

Az oldalláncok hatása a két hisztidint tartalmazó tetrapeptidek komplexbépződési tulajdonságaira



TDK dolgozat

Készítette:

Takács Gergely

IV. éves Vegyészmérnök BSc hallgató

Témavezető:

Dr. Várnagy Katalin

Egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS TECHNOLÓGIAI KAR
SZERVETLEN ÉS ANALITIKAI KÉMIAI TANSZÉK

2014

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	1
2.	Irodalmi áttekintés.....	2
2.1	A Cu(II)-ion élettani szerepe	2
2.2	A Ni(II), Cd(II)- és Zn(II)-ion élettani szerepe	3
2.3	A Cu(II)-ion lehetséges koordinációs módjai.....	4
2.3.1	Terminálisan nem védett HisAla ₂ His peptid.....	4
2.3.2	Terminálisan védett peptidek	6
3.	Kísérleti körülmények.....	8
3.1	pH-potenciometria	8
3.2	UV-látható spektrofotometria.....	9
3.3	Cirkuláris Dikroizmus (CD)-spektroszkópia.....	10
3.4	¹ H-NMR spektroszkópia.....	10
3.5	Tömegspektrometria	11
3.6	Használt vegyszerek	11
4.	Peptidszintézis.....	13
5.	Kísérleti eredmények és kiértékelésük.....	16
5.1	Protonálódási állandók.....	16
5.2	A ligandumok réz(II)-komplexei.....	17
5.3	A ligandumok nikkel(II)-komplexei.....	21
5.3.1	pH-potenciometriás mérések.....	21
5.3.2	CD-spektroszkópiás mérések	25
5.4	A ligandumok cink(II)- és kadmium(II)-komplexei.....	26
6.	Összefoglalás.....	31
7.	Summary	32
8.	Felhasznált irodalom	33

1. Bevezetés

Régóta ismert, hogy bizonyos elemek jelenléte nélkülözhetetlen az emberi szervezet számára. A nyomelemek kis mennyiségük ellenére nagyon fontos szerepet töltenek be. Ilyen elem például a réz, mely a redoxifolyamatok katalizálásán kívül több folyamatban is szerepet játszik. Az emberi szervezetben a réz(II)-ion leggyakrabban fehérjéhez kötött állapotban található meg. Az ilyen fehérjéket metalloproteineknek, illetve metalloenzimeknek nevezzük. A fémion a fehérjéket felépítő aminosavak oldalláncain keresztül kapcsolódik a szerves molekulákhoz. Az egyik legfontosabb kapcsolódási hely a hisztidin oldalláncában megtalálható imidazol donorcsoport. A fehérjékhez való kötődést kisebb tagszámú, különböző aminosavakat tartalmazó peptidekkel modellezhetjük, amelyekkel így lehetőség nyílik a kötődési hely tanulmányozására.

A fémion-protein kölcsönhatások megértéséhez hozzájárulnak azok a vizsgálatok, amelyekben a különböző oldalláncokat tartalmazó peptidek átmenetifémionokkal alkotott komplexeit tanulmányozzák. A Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában évek óta kiterjedt kutatások folynak a különböző peptidek átmenetifémion komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálatával kapcsolatban. A Tanszék automata peptidszintetizáló készülékével lehetőség nyílt két vagy több hisztidint tartalmazó peptidek szisztematikusan tervezett sorozatának az előállítására.

Ebbe a kutatási munkába kapcsolódtam be. A célom a C-terminálisan védett His-Ala-Ala-His-NH₂ szekvenciájú tetrapeptid szintetizálása és átmenetifémionokkal alkotott komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata volt. A kapott eredményeket összehasonlítottam a tanszéken már korábban vizsgált hasonló szerkezetű peptidek fémkomplexeivel.

2. Irodalmi áttekintés¹⁻²

2.1 A Cu(II)-ion élettani szerepe³

A réz élő szervezetben betöltött helye pótolhatatlan. A növényvilágban a fotoszintetikus folyamatokban vesz részt, mint elektronszállító. A puhatestű és ízeltlábú állatok esetén az oxigénszállító festékanyag, a hemocianin részét képezi. Az emberi szervezetben is nagyon sokféle, egymástól különböző feladatokat lát el, annak ellenére, hogy csak kis mennyiségben található meg benne. Számos redoxi folyamat katalizálásáért felelős, de részt vesz a csontképződésben, a légzési láncban, segíti a vas felszívódását és beépülését. Nélkülözhetetlen a gyógyulási folyamatokhoz, a sejtek energiatermeléséhez és az ízérzékeléshez is.

Egy felnőtt szervezet átlagos réztartalma 80-120 mg közé eső érték. A szervezetünkben előforduló réz mennyiségének csupán 1%-át, azaz 1 mg-ot kell naponta pótolnunk. Napi 10-15 mg a megengedett beviteli érték, ettől nagyobb mennyiség esetén a rézmérgezés tünetei jelennek meg.

A réz a bélben és a gyomorban szívódik fel aktív transzport révén, a membránon való áthaladásban a Cu-ATP-áz enzimek segítik. Ezután a véráramba kerül az albuminnal alkotott komplex formájában. A májba érve Cu(II)-ion formába alakul redoxi folyamatok során, majd a ceruloplazminhoz kötődve tárolódik.

A rézion fehérjékhez kapcsolódva, metalloenzimekben és metalloproteinekben fordul elő, legnagyobb mennyiségben a májban, vesében, izmokban és az agyban található meg.

Az emberi szervezetben a rézion hiánya komoly problémákhoz vezethet. Ezt több tényező is okozhatja, például az alultápláltság, amikor az elfogyasztott ételek réztartalma nem fedezi a napi szükségletet. Bizonyos fémek nagy mennyiségben gátolhatják is a réz felszívódását, tárolását, ilyen fém a vas, a cink és a kadmium. De a réz felszívódását gátolhatja a felvételéhez szükséges réztranszport fehérjék hiánya is, mely betegséget Menkes-kórnak nevezünk. Ebben az esetben a rézion nem tud átjutni a bél falán, így feldúsul a bélben és a vesében, és nem kerül a véráramba. A rézion fontos szerepe, hogy segíti a csontképződést, a kalcium és a foszfor beépülését a csontokba. Dr. Robert O. Becker által publikált felfedezés alapján a réz(II)-ion a kollagén rostokhoz kapcsolódik.⁴ Rézhiány esetén ez a kötődés nem valósulhat meg, ami csontritkuláshoz vezet. Megfelelő rézion mennyiség nélkül a légzési láncban betöltött feladatát sem képes ellátni a citokróm-c oxidáz, így nem tudja a molekuláris oxigén redukcióját katalizálni, és jelentős oxigénhasznosítási problémákat okoz. A vas beépülését is segíti az oxigén szállításáért felelős hemoglobinba. A rézion felelős

az agyi idegsejteket körülvevő myelin hüvely termeléséért is. Hiány esetén pótolni kell a rézion mennyiségét, Menkes-kór esetén ezt megfelelő rézvegyület intravénás beadásával is elérhetjük.

A túlzott mértékű rézbevitel is káros lehet. A napi 10-15 mg-ot meghaladó réz felvétele esetén a rézmérgezés tünetei jelennek meg; ezek a máj- és idegrendszeri károsodások, a hasmenés, a hányás és az izomfájdalmak. Ilyen nagy mennyiség bevitele történhet rézedényben tárolt ételek fogyasztása által, melyekbe beoldódott a réz, de leginkább nagy rézfelhalmozódás a Wilson-kór esetén alakul ki. A májban a rézmegkötő szerepet betöltő ceruloplazmin hiánya folytán a rézion a máj- és az agyszövetekbe rakódik le. Súlyos agyi rendellenességet, elbutulást és májkárosodást okoz. A betegség kelátterápiával orvosolható, mely esetben a D-penicillamin szervezetbe juttatása során megkötí a fémiont. A szervezetből való kimosásra megfelelő a diglicil-hisztidin peptid, mely a megkötött fémiont a vizelettel együtt távolítja el.

2.2 A Ni(II)-, Cd(II)- és Zn(II)-ion élettani szerepe^{5,6}

A nikkelon élő szervezetben betöltött szerepe sokáig ismeretlen volt. Az 1960-as évek elején kezdték el vizsgálni, amikor felfedezték, hogy a rézionhoz hasonlóan képes a fehérjékhez kötődni. A hisztidin oldalláncában megtalálható imidazolnitrogén a nikkelon számára is fontos kötőhely. Létfontossága eddig nincs bizonyítva, csak kevés enzimben található meg. Nagyon kis mennyiségre van belőle szükség, mely nagy környezeti koncentrációja és hatékony felszívódásának köszönhetően könnyen pótolható.

A kadmiumion a többi vizsgált fémiontól eltérően az emberre mérgező, vegyületei karcinogén hatásúak. Többféleképpen is a szervezetbe kerülhet, eltérő hatást okozva. Kadmium tartalmú por belégzésével nem jelennek meg azonnal tünetek. A lappangási időt követően viszont légzési gondokat, zavarokat okoz. Ezzel szemben, ha táplálékkal juttatjuk a szervezetbe, akkor azonnal hasfájás, hasmenés és hányás tünetei jelentkeznek. A kadmium a bélben szívódik fel és véráram útján jut el a májba és a vesébe. Felhalmozódásával roncsolja a szerveket. A szervezet védekezéséppen egy ciszteinben gazdag fehérjét termel, mellyel a kadmiumion komplexet képezve megkötődik.

A cinkion a rézionnál is nagyobb mennyiségben található meg fehérjéhez kötődve az emberi szervezetben. Létfontosságú ion, mely változatos feladatot lát el. A 3d pálya zárt elektronrendszere miatt redoxi reakciókban nem vesz részt. Legfőképp szerkezetalkító és

enzimaktivátor szerepet tölt be. A legtöbb ételben megtalálható, így kiegyensúlyozott táplálkozással fedezhető a napi szükséglet.

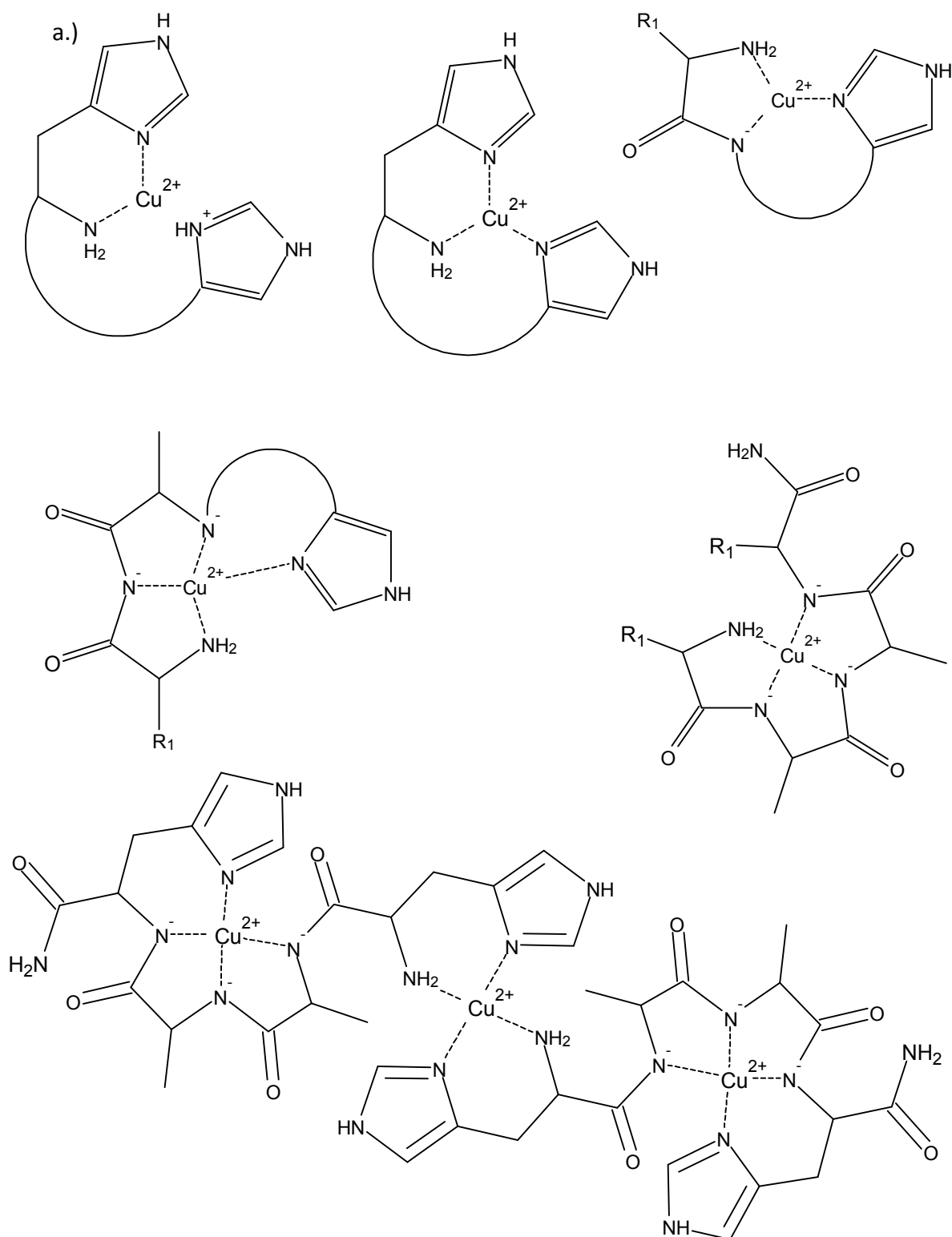
2.3 A Cu(II)-ion lehetséges koordinációs módjai

2.3.1 Terminálisan nem védett HisAla₂His peptid

Tudományos diákköri munkámat a HAAH peptid réz(II)-komplexeinek vizsgálatával kezdtem, amelyből tudományos diákkör dolgozatot is készítettem. Ezen vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a Cu(II)-ion savas tartományban az N-terminális hisztidinnel és az aminocsoporttal alakít ki hatos kelátgyűrűt, melyet hisztaminszerű koordinációnak nevezünk (1.a ábra). Majd 4-es pH-tól kezdődően a C-terminális imidazolnitrogén is deprotonálódik és kötődik a fémionhoz. Ez a szerkezet elég stabilis ahhoz, hogy az amidnitrogének deprotonálódási folyamatát nagyobb pH tartományba tolja. Biszkomplex létrejöttét is feltételezzük, melyben egy fémionhoz két ligandum kötődik hisztaminszerű koordinációval, és az egyik ligandum C-terminális imidazolnitrogénje is koordinálódik. Többféle izomer szerkezet is kialakulhat ennél a komplexnél. Legnagyobb valószínűséggel az egyik ligandum C-terminális imidazolnitrogénje kötődik a fémionhoz, de nem kizárt azt egyik amidnitrogén koordinálódása sem.

