-on' FRET peptide sensor based on the mercury binding protein MerP*, *The Royal Society of Chemistry*, 133 (2008) 65-70.
- [33] E. Kaiser, R. L. Colson, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides*, *Anal. Biochem.* 34 (1970) 595-598.
- [34] Burger K., *Az analitikai kémia alapjai*, Semmelweis Kiadó, Gyula, 1999.
- [35] A. M. Pujol, C. Lebrun, C. Gateau, A. Manceau, P. Delangle, *Mercury-Sequestering Pseudopeptides with a Tris(cysteine) Environment in Water*, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2012) 3835-3843.
- [36] Zárny Gy., *Az elemanalitika korszerű módszerei*, Akadémiai Kiadó Budapest, 2006.
- [37] S. Pires, J. Habjanic, M. Sezer, C. M. Soares, L. Hammingsen, O. Iranzo, *Design of a Peptidic Turn with High Affinity for Hg^{II}*, *Inorg. Chem.* 51 (2012) 11339-11348.
- [38] F. Jalilehvand, B. O. Leung, M. Izadifard, E. Damian, *Mercury(II) Cysteine Complexes in Alkaline Aqueous Solution*, *Inorg. Chem.* 45 (2006) 66-73.
- [39] E. R. Holiday, *Spectrophotometry of proteins, Absorption spectra of tyrosine, tryptophan and their mixtures. II. Estimation of tyrosine and tryptophan in proteins*, *Biochem J.* 30 (1936) 1795-1803.
- [40] P. Rousselot-Pailley, O. Seneque, C. Lebrun, S. Crouzy, D. Boturyn, P. Dumy, M. Ferrand, P. Delangle, *Model Peptides Based on the Binding Loop of the Copper Metallochaperone Atx1: Selectivity of the Consensus Sequence MxCxxC for Metal Ions Hg(II), Cu(I), Cd(II), Pb(II), and Zn(II)*, *Inorg. Chem.* 45 (2006) 5510-5520.

- [41] M. Łuczowski, M. Stachura, V. Schirf, B. Demeler, L. Hemmingsen, V.L. Pecoraro, *Design of Thiolate Rich Metal Binding Sites within a Peptidic Framework*, Inorg. Chem. 47 (2008) 10875-10888.
- [42] P. Faller, B. Ctortecka, W. Tröger, T. Butz, ISOLDE Collaboration, M. Vasak, *Optical and TDPAC Spectroscopy of Hg(II)-rubredoxin: model for a mononuclear tetrahedral $[Hg(CysS)_4]^{2-}$ center*, JBIC 5 (2000) 393-401.
- [43] D. Szunyogh, B. Gyurcsik, F.H. Larsen, P.W. Thulstrup, M. Stachura, L. Hemmingsen, A. Jancsó, *Metal ion governed structural diversity of a loop-motif dodecapeptide*, közlemény előkészületben (2014).
- [44] A. Jancsó, D. Szunyogh, A. Angyal, B. Gyurcsik, L. Szekeres, L. Hemmingsen, M. Stachura, P.W. Thulstrup, *Cadmium(II) and mercury(II) binding of a dodecapeptide inspired by the metal binding domain of CueR metalloregulatory proteins*, közlemény előkészületben (2014).
- [45] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Ed.*, Springer, New York (2006) p. 56.
- [46] A. Jancsó, D. Szunyogh, F.H. Larsen, P.W. Thulstrup, N.J. Christensen, B. Gyurcsik, L. Hemmingsen, *Towards the role of metal ions in the structural variability of proteins: Cd^{II} speciation of a metal ion binding loop motif*, Metallomics 3 (2011) 1331-1339.
- [47] A. Jancsó, nem publikált eredmények.