A pH emelésével az amidnitrogének deprotonálódási folyamata kezdődött el. Az első két amidnitrogén közel egy lépésben deprotonálódik és koordinálódik a Cu(II)-ionhoz, kialakítva a $[\text{CuAH}_1]^+$ és $[\text{CuAH}_2]$ komplexeket (1.c, d ábra). A harmadik amidnitrogén koordinálódásával létrejött $[\text{CuAH}_3]^-$ komplex (1.e ábra) a lúgos pH tartományban alakul ki. Az első két esetben a réz(II)-ion koordinációs szférája nem telített, így a C-terminális imidazolnitrogén koordinációja is feltételezhető. Ez három deprotonálódott amidnitrogénnél már nem valósulhat meg.

A potenciometriás mérések alapján többmagvú komplex létrejöttét feltételezzük fémfelesleg jelenlétében. Az UV-látható- és CD-spektroszkópiás mérések ennek a komplexnek a képződését alátámasztották. A feltételezett szerkezetben a fémionok hisztaminszerű, illetve (N^- , N^- , $\text{N}^- \text{Im}(\text{N})$) koordinációval kötődnek a molekulákhoz (2.d ábra).



1. ábra: A vizsgált rendszerben a lehetséges koordinációs módok sematikus rajza:

a.) $[\text{CuAH}]^{3+}$, b.) $[\text{CuA}]^{2+}$, c.) $[\text{CuAH}_1]^{+}$, d.) $[\text{CuAH}_2]$, e.) $[\text{CuAH}_3]^{-}$, f.) $[\text{Cu}_3\text{A}_2\text{H}_6]$

2.3.2 Terminálisan védett peptidek

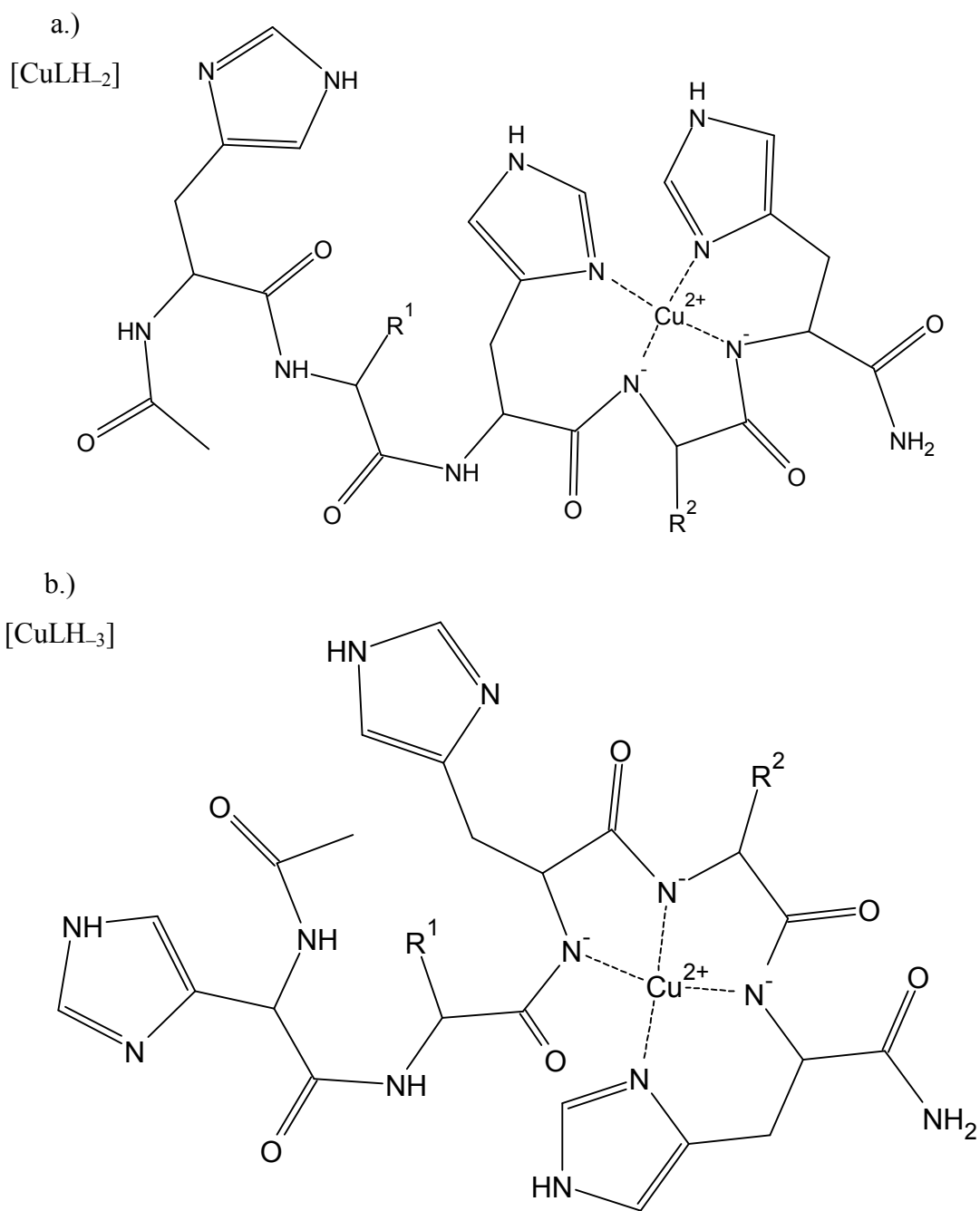
Terminálisan védett peptidek esetén az N-terminális aminoscsoport és a C-terminális karboxilcsoport is olyan védőcsoporttal van ellátva, melyek nem vesznek részt a komplexképződési folyamatokban. Ezek a peptidek jobban modellezik a különböző fehérjék aktív centrumait, hiszen a szervezetben a fémion általában az oldalláncokon keresztül tud kötődni hozzájuk. A tanszéken már széleskörűen tanulmányozták a multihisztidin peptideket, többek között a több hisztidint tartalmazó pentapeptidek sorozatát, melyek általános képlete $\text{Ac-His-Xaa-His-Yaa-His-NH}_2$.⁷ Ehhez hasonló peptidrészlet található meg az Alzheimer-kór kialakulásáért felelős amyloid prekursor fehérjében is.

A több hisztidin jelenléte változatos komplexek kialakulására ad lehetőséget. Savas tartományban a réz(II)-ion az imidazol nitrogénekhez kötődik. Megállapították, hogy a kialakuló komplexek akkor a legstabilisabbak, ha a hisztidineket egy aminosav választja el egymástól. Ekkor a makrokelátok kialakulása eltolja az amidnitrogén deprotonálódását a nagyobb pH tartományba, de nem akadályozza meg azt.⁸

Fiziológiás pH-tartományban két amidnitrogén és két imidazolnitrogén kötődik a fémionhoz. Többféle koordinációs izomer alakulhat ki, de a mérések során megállapították, hogy a C-terminális részen kedvezőbb a fémion kötődése (2.a ábra).

A pH további emelésével egy harmadik amidnitrogén is koordinálódik a fémionhoz. Ez a kötődés $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N})]$ módon valósulhat meg (2.b ábra). Fémion felesleg esetén lehetőség van többmagvú komplexek kialakulására is.

Ha a molekulában lévő hisztidinek nagyobb távolságra helyezkednek el egymástól, akkor általánosan jellemző, hogy az egyes hisztidin aminosavak független kötőhelyet jelentenek a fémion számára, így a molekula annyi fémion megkötésére képes, ahány hisztidint tartalmaz a szekvencia.⁹



2. ábra: Védett, multihisztidin tartalmú peptidek lehetséges komplexei: a.) A fiziológiás pH tartományban kialakuló [CuLH₂] komplex, b.) A lúgos tartományban kialakuló [CuLH₃] komplex sematikus szerkezete.

3. Kísérleti körülmények

3.1 pH-potenciometria¹⁰

A pH-potenciometria az oldatok hidrogénion koncentrációjának meghatározására szolgál elektródpotenciál különbség mérésével. Ezt a módszert alkalmaztam a ligandum protonálódási állandóinak és a különböző réz(II)-komplexek összetételének és stabilitási állandóinak meghatározására. A titrálásokat MOLSPIN pH-meter automata titrátorral végeztem, melyhez MOL-AcS gyártmányú buretta és kombinált üvegelektrod kapcsolódott. Az adagolás 1 ml végtérfogatú Hamilton fecskendővel történt.

Az elektródot (Metrohm 6.0234.100) 0,050 mol/dm³ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldattal (melynek pH-ja 25 °C-on 4,005) kalibráltam.

A mérések során kb. 0,2 mol/dm³, pontosan ismert koncentrációjú karbonátmentes KOH titrálóoldattal dolgoztam.

A méréshez szükséges állandó hőmérsékletet ultratermosztát segítségével biztosítottam, az oxigén kizárását argon gáz áramoltatásával, az oldat kevertetését pedig mágneses keverővel oldottam meg.

Az általam vizsgált rendszereket vizes oldatban, 3 és 4 cm³-es mintákban tanulmányoztam.

A ligandumok teljes kezdeti koncentrációja 1,5-2·10⁻³ mol/dm³ volt. A pH-potenciometriás mérések segítségével és a titrálási görbe ekvivalencia pontjai alapján meghatároztam a ligandumok pontos koncentrációját. A minták fémion-ligandum aránya 1:2-2:1 között változott. A kiértékeléshez használt program a titrálások során fellépő térfogatváltozást figyelembe vette.

Az oldatok állandó ionerősségét KCl hozzáadásával biztosítottam, úgy hogy a mintákban 0,2 mol/dm³ legyen a koncentrációja. Ez lehetővé tette, hogy a titrálások során az ionerősség változása ne legyen hatással a elektródpotenciál különbségének mérésére.

Számítógépes programmal végeztem a potenciometriás mérések eredményeinek értékelését. A SUPERQUAD¹¹ nevű programmal számoltam ki a ligandum koncentrációját és protonálódási állandóit, a PSEQUAD¹² programmal pedig a különböző fémkomplexek (M_pA_qH_r) stabilitási állandóit (logβ) (1, 2 egyenlet). A fentebb említett PSEQUAD program Zékány László és Nagypál István által kifejlesztett program. Mindkét program megadja a protonkomplexek, illetve a fémkomplexek összetett stabilitási állandójának logaritmusát:

komplekképződési tulajdonságaira



$$\beta_{pqr} = \frac{[M_pH_qL_r]}{[M]^p[H]^q[L]^r} \quad (2)$$

A program fontos tulajdonsága, hogy képes ugyanazon rendszer különböző fémion-ligandum arányánál vagy koncentrációjánál kapott mérési adatait párhuzamosan kiértékelni. A különböző lépcsőzetes folyamatok eredőjéből adódik a β_{pqr} , így további lehetőség nyílik a lépcsőzetes egyensúlyokra vonatkozó állandók képzésére.

3.2 UV-látható spektrofotometria¹³

A spektrofotométer olyan optikai berendezés, mely a monokromatikus fény intenzitását és annak változását képes mérni.

A spektrofotometriás vizsgálatokat réz(II)-komplekx esetén 250-900 nm hullámhossz tartományban végeztem el. A spektrumokat különböző fémion-ligandum arányoknál vettem fel 1 cm-es kvarc küvettában a pH függvényében. A spektrális vizsgálatokat Perkin Elmer Instruments Lambda 25 UV/VIS kétsugaras spektrofotométeren és Hewlett Packard HP 8453 típusú egysugaras fotométeren végeztem..

A kapott spektrumok elemzésével következtetni tudunk a képződő komplekxek szerkezetére, geometriájára, a koordinálódó donoratomok számára és kémiai jellegére.

A réz(II)-komplekxek előzetes vizsgálatai alapján rengeteg irodalmi előzmény áll rendelkezésre. Ennek ellenére mégsem lehet egyértelmű következtetést levonni a koordinációs módok sokfélesége és a sok befolyásoló tényező miatt.

A réz(II)-komplekxek tetragonálisan torzult, oktaéderes szerkezetűek, melyekben a lehetséges átmenetek egyetlen összeolvadt sávként jelennek meg. A különböző komplekx intenzitása és energiája függ a réz(II)-ionhoz koordinálódott donoratomok számától és minőségétől. Az abszorpciós maximumok helyének a becslése az alábbi empirikus képlet alapján tehető meg¹⁴:

$$\lambda_{\max} = \frac{10^3}{0,294 (C=O / H_2O) + 0,346 (COO^-) + 0,46 (NH_2) + 0,494 (N=) + 0,434 (Im)} \quad (3)$$

A réz(II)-ion vizes oldatban a négy ekvatoriális helyen vízmolekulát koordinál. Ligandum jelenlétében ezek a koordinációs helyek oxigén és nitrogén donoratomokra cserélődnek ki. Ezek intenzitása kisebb hullámhossznál maximális, így az abszorpciós

maximumok balra tolódnak. Ez a jelenség különösen a nitrogén atomokra jellemző. Nehezíti az összefüggések elemzését az is, hogy a donortom kémiai környezetén kívül a kelátgyűrű méretétől és a nem koordinálódó ligandumrészek nagyságától is függ az effektus nagysága. Ugyanakkor az axiális kölcsönhatás az abszorpciós maximumokat a nagyobb hullámhossz tartományba tolja. Ezeket a hatásokat figyelmen kívül hagyja a fentebb említett empirikus képlet.

3.3 Cirkuláris dikroizmus (CD)-spektroszkópia^{13, 15}

A különböző komplexek geometriájának megállapítására cirkuláris dikroizmus-spektroszkópia vizsgálatokat végeztem.

A síkban polarizált fény felbontható két összetevőre, egy balra és egy jobbra cirkulárisan polarizált tényezőre. Az optikailag aktív anyagok a két összetevőt különböző mértékben térítik el. Egy ilyen közegben a fény polarizációs síkja elfordul, ha síkban polarizált fényt bocsátunk át rajta. Az elfordulás mértéke több tényezőtől is függ, ezek a törésmutató, oldószer, hőmérséklet és a mérés hullámhossza.

CD-nek nevezzük a síkban polarizált fény két összetevőjének különböző abszorpcióját. Ezek különbségét a hullámhossz függvényében ábrázolva kapjuk meg a CD görbét.

A CD görbe maximumai, illetve minimumai az elektrongerjesztési abszorpciós spektrum maximuma helyén, illetve ahhoz igen közel helyezkednek és viszonylag keskenyek. A fémkomplexek optikai aktivitása származhat a komplex molekula asszimetriájából vagy akár a ligandum saját asszimetriájából.

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

3.4 ¹H-NMR spektroszkópia

A ligandum tisztaságát ¹H-NMR méréssel ellenőriztük. A ligandumot 99,8 %-os izotóptisztaságú D₂O-ban oldottam fel. A spektrumok felvételéhez 0,01 mol/dm³ koncentrációjú oldatot készítettem. A ¹H-NMR spektrumokat BRUKER AM360

MHz FT- NMR készüléken vettük fel. A kapott spektrumot az NMR spektrométer saját szoftverével, illetve az 1D WinNMR programmal értékeltük ki.

3.5 Tömegspektrometria¹⁶

A többmagvú komplex létezésének bizonyítására tömegspektrometriás méréseket végeztem.

A tömegspektrometria a molekulák ionizációján alapuló nagy hatékonyságú analitikai és szerkezetvizsgálati módszer. Jellemzője, hogy széles tartományban nagy érzékenységgel képes molekulákat vizsgálni. A módszer elve, hogy a mintában levő molekulákat ionizáljuk, majd tömeganalizátor segítségével szétválasztjuk és detektáljuk. Az elektropray ionizáció során a mintát egy nagy feszültségű kapillársion keresztül porlasztjuk. Az így keletkezett cseppekből fűtéssel párologtatjuk el a folyadékot. A Coluomb robbanást követően addukt ionok keletkeznek. Ezt követően a töltött részecskék az m/z értékük alapján szétváltak az analízátorban a repülési idejük alapján. A detektorral meg tudtuk határozni az egyes ionok m/z értékeit.

Az ESI-MS spektrumokat Bruker microTOF-Q tömegspektrométeren vettük föl a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén. A mintákban a ligandum koncentrációja kb. $0,001 \text{ mol/dm}^3$ volt.

3.6 Használt vegyszerek

A pH-potenciometriás méréseket kb $0,2 \text{ mol/dm}^3$ -es, pontosan ismert koncentrációjú, argon alatt tárolt, karbonátmentes KOH-oldattal végeztem. A mérőoldat karbonátmentességét a koncentráció meghatározására alkalmazott pH-potenciometriás méréssel ellenőriztem.

A kb. $0,2 \text{ mol/dm}^3$ -es sósavoldatot tömény sósav hígításával készítettem. A pontos koncentrációját az ismert koncentrációjú KOH-oldattal való titrálással határoztam meg a Gran-féle módszer segítségével.¹⁷

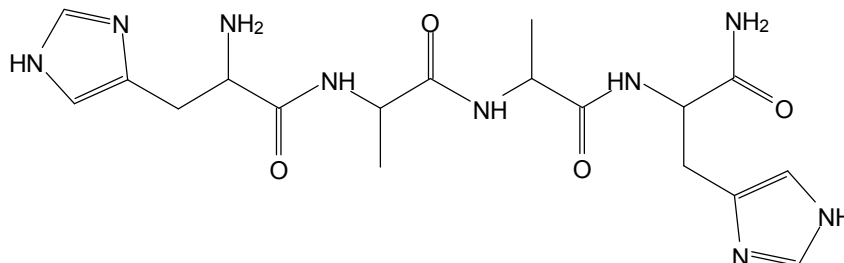
A CuCl_2 törzsoldat a Reanal cég által gyártott a.l.t. minőségű vegyszerből készült. A törzsoldat a fémionra nézve kb. $0,01 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú. A pontos fémion koncentrációt oxinát formájában gravimetriásan határozták meg.

A pH-potenciometriás méréseknél használt kálium-hidrogén-ftalát- és KCl-oldat háromszor ioncserélt víz felhasználásával szilárd vegyszerekből készült.

A vizsgált ligandumot (His-Ala-Ala-His-NH₂) a tanszéken állítottam elő szilárd fázisú peptidszintézissel. A ligandum megfelelő szerkezetéről és tisztaságáról HPLC-s és ¹H-NMR-es méréssel győződünk meg. A peptidszintézishez felhasznált vegyszerek közül a hisztidint (Fmoc-His-Trt-OH), alanint (Fmoc-Ala-OH), dimetilformamidot (DMF), o-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrafluoroborátot (TBTU), N,N-diizopropil-etilamint (DIPEA), piperidint, és a trifluorecetsavat (TFA) a Merck Kft-től szereztük be. A szintézishez használt gyantát (Rink amide gyanta) a Nova Biochemtől vásároltuk. Az N-hidroxibenzol-triazolt (HOBt), triizopropil-szilánt (TIS), 1-metil-2-pirrolidint (NMP), dietil-étert és az etán ditiolt (EDT) a Sigma-Aldrich cégtől, a 2,2'-(etiléndioxi)-dietántiolt (DODT)) a VWR International Kft-től, a diklórmétánt (DCM) pedig a Spektrum-3D Kft-től vásároltuk. A HPLC-s elválasztáshoz használt acetonitrilt (MeCN) a VWR cégtől szereztük be.

4. Peptidszintézis

Az általam vizsgált peptid His-Ala-Ala-His szekvenciájú, mely savamidcsoportot tartalmaz a C-terminális végen (3. ábra)



3. ábra: Az His-Ala-Ala-His-NH₂ (HAAH) szerkezete.

A peptidet szilárd fázisú peptidszintézissel állítottam elő az öt felépítő aminosavakból, Liberty 1 mikrohullámú automata peptidszintetizáló készülékkel.

A szintézis során a Merrifield által kidolgozott szilárd fázisú peptidszintézisnek megfelelően oldhatatlan hordozó polimert (gyantát) alkalmaztunk.¹⁸ Ennek a felületéhez kötve történt a szintézis. A gyantához hozzákapsolódott a peptid C-terminális vége, mely aminocsoportja védve volt. Ez lehetővé tette, hogy a következő aminosav vízkilépés közben a megfelelő helyen létesítsen peptidkötést. A kötés kialakulását kapcsolószerek segítik elő, ezek a TBTU, HOBt, melyek aktiválják az aminosav karboxilcsoportját. A gyantához kapcsolódó peptidlánc a kapcsolódások során növekszik, melynek a főlegesen reagenstől való megtisztítása mosással és szűréssel történik.¹⁹

A módszer előnye, hogy a szintézis veszteségek nélkül, egyetlen reakcióedényben végrehajtható. Ezt teszi lehetővé, hogy a minta minden egyes adagolás után szűrhető, így a nem reagált anyagok és a melléktermékek könnyen eltávolíthatóak. A folyamat végén a szűrőn már csak a kész peptid található a gyantához kapcsolódva.

A szilárd fázisú peptidszintézis során kétféle stratégiát különböztethetünk meg, a Boc/Bzl- és a Fmoc/tBu módszer. A peptid szintézisekor az utóbbit használtuk, mely során az aminosav-származékok α -aminocsoportjához 9-fluorenil-metoxikarbonil (Fmoc), az oldalláncok funkciós csoportjához pedig terc-butil védőcsoport kapcsolódott a mellékreakciók elkerülése végett.²⁰

A szintézis alatt a gép automatikusan adagolta először az aminosavakat (Fmoc-His, Fmoc-Ala), aztán az aktivátort (HOBt, TBTU) és az aktivátor bázist (DIPEA), melyek katalizálják a reakciót. A kapcsolási lépések hatékonyságát mikrohullám alkalmazása növelte. Így tiszta peptidet tudtam előállítani. Az Fmoc védőcsoport eltávolítása 20%-os