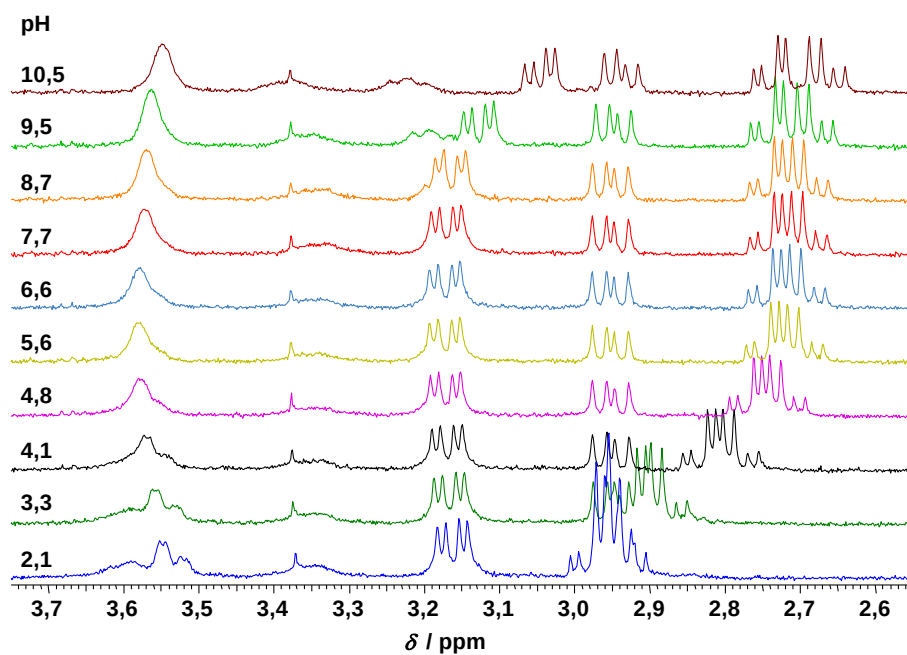
VII. Függelék



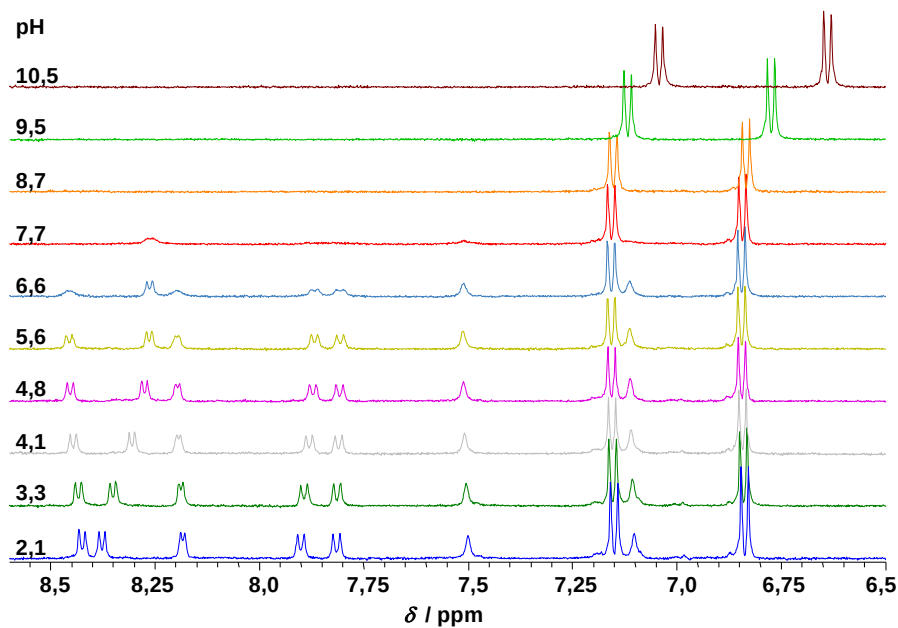
F1. ábra: A Hg(II) : DY 0,5:1 rendszer pH-függő ^1H -NMR spektrumainak “alifás” tartománya
($T = 298\text{ K}$, $c_{\text{DY}} \sim 1,0 \times 10^{-3}\text{ M}$, 10/90 V/V% $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$)



F2. ábra: A Hg(II) : DY 0,5:1 rendszer pH-függő ^1H -NMR spektrumainak “aromás” tartománya
($T = 298\text{ K}$, $c_{\text{DY}} \sim 1,0 \times 10^{-3}\text{ M}$, 10/90 V/V% $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$)

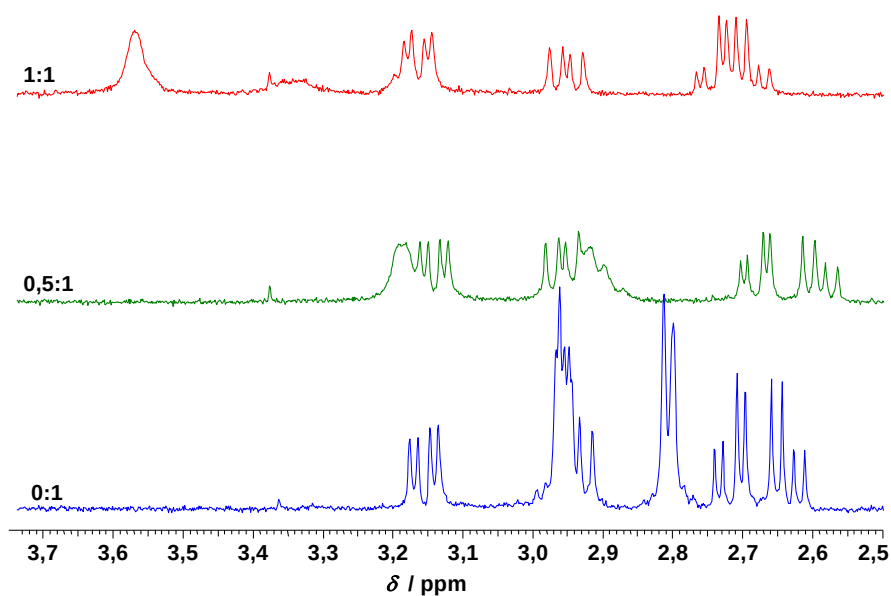


F3. ábra: A Hg(II) : DY 1:1 rendszer pH-függő ^1H -NMR spektrumainak “alifás” tartománya
($T = 298\text{ K}$, $c_{\text{DY}} \sim 1,0 \times 10^{-3}\text{ M}$, 10/90 V/V% $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$)



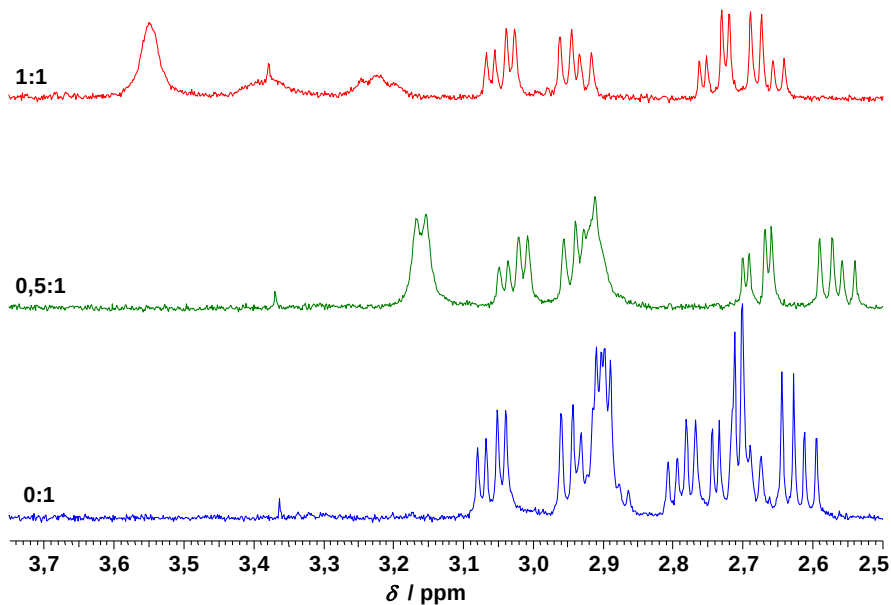
F4. ábra: A Hg(II) : DY 1:1 rendszer pH-függő ^1H -NMR spektrumainak “aromás” tartománya
($T = 298\text{ K}$, $c_{\text{DY}} \sim 1,0 \times 10^{-3}\text{ M}$, 10/90 V/V% $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$)

Hg(II):DY



F5. ábra: : A DY ^1H -NMR spektrumának részlete a Hg(II)-DY arány függvényében, pH $\sim 8,5$
 ($T = 298\text{ K}$, $c_{\text{DY}} \sim 1,0 \times 10^{-3}\text{ M}$, 10/90 V/V% $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$)

Hg(II):DY



F6. ábra: : A DY ^1H -NMR spektrumának részlete a Hg(II)-DY arány függvényében, pH $\sim 10,5$
 ($T = 298\text{ K}$, $c_{\text{DY}} \sim 1,0 \times 10^{-3}\text{ M}$, 10/90 V/V% $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$)

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Jancsó Attilának, témavezetőmnek, a kísérleti munka és az eredmények kiértékelése során nyújtott sok segítségéért.

Köszönettel tartozom Szekeres Levente PhD hallgatónak, aki a műszeres vizsgálatok kivitelezésekor segítette munkámat.

Ugyancsak hálás vagyok Dr. Galbács Gábor tanszékvezető egyetemi docensnek és Kálomista Ildikó PhD hallgatónak, akik az ICP-MS készüléken mintáinkat megmérték, és hasznos tanácsokkal láttak el az újabb minta-sorozatok megtervezésekor.

Köszönöm továbbá Családomnak, Szigeti Györgynek, Edzőmnek, Csapattársaimnak és Barátaimnak a folyamatos segítségüket és biztatásukat.