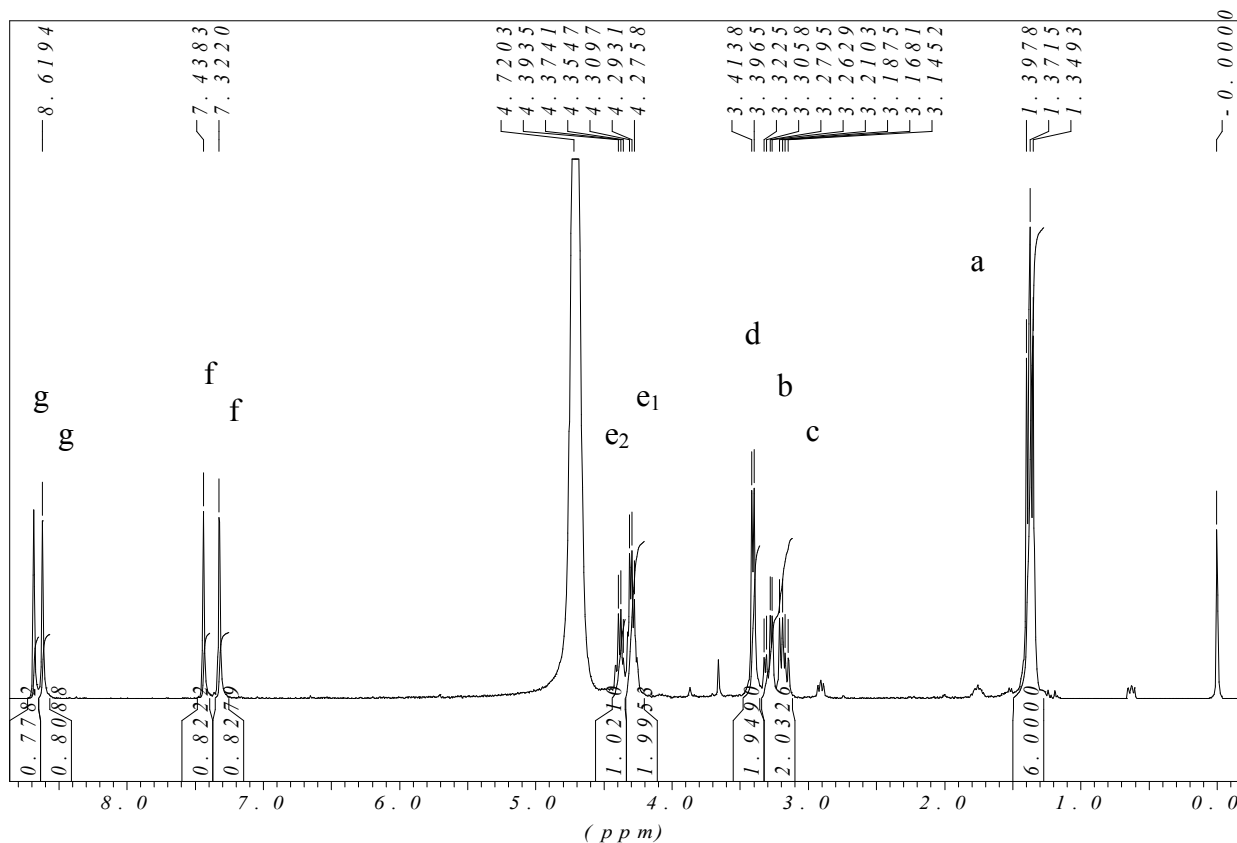
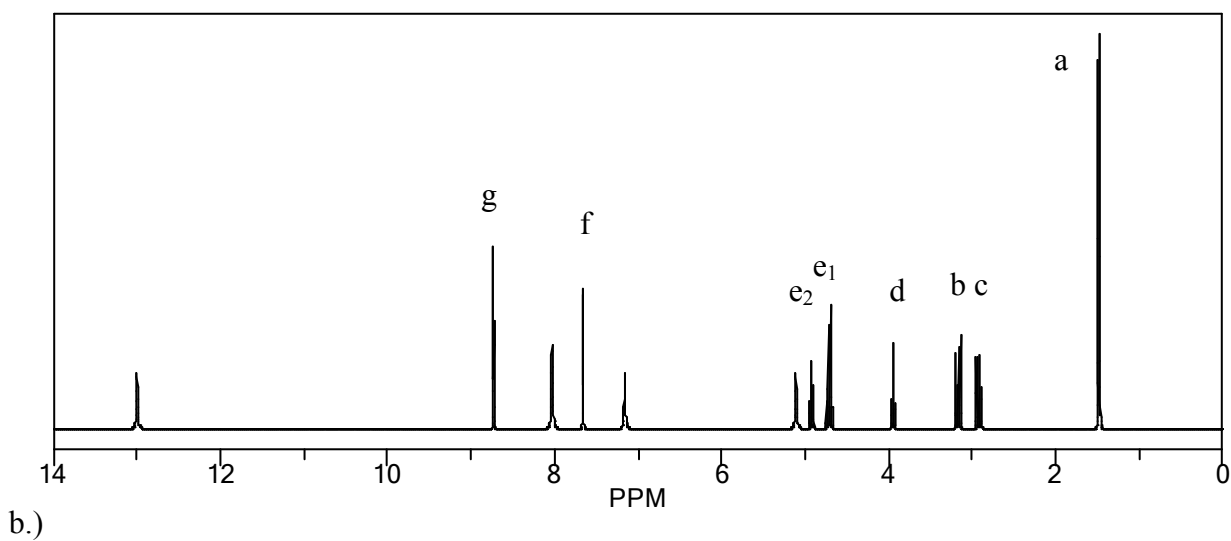
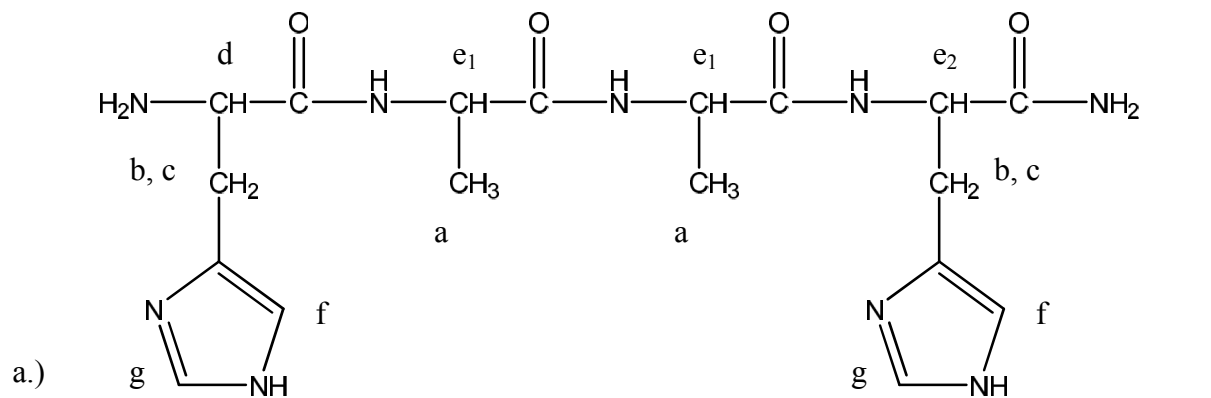
piperidin-DMF eleggyel szintén mikrohullámmal történt. A gépből kivett peptid gyantához volt kötve, így az arról való hasítást kézzel végeztem a hasító eleggyel (TFA/TIS/H₂O/EDT). A DODT megakadályozta a hisztidin oldallánc oxidálódását. A peptidet dietil-éterrel csaptuk ki, éteres mosás és centrifugálás után a pelyhes csapadékot nagy tisztaságú argon alatt szárítottam, végül kevés vízben feloldottam és liofilizáltam.

A liofilizálás után a kinyert peptid tömege 154,67 mg volt. A peptidszintézist 0,25 mmol +10%-ra volt tervezve. Ez alapján a kitermelés 79,8%. Ennek tisztasága a titrálás során számított ligandum anyagmennyiségének és a mintába bemért anyagmennyiségének alapján 69,1%. A peptid mellett azonban csak inert szennyezés volt jelen.

A peptid tisztaságát nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás méréssel, HPLC-vel ellenőriztem. Az elválasztáshoz MeCN (6 %) és H₂O (94 %) elegyét használtam 0,1 %-os TFA tartalommal.

A ¹H-NMR spektroszkópia is megerősítette a peptid tisztaságát. A peptidre a Chemdraw program segítségével szerkesztett várható spektrum és a mért spektrum jó egyezésben van egymással. (4. ábra)

Takács Gergely: Az oldalláncok hatása a két hisztidint tartalmazó tetrapeptidek
komplekképződési tulajdonságaira



4. ábra: A ligandum várható (a.) és a kapott (b.) ^1H -NMR spektruma.

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

5.1 Protonálódási állandók

Az általam vizsgált HAAH peptidet a HGGH, a HVVH és a GGGH szekvenciájú ligandumokkal hasonlítottam össze. Az összehasonlítás során a peptidek közül csak a GGGH tartalmaz karboxilcsoportot, a többi ligandumnál savamid csoport van a C-terminális végen. A protonálódási állandókat az alábbi táblázat tartalmazza.

1. táblázat: A HAAH ligandum és az összehasonlításként használt peptidek protonálódási állandó értékei. A csillaggal jelzett vegyületek savamidcsoportot tartalmaznak a C-terminális végen.

	HAAH ²¹	HGGH ²²	HVVH ²²	GGGH ²³
HA	7,41(1)	7,43	7,46	8,03
H₂A	13,81(1)	13,86	13,84	14,89
H₃A	19,11(2)	19,14	19,13	17,55
pK₁	5,30(2)	5,28	5,28	2,66
pK₂	6,40(1)	6,43	6,38	6,86
pK₃	7,41(1)	7,43	7,46	7,59

A táblázat alapján látható, hogy három deprotonálódási lépés különíthető el. Ez a két hisztidin nitrogénjeihez, valamint az aminocsoporthoz tartozik.

A két kisebb pK érték az imidazolnitrogének deprotonálódásához (~5,3 és ~6,4), a legnagyobb érték pedig a protonált aminocsoport deprotonálódásához tartozik (~7,4). Ugyanez a tendencia figyelhető meg a HGGH és a HVVH rendszereknél is.

Ez a három deprotonálódási folyamat egymást átfedő lépésben játszódik le, így ezek a deprotonálódási lépések nem különülnek el egymástól. Ezért a pK értékeknek az adott donor csoportokhoz való rendelése csupán közelítő érték.

A két imidazol helyzete, környezete eltérő. Az N-terminális végen levő imidazolnitrogén van a protonátmenet szempontjából kedvezőbb helyzetben, deprotonálódását elősegíti a mellette levő aminocsoport. A C-terminális végen savamidcsoport helyezkedik el, így az nem tudja elősegíteni az ott levő donorcsoport deprotonálódását. Így a korábbi vizsgálatoknak megfelelően a C-terminális részen levő imidazolnitrogén deprotonálódása nagyobb pH-n játszódik le. Ezt igazolja a GGGH molekulával való összehasonlítás, ahol a hisztidin imidazolnitrogénjéhez rendelhető pK₂ érték hasonló nagyságrendű.

5.2 A ligandumok réz(II)-komplexei

A Cu(II)-HAAH rendszerben a korábban elvégzett vizsgálataim eredményeit a tanszéken már korábban vizsgált rendszerekkel hasonlítottuk össze, hogy következtetéseket vonjunk le az oldallánc hatásáról a komplexképződésben. Az összehasonlítás során a különböző rendszerek protonálódási állandóit és a Cu(II)-vel alkotott 1:1 arányú komplexeinek a stabilitási állandóit vizsgálom (2.táblázat).

2. táblázat: Hisztidintartalmú tetrapeptidek protonálódási állandói és Cu(II)-vel alkotott komplexeinek stabilitási állandói.

	HAAH ²¹	HGGH ²²	HVVH ²²	HGVH ²⁴	HVGH ²⁵	GGGH ²³
HA	7,41(1)	7,43	7,46	7,40	7,38	8,03
H₂A	13,81(1)	13,86	13,84	13,77	13,74	14,09
H₃A	19,11(2)	19,14	19,13	19,05	19,14	17,55
CuAH	14,83(3)	14,97	15,02	14,80	14,85	12,24
CuA	10,53(3)	10,90	10,03	10,67	10,95	8,47
CuAH₁	2,31(12)	3,14	2,55	2,66	2,88	1,63
CuAH₂	-5,81(5)	-5,30	-6,47	-6,28	-5,81	-5,79
CuAH₃	-17,78(7)	-15,30	-16,41	-16,31	-15,45	-16,67
pK(His)	4,30	4,07	4,99	4,13	3,90	3,77
pK₁(Amid)	8,22	7,76	7,48	8,01	8,07	6,84
pK₂(Amid)	8,12	8,44	9,02	8,94	8,69	7,42
pK₃(Amid)	10,20	10,00	9,94	10,03	9,64	10,88

$$pK_1(\text{Amid}) = \log\beta([\text{CuAH}]) - \log\beta([\text{CuA}])$$

$$pK_2(\text{Amid}) = \log\beta([\text{CuAH}_1]) - \log\beta([\text{CuAH}_2])$$

$$pK_3(\text{Amid}) = \log\beta([\text{CuAH}_2]) - \log\beta([\text{CuAH}_3])$$

A különböző ligandumok protonálódási állandói közel azonosak, ebből az állapítható meg, hogy az oldalláncok nem befolyásolják a ligandumok sav-bázis tulajdonságait. A komplexek stabilitási állandóinál azonban már eltérés figyelhető meg a különböző rendszerek esetén. Az [CuAH]³⁺ komplexben a ligandum hisztaminszerű koordinációval kötődik, míg a C-terminális imidazolnitrogén protonált. A pK(His) értékek a C-terminális részen elhelyezkedő imidazolnitrogén deprotonálódását mutatják. A réz(II)-ion elősegíti a nem koordinálódott imidazol donorcsoport deprotonálódását és koordinálódását a fémionhoz. Ezt mutatja, hogy minden esetben kisebb a pK(His) értéke, mint a szabad ligandum esetén mért pK₁. Az értékekben az alábbi tendencia figyelhető meg:



Az oldallánc méretének növelésével a C-terminális imidazolnitrogén koordinálódásával kialakuló makrokelát stabilitása csökken, kialakulása akadályozott.

A pH emelésével a N-terminális imidazolnitrogén helyett az amidnitrogének koordinációja valósul meg. A C-terminális részen levő imidazolnitrogén koordinációja viszont továbbra is megmarad, amíg a fémion koordinációs szférája nem válik telítetté. Az első amidcsoport deprotonálódását jellemző $pK_1(\text{amid})$ értékek az alábbi sorrendben nőnek:



míg a második amidnitrogén deprotonálódására vonatkozó $pK_2(\text{amid})$ értékek a



sorrendben változnak. A $pK_1(\text{amid})$ értékét két tényező befolyásolja. Minél nagyobb a $[\text{CuA}]^{2+}$ komplex stabilitása, annál nagyobb mértékben akadályozott az amidnitrogén deprotonálódása. Másrészt pedig, minél jelentősebb a C-terminális imidazolnitrogén hatása a $[\text{CuAH}_1]^+$ komplexben, annál kedvezőbb az első amidnitrogén deprotonálódása. A $[\text{CuA}]^{2+}$ komplex stabilitása a HVVH esetén a legkisebb, ezért kerül ez a ligandum a sor elejére. A HGGH esetén a legjelentősebb a $[\text{CuAH}_1]^+$ komplexben a C-terminális imidazolnitrogén hatása, ez magyarázza a $pK_1(\text{amid})$ értékek sorrendjének változását a $pK_1(\text{His})$ értékekhez képest. A $[\text{CuAH}_2]$ komplex képződését, és a második amidnitrogén deprotonálódását szintén elősegíti a C-terminális imidazolnitrogén koordinációja. A valin tartalmú peptidek esetében a második amidnitrogén deprotonálódása nagyobb pH-n játszódik le, mert a C-terminális imidazolnitrogén hatása a legkisebb. A HGGH, HAAH illetve a GGGH esetén ez a kölcsönhatás a legjelentősebb.

A harmadik amidnitrogén deprotonálódása szinte azonos pH érték esetén következik be valamennyi két hisztidint tartalmazó tetrapeptid esetén. Ezek az értékek kisebbek, mint a GGGH esetén meghatározott érték. Ebből az állapítható meg, hogy a GGGH rendszer esetében a $[\text{CuLH}_2]$ komplexnél jóval nagyobb a C-terminális oldallánc hatása, ami gátolja a további amidnitrogén deprotonálódását. A C-terminális részen elhelyezkedő imidazolnitrogén hatása ennél a rendszernél az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-)$ komplex esetén is megfigyelhető.²⁶

A HAAH esetén $[\text{Cu}_3\text{A}_2\text{H}_6]$ összetételű többmagvú komplex keletkezését is feltételeztük fémion felesleg jelenlétében, hasonlóan a HGGH ligandumhoz. A feltételezett szerkezetben a fémionok hisztaminszerű, illetve $(\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N}))$ koordinációval kötődnek a molekulákhoz. A többmagvú komplex jelenlétét tömegspektrometriás méréssel próbáltuk meg alátámasztani. A Cu(II)-HAAH 3:2 arányú rendszerben erősen lúgos oldatban felvett tömegspektrumot mutatja be a 4. ábra. A tömegspektrumban azonban csak a

Takács Gergely: Az oldalláncok hatása a két hisztidint tartalmazó tetrapeptidek
komplexxépződési tulajdonságaira

$[\text{CuAH}_3]^-$ komplexnek megfelelő csúcs jelent meg, és a mért és a komplex molekulatömegére számított izotópeloszlás egyezésben van (3. táblázat).

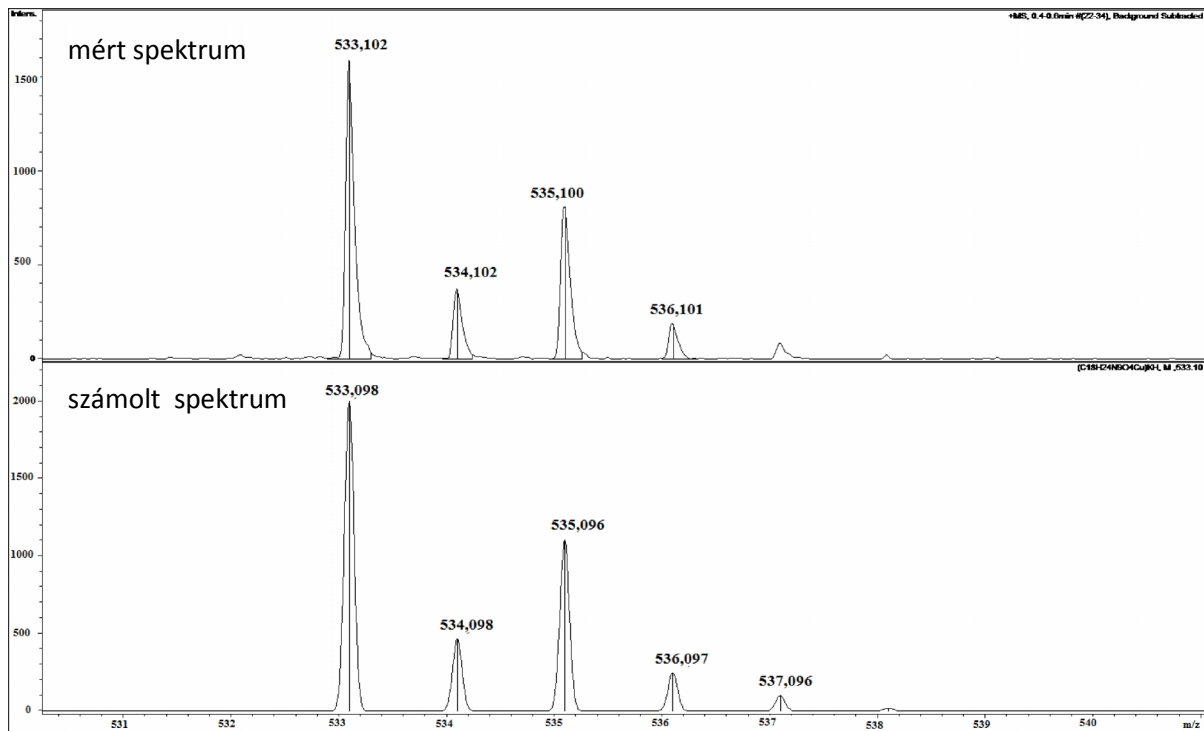
3. táblázat: A számolt és a mért spektrumok m/z értékei.

Képlet	Számolt m/z	Mért m/z
$[\text{CuAH}_3]\text{KH}^+$	533,10	533,102
$[\text{CuAH}_3]\text{K}_2^+$	571,05	571,058

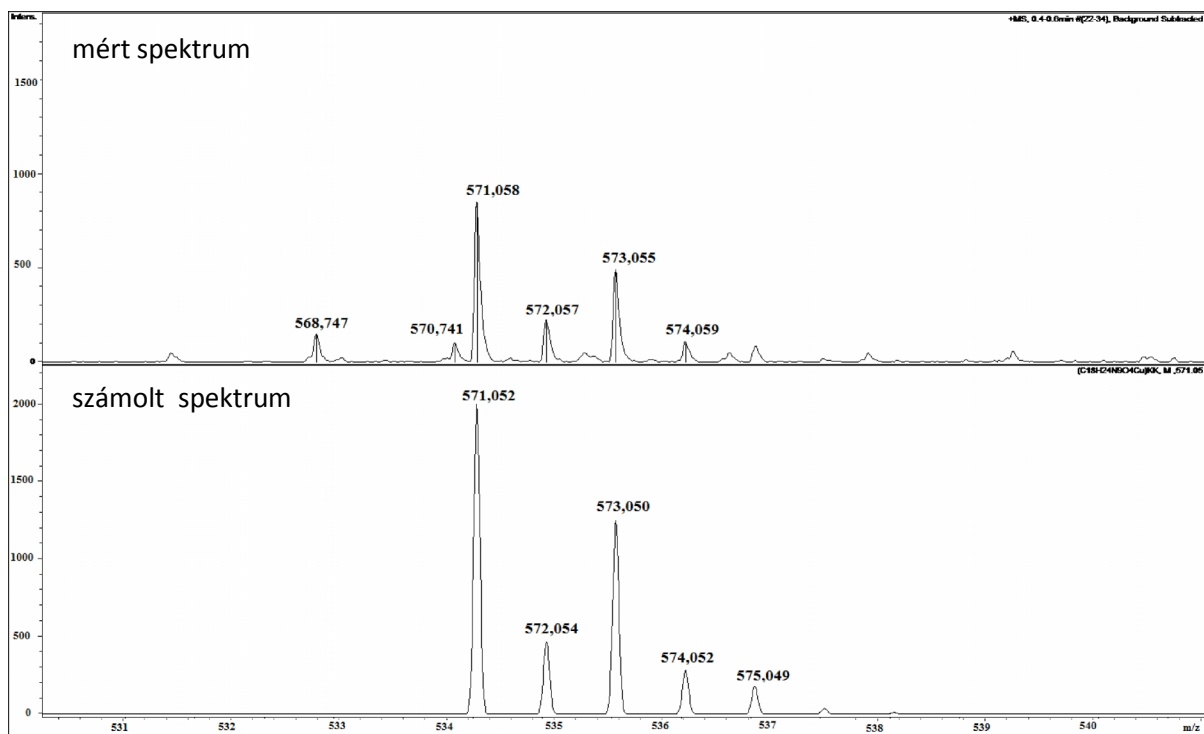
Így a méréssel nem sikerült alátámasztani a feltételezést, de ez nem zárja ki a többmagvú komplex keletkezését, mivel az a tömegspektrometriás mérés során a komplex fragmentálódhatott. A komplex jelenlétének igazolásához ESR vizsgálatokat tervezünk.

Takács Gergely: Az oldalláncok hatása a két hisztidint tartalmazó tetrapeptidek
komplexxképződési tulajdonságaira

a.)



b.)

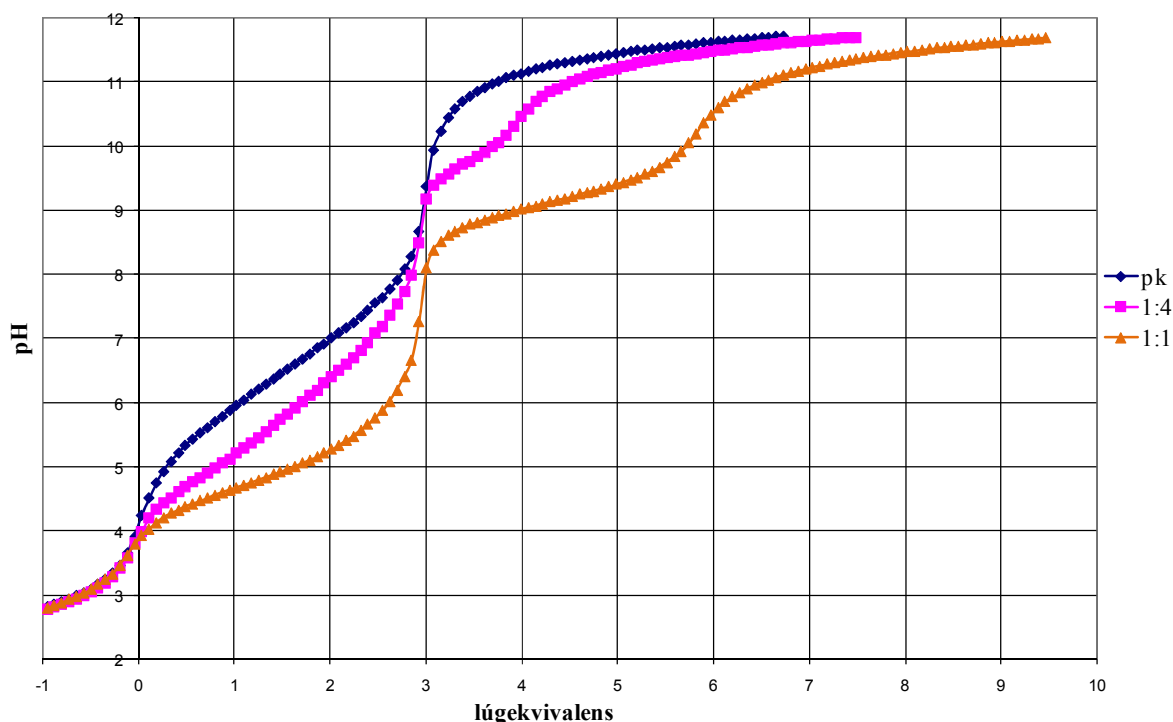


4. ábra: A $[CuAH_3]^-$ komplex számolt- és mért tömegspektrumai erősen lúgos tartományban.
 $Cu(II)-A=3:2$, $c(A)=2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ a.) H^+ és K^+ ionokkal b.) $2 K^+$ ionnal

5.3 A ligandumok nikkel(II)-komplexei

5.3.1 pH-potenciometriás mérések

A titrálásokat nikkel(II)-ion jelenlétében is elvégeztem 1:1 és 1:4 fémion-ligandum arányoknál. Mindkét esetben látható, hogy csapadék kiválás nélkül zajlott a titrálás. UV-látható spektroszkópiás mérésekkel megállapítottam, hogy fémfelesleg esetén az oldatban ~10-es pH értéknél csapadék válik ki. Ezért fémfelesleg esetén nem végeztem pH-potenciometriás méréseket.



5. ábra: A Ni(II)-HAAH titrálási görbéi ($c_{\text{lig}}=2,05 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

A kezdetben halványzöld színű oldat a titrálás végére intenzív sárga színű lett. Ez a színváltozás az amidnitrogének deprotonálódásának és a fémionhoz történő koordinálódásának feleltethető meg. A nikkel(II)-ion esetében is két lépésben történik a komplexképződés. Három ekvivalens lúg fogy a protonált amino- és a két imidazol csoport deprotonálására (5. ábra). A réz(II)-ion négyes illetve torzult ötös koordinációjú komplexeivel szemben a nikkel(II)-ion oktaéderes elrendeződést alakít ki. A pH további emelésével az amidnitrogének koordinálódnak a Ni(II)-ionhoz. A komplexek szerkezetében jelentős változás történik, az addigi oktaéderes koordináció helyett síknégyszetes elrendeződés alakul ki. Ez annak kedvez, hogy az amidnitrogének egy lépésben deprotonálódjanak, mely a titrálási görbén is jól látható.

A nikkel(II)-ion esetében a réz(II)-ionhoz hasonlóan 1:1 fémion-ligandum arányú komplexeket, valamint egy biszkomplext feltételeztünk. A Ni(II)-HAAH rendszer fémfeleslegben csapadékos lett, ezért nem feltételeztünk többmagvú komplexet. A 4. táblázat összehasonlítóképpen a tanszéken már vizsgált rendszerek Ni(II)-komplexeire meghatározott stabilitási állandókat is tartalmazza.

4. táblázat: Hisztidintartalmú tetrapeptidek protonálódási állandói és Ni(II)-vel alkotott komplexeinek stabilitási állandói.

	HAAH	HGGH ²⁷	HVVH ²⁷	HGVH ²⁴	HVGH ²⁵	GGGH ²³
NiAH	12,84(3)	12,96	13,22	12,89	12,79	–
NiA	7,63(2)	8,25	7,48	8,22	8,54	5,76
NiA ₂	12,46(5)	12,70	–	13,1	13,31	9,63
NiAH ₁	-1,37(5)	–	-1,39	-0,7	-0,11	–
NiAH ₂	–	-10,04	–	-10,17	–	-11,51
NiAH ₃	-19,25(3)	-19,89	-20,39	-20,24	-19,07	-21,47
pK ₁ (Amid)	9,00	–	8,87	8,92	8,65	–
pK _{1,2} (Amid)	–	9,15	–	–	–	8,64
pK ₂ (Amid)	–	–	–	10,10	–	–
pK _{2,3} (Amid)	8,94	–	9,5	–	9,48	–
pK ₃ (Amid)	–	9,75	–	10,07	–	9,96

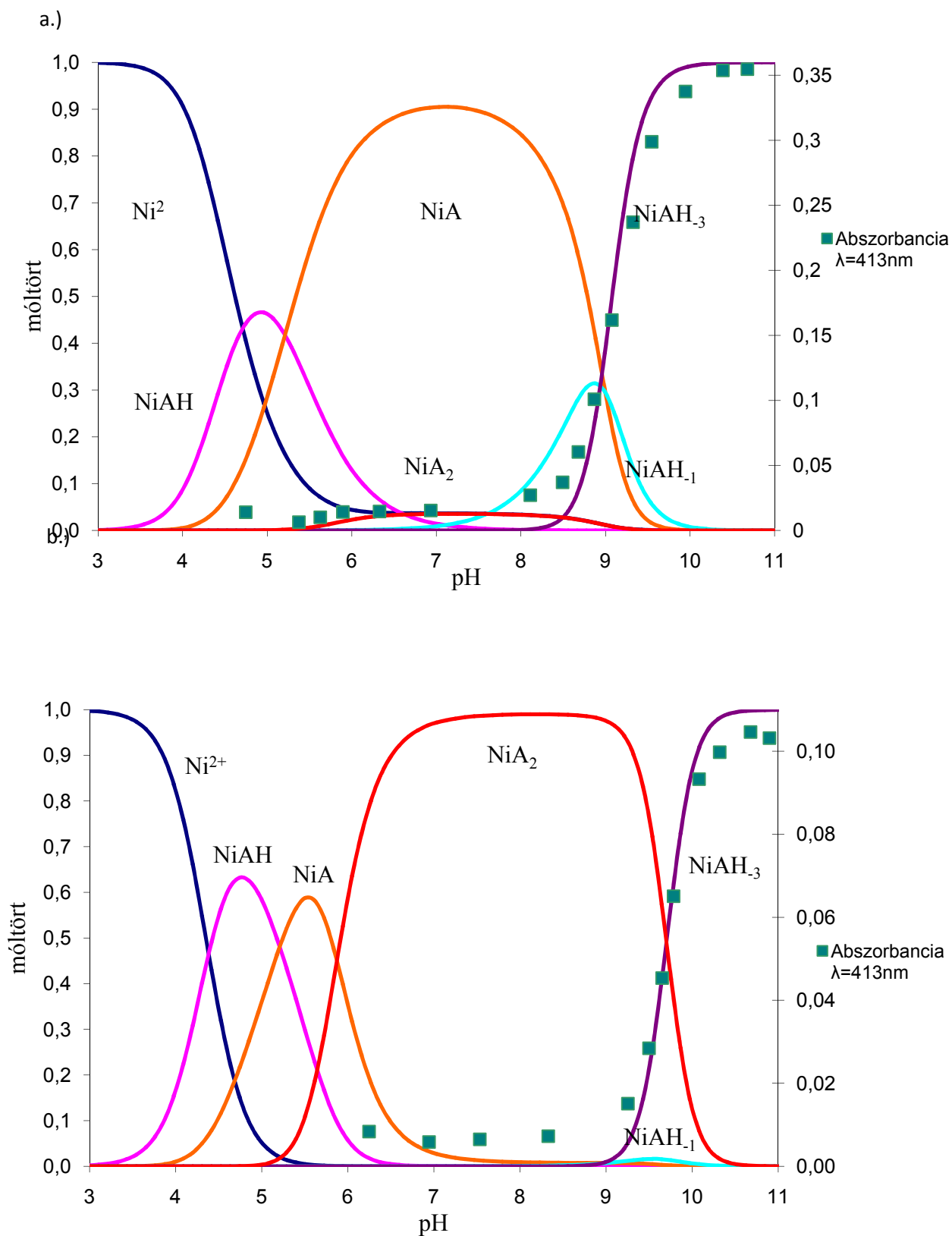
$$pK_{1,2}(\text{Amid}) = (\log\beta([\text{NiA}]) - \log\beta([\text{NiAH}_2]))/2$$

$$pK_{2,3}(\text{Amid}) = (\log\beta([\text{NiAH}_1]) - \log\beta([\text{NiAH}_3]))/2$$

Az 1:1 és az 1:4 fémion-ligandum arányú rendszerek esetén a réz(II)-ionhoz hasonlóan eltérés figyelhető meg a keletkező komplexek összetételében. Ligandumfelesleg esetén stabilis $[\text{MA}_2]^{2+}$ komplex alakul ki a HVVH rendszer kivételével minden esetben, amely a nagyobb pH tartományba tolja az amidnitrogének deprotonálódását. A HVVH esetében az oldallánc mérete megakadályozza ennek a komplexnek a kialakulását. A többi esetben megnövekedett stabilitású lesz a biszkomplex²⁸. A réz(II)-ionnal ellentétben a nikkel(II)-ion körül oktaéderes geometria alakul ki. Így a Ni(II)-ionhoz 3-3 foggal koordinálódhat a két ligandum $2x(\text{NH}_2, \text{Im}(\text{N}), \text{Im}(\text{N}))$, a réznél stabilabb komplexet kialakítva.

A pH emelésével az amidnitrogének deprotonálódása kezdődik el. A titrálási görbe tükrözi, hogy a három peptidnitrogén deprotonálódása átfedő folyamat. Az általam vizsgált ligandumnál valamint a HVVH és HVGH esetében az első amidnitrogén protonvesztését követően a második és a harmadik amidnitrogén egy lépésben koordinálódik a fémionhoz. Ezt mutatja, hogy a $[\text{NiAH}_2]$ komplexre nem határozható meg stabilitási állandó. A HGGH és a GGGH esetében pedig az első két amidnitrogén koordinálódik egy lépésben.

Az amidnitrogének deprotonálódásával párhuzamosan az UV-látható- és a CD-spektrumokban is jelentős változás figyelhető meg. A koncentráció eloszlási görbéken jól látszik, hogy 1:1 fémion-ligandum aránynál már 9-es pH alatt elkezdődik a deprotonálódás, míg ligandumfelesleg esetén ez a nagyobb pH tartomány felé tolódik. Az UV-látható spektrumokban a nagyobb pH tartományban ~400 nm hullámhosszon nagy intenzitású sáv jelenik meg. Az eloszlási görbéken az UV-látható spektroszkópiával, 413 nm hullámhosszon mért abszorbanciák is fel vannak tüntetve (6. ábra). Az eloszlási görbe jól mutatja, hogy ezen a hullámhosszon az abszorbancia változása az amidnitrogének deprotonálódásával párhuzamos.



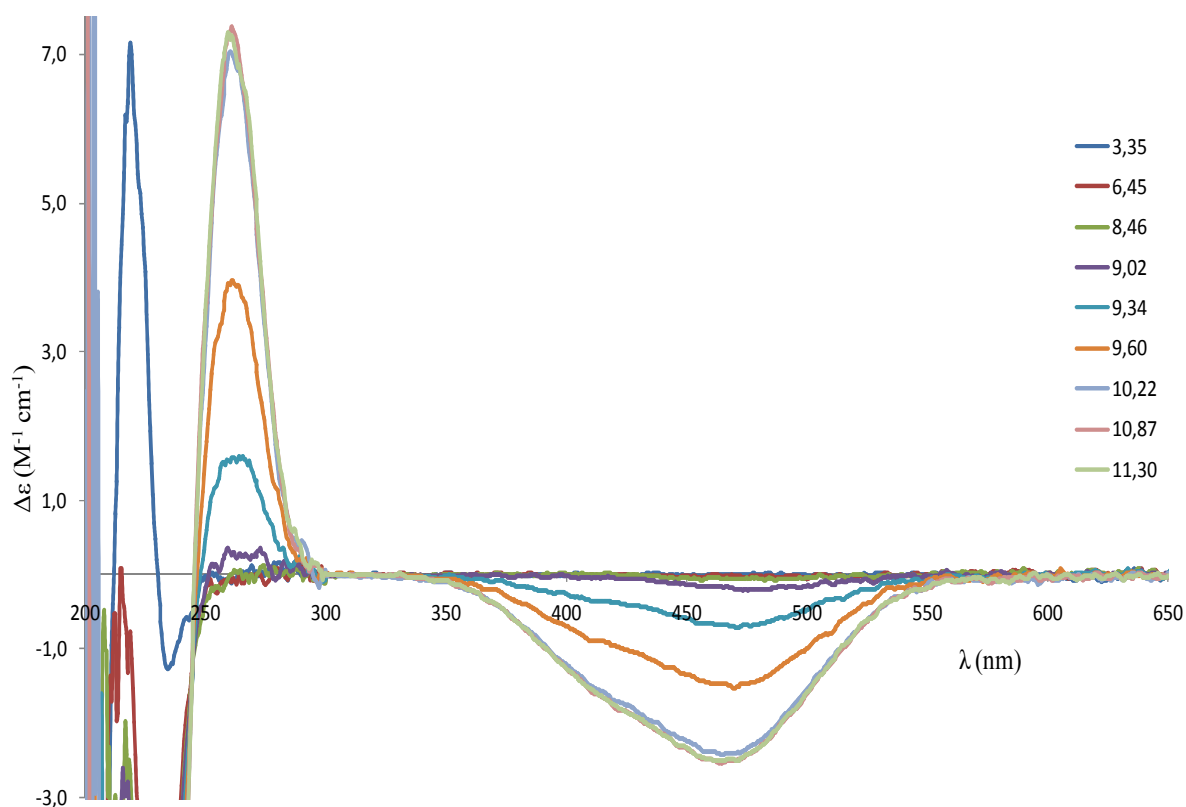
6.ábra: A Ni(II)-komplexek koncentráció eloszlásai és az UV-látható spektroszkópiával, 413 nm-en mért abszorbancia a pH függvényében.

a.) Ni(II)-A=1:1, $c(A)=2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, b.) Ni(II)-A=1:4, $c(A)=2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$

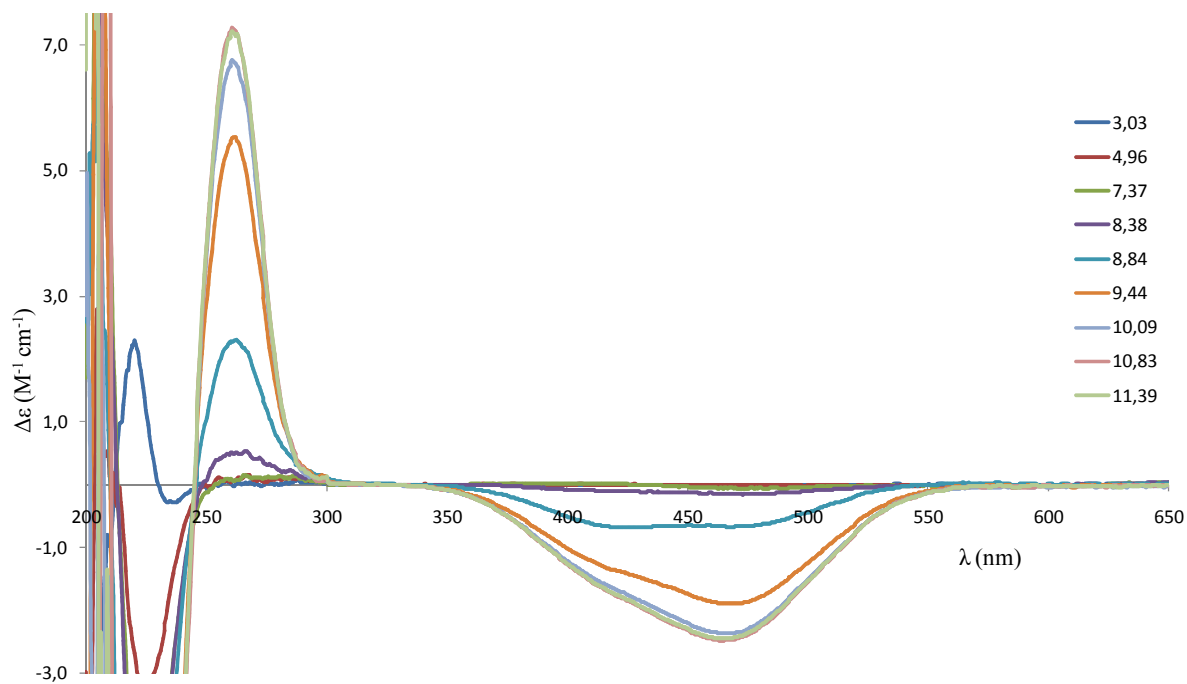
5.3.2 CD-spektroszkópiás mérések

A CD-spektroszkópiás mérésekben is eltérés figyelhető meg a két arány között. Ligandumfelesleg esetén pH 9 felett CD aktív komplex jelenik meg, ami az amidnitrogének deprotonálódásához rendelhető. Egy nagy intenzitású negatív csúcs figyelhető meg ~470 nm-nél. Ezzel egyidejűleg 300 nm alatt egy pozitív csúcs is megjelenik, ami a $\text{Ni(II)} \rightarrow \text{N}^-$ töltésátviteli sávnak feleltethető meg (7., 8. ábra).

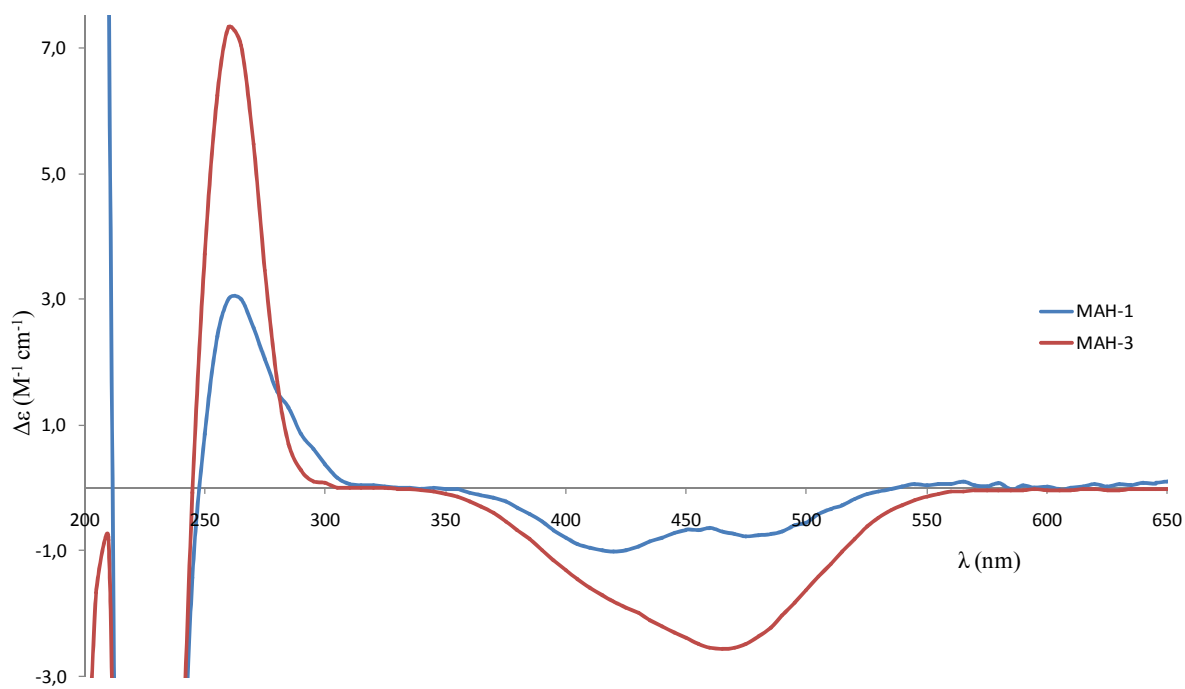
Ezzel szemben 1:1 aránynál már pH 8,3 felett elkezdődik az amidnitrogének deprotonálódása és a görbének két lokális minimuma van pH 8-9 között. Ezért az utóbbi esetben $[\text{MAH}_1]^+$ és $[\text{MAH}_3]^-$ komplexek keletkezését feltételeztük. Az $[\text{MAH}_1]^+$ komplex esetén feltételezhető a C-terminális imidazol nitrogén koordinációja is a fémionhoz. Ezt követően a két amidnitrogén egy lépésben koordinálódik, ekkor az imidazol nitrogén már nem képes kötődni a fémionhoz. A spektrumok számítógépes felbontásával a két CD aktív részecskére meg tudtuk határozni az egyedi spektrumokat (9. ábra).



7. ábra: A $\text{Ni(II)}\text{-HAAH} = 1:1$ arányú rendszer CD-spektrumai a pH függvényében.



8. ábra: A $Ni(II)$ -HAAH=1:4 arányú rendszer CD- spektrumai a pH függvényében.

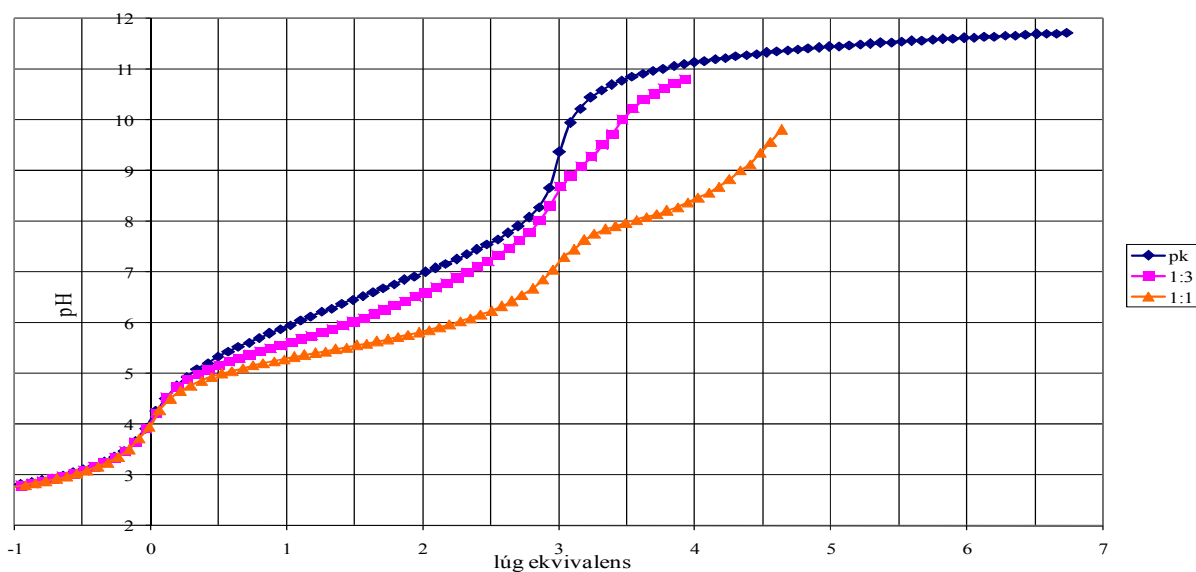


9. ábra: A különböző komplexek egyedi CD-spektrumai

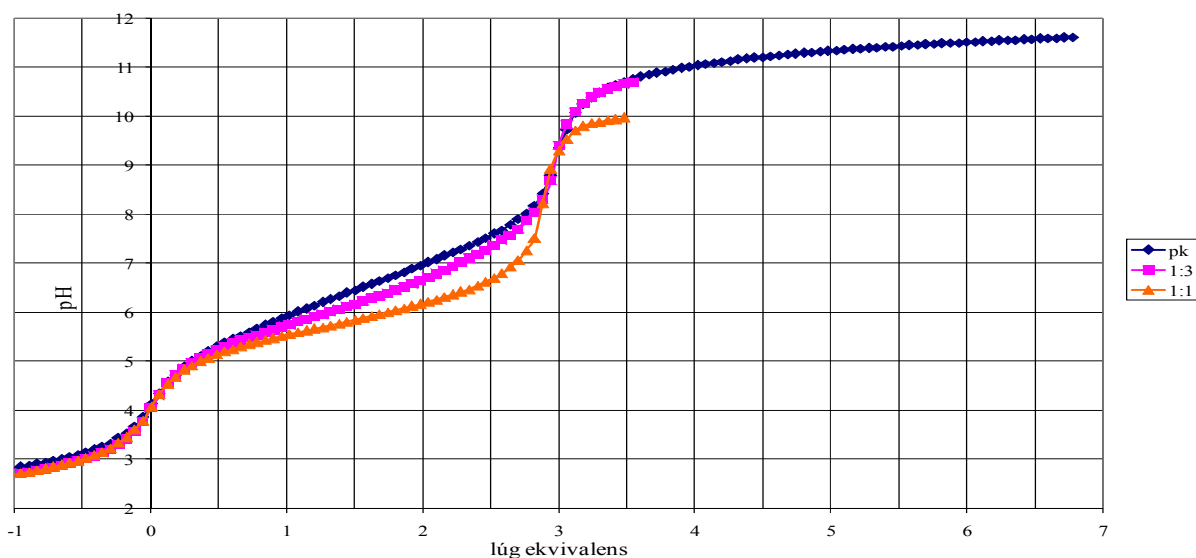
5.4 A ligandumok cink(II)- és kadmium(II)-komplexei

A titrálásokat 1:1 és 1:3 fémion-ligandum arányánál végeztem el a cink(II)- és a kadmium(II)-ion esetében. A titrálások során a pH 8-as tartományig jelentős mértékű komplexképződési folyamat játszódik le. Ezt mutatja, hogy a különböző arányú rendszerek titrálási görbéi eltérnek a szabad ligandum titrálási görbétől (10. ábra). Mindkét fémion esetében pH 10 felett csapadék képződött.

a.)



b.)



10. ábra: A HAAH ligandum titrálási görbéi

a.) Zn²⁺ - A ($c_A = 2,05 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) b.) Cd²⁺ - A ($c_A = 2,48 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

Takács Gergely: Az oldalláncok hatása a két hisztidint tartalmazó tetrapeptidek
komplexxképződési tulajdonságaira

A Cd^{2+} esetén a pH ugrást követően csapadék vált ki. A Zn^{2+} titrálási görbéjén a pH ugrást követően egy extra lúgfogyasztó folyamat figyelhető meg, mely csapadékképződéssel fejeződik be. Ez arra utal, hogy a cink(II)-ion esetén a lúgos tartományban vegyes hidroxokomplex alakul ki. A kadmium(II) esetében erre nem következtethetünk (10. ábra).

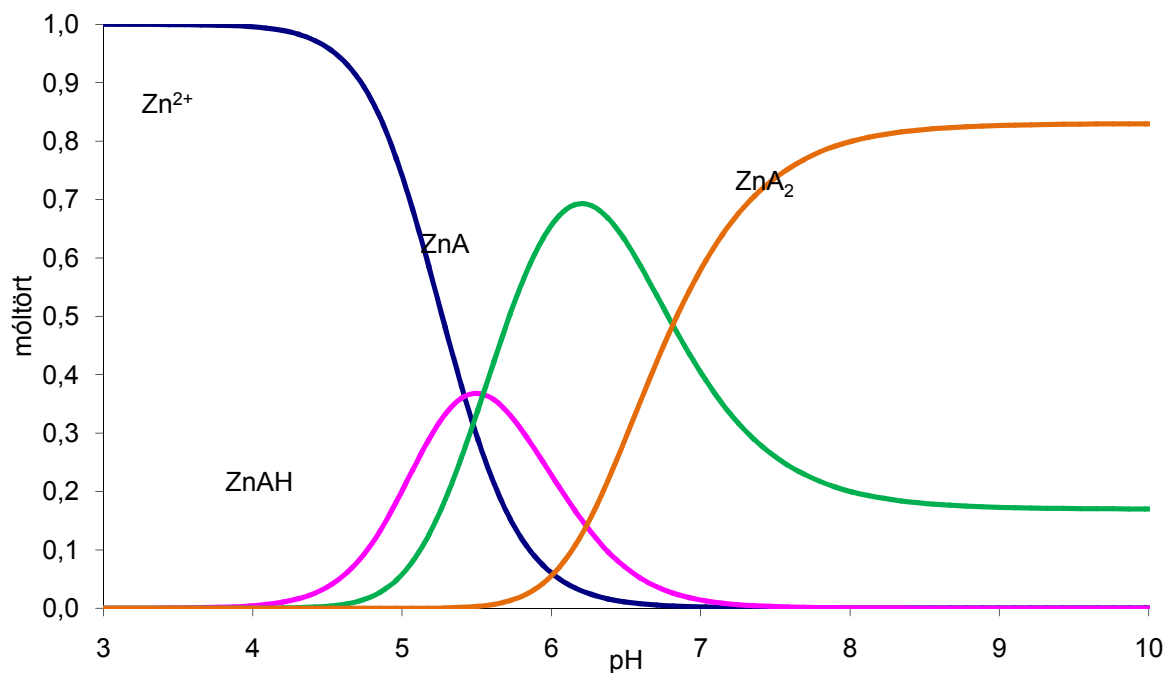
Mindkét fémion esetében pH 8-ig a nikkel(II) ionhoz hasonlóan $[\text{MA}]^{2+}$ és $[\text{MA}_2]^{2+}$ komplexek alakulnak ki (5. táblázat). A ligandum egy- vagy kétfogú koordinációja valósul meg.

5.táblázat: A Zn(II)- és Cd(II)-HAAH rendszerek protonálódási és stabilitási állandó ($\log\beta$) értékeik.

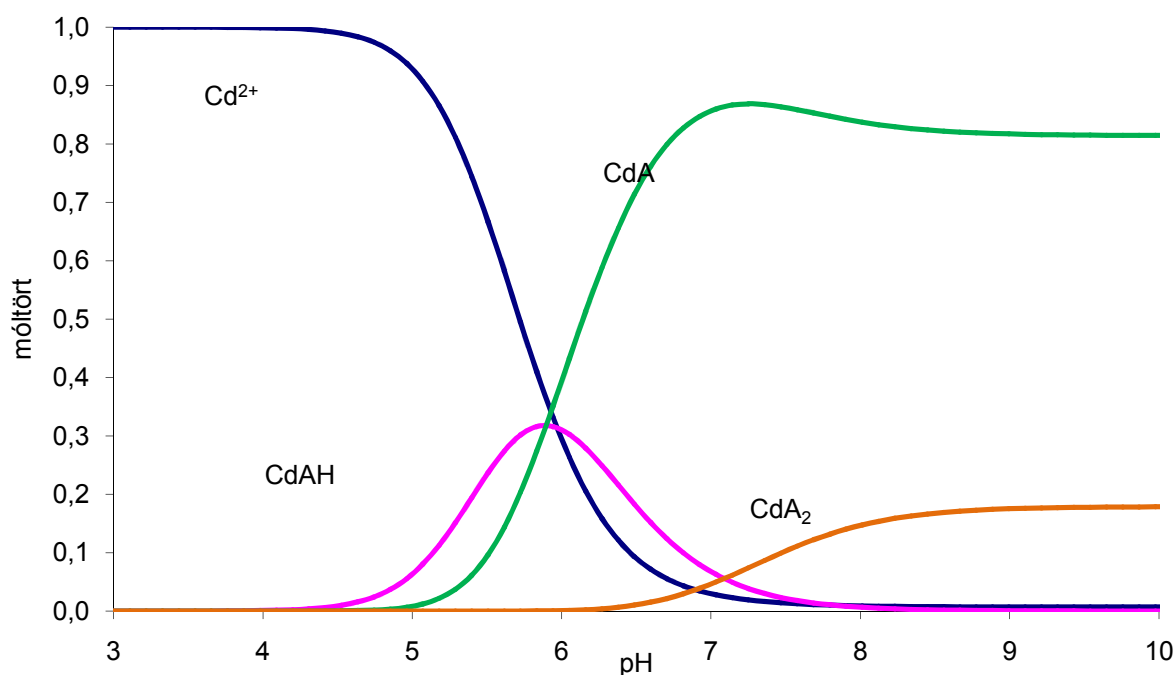
	Zn^{2+}	Cd^{2+}	Cu^{2+*}	Ni^{2+*}
MAH	11,27(2)	10,71(1)	14,83	12,84
MA	5,73(1)	4,81(1)	10,53	7,63
MA₂	9,35(6)	6,89(12)	14,41	12,46
pK(His)	5,54	5,90	4,30	5,21

* A keletkező további komplexeket a 2. és a 3. táblázat tartalmazza

A kadmium(II) ion esetében a ligandumfelesleg gátolja a csapadék keletkezését, ami így csak pH 10 felett jelenik meg (16. ábra). A fémion körül oktaédes szerkezet alakul ki, ligandumok háromfogú koordinációjával, ami akadályozza a vegyes hidroxo komplexek képződését. Az 1:1 fémion-ligandum arány esetében a csapadék kiválása már pH 10 alatt megtörténik. A cink(II)-ion esetében a fémion tetraédes szerkezete miatt a vegyes hidroxo komplexek képződése ugyanakkor átfedésben van a csapadékképződéssel, emiatt ezek összetételét és stabilitási állandóit nem tudtuk meghatározni.

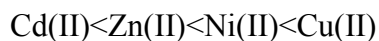


11. ábra: A Zn(II)-komplexek koncentráció eloszlása Zn(II)-A=1:3, $c(A)=2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$

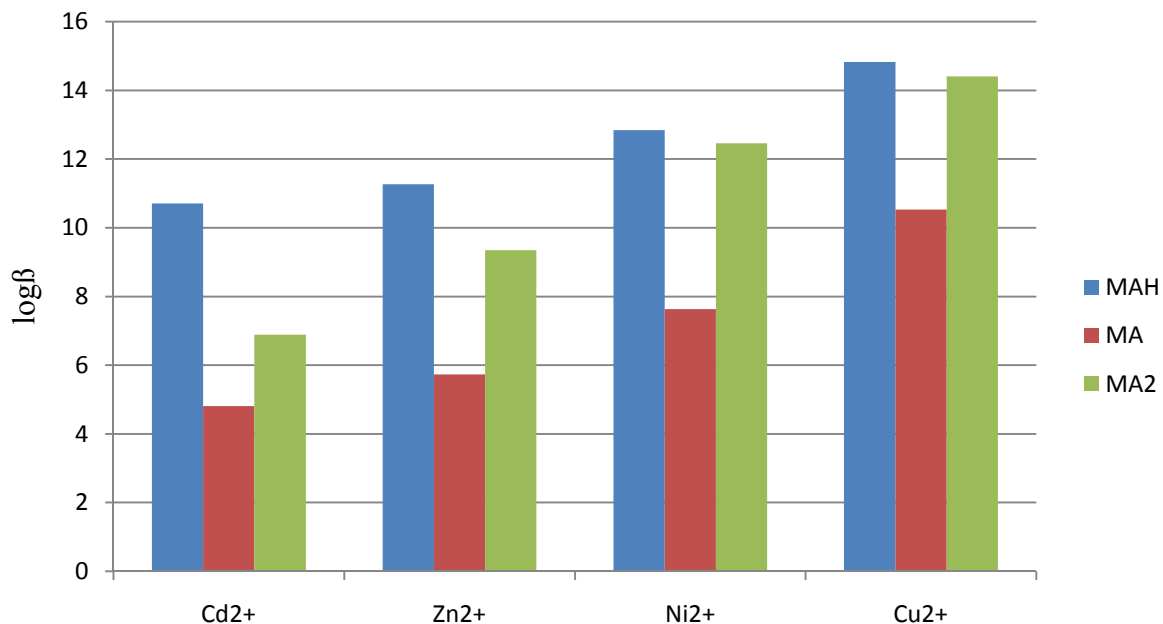


12. ábra: A Cd(II)-komplexek koncentráció eloszlása Cd(II)-A=1:3, $c(A)=2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$

A 4. táblázat a HAAH ligandum különböző fémionokkal alkotott komplexeinek a stabilitási állandó értékeit, valamint a származtatott $pK(\text{His})$ adatot tartalmazza. Az értékek az Irving-Williams sornak megfelelően változnak:



A Cu(II)-ionnal alakulnak ki a legstabilisabb komplexek. Ezt szemlélteti a 13. ábra. A C-terminális imidazolnitrogén deprotonálódása ennél a fémionnál a legkedvezőbb, ezt mutatja, hogy a Cu(II)-ionhoz tartozó $pK(\text{His})$ érték a legkisebb.



13. ábra: A különböző fémionok komplexeinek stabilitási állandó értékei.

6. Összefoglalás

Az emberi szervezet számára feltétlenül szükséges a réz(II)-, cink(II)- és nikkel(II)-ion jelenléte. Kis mennyiségük ellenére nélkülözhetetlenek, nem csak az emberi szervezet számára. A kadmium(II)-ion ezzel ellentétben karcinogén hatású. Ezek a fémionok az emberi szervezetben fehérjékhez kötött formában találhatók meg. A fehérje nagy mérete miatt csak az oldalláncokon keresztül tudnak kötődni.

A legfontosabb kötőhely a hisztidin oldalláncában megtalálható imidazol donorcsoport. A vele alkotott komplex szerkezetét befolyásolja a hisztidin elhelyezkedése, illetve a peptidet felépítő aminosavak oldalláncai.

Munkám során egy C-terminálisan védett, két hisztidint tartalmazó tetrapeptidet (His-Ala-Ala-His) szintetizáltam mikrohullámmal működő automata peptidszintetizáló készülékkel. A peptid tisztaságának ellenőrzése után a nikkel(II)-, cink(II)- és kadmium(II)-ionokkal alkotott komplexeit tanulmányoztam pH-potenciometriás, UV-látható- és CD-spektrószkópiás mérésekkel.

A pH-metriás mérések során 1:1 fémion-ligandum arányú komplexeken kívül biszkomplex és többmagvú komplex kialakulását is feltételeztük. Savas tartományban a fémion hisztaminszerűen kötődik a ligandumhoz. A pH-t emelve a C-terminális részen elhelyezkedő imidazolnitrogén deprotonálódása és koordinálódása figyelhető meg. Ezt követően a cink(II)- és kadmium(II)-HAAH rendszereknél csapadékkiválás volt megfigyelhető. A nikkel(II)komplexeknél a három amidnitrogén egy lépésben koordinálódik a fémionhoz. A ligandumfelesleg esetén nagy mennyiségben kialakuló biszkomplex a nagyobb pH tartományba tolja ezt a folyamatot. A három koordinálódott amidnitrogén és az aminocsoport telíti a nikkel(II)-ion koordinációs szféráját, így a $[\text{NiAH}_3]^-$ szerkezetnél már nem képes a C-terminális imidazolnitrogén kötődni a fémionhoz.

A Cu(II)-ion esetében lehetőség van hárommagvú komplex kialakulására is fémfelesleg jelenlétének.

7. Summary

Copper(II), zinc(II) and nickel(II) ions are essential trace elements for humans and animals. However cadmium(II) ion is similar but carcinogenic element. These metal ions are bound to proteins. Because of the large size of proteins metal ions can bind to the side chain donor atoms.

The most important binding site for transition metal ions is the imidazole donor group of the side chain in histidine. The structure of its complexes is determined by the number and location of histidine in the amino acid sequence and position of other side chains.

During my work I synthesized a C-termini protected tetrapeptide containing two histidine amino acids (HAAH). The synthesis was performed by means of automated microwave operating peptide synthesizer based upon the solid phase peptide synthesis. The purity of peptide was controlled by HPLC and ^1H NMR. I used pH-potentiometric, UV-vis-spectrophotometric and CD-spectroscopic methods for studies of nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes of the peptide.

Based on the pH-potentiometry data we supposed the formation of 1:1, bis(ligand) and polynuclear complexes. At acidic pH-range metal ions bind to the N-terminal part of the molecule (histamine-like coordination). Increasing the pH the imidazole ring on the C-termini is deprotonated and coordinated. Then in the zinc(II)- and cadmium(II)-HAAH solutions presence of precipitation was observed. In case of nickel(II) complexes at higher pH the deprotonation and coordination of the three amidnitrogens occur in one step. In case of excess of ligands the high amount of bis(ligand) complexes shifts this process in the higher pH-range. The coordination sphere of nickel(II) ion is saturated by the three amide nitrogens and the amino group. Thus the C-termini imidazole nitrogen cannot coordinate to the metal ion in the $[\text{NiAH}_3]^-$ structure.

In case of excess of copper(II) ions we suppose the formation of trinuclear complexes.

8. Felhasznált irodalom

1. Kiss T., Gajda T., Gyurcsik B., *Bevezetés a bioszervetlen kémiába*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2007)
2. Várnagy K., Sóvágó I., *Bioszervetlen kémia* (előadásanyag), Debreceni Egyetem
3. M. C. Linder and M. Hazegh-Azam, *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 63, no. 5, pp. 797–811 (1996)
4. R. O. Becker, A. A. Marino, *Electromagnetism & life*, State University of New York Press, Albany (1982)
5. H. R. Pohl, H. G. Abadin, and J. F. Risher, Neurotoxicity of Cadmium, Lead, and Mercury, in: *Metal ions in Life Science* vol. 1 (2006)
6. T. K.-Jankowska, H. Kozłowski, E. Farkas and I. Sóvágó: Nickel Ion Complexes of Amino Acids and Peptides, in: *Metal ions in Life Science* vol. 2 (2008)
7. Cs. Kállay, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, *Dalton Trans.*, 2006, 4545-4552
8. Cs. Kállay, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, *Inorganica Chimica Acta* 362 (2009) 935–945
9. I. Sóvágó, C. Kállay, K. Várnagy, *J. Coord. Chem.*, **256**, 2225-2233 (2012)
10. Zékány L., *pH-potenciometria* (oktatási segédanyag), Debreceni Egyetem
11. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1196 (1985)
12. L. Zékány, I. Nagypál, *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, (e.d.: D. J. Legett), Plenum Press, New York, 1985, pp 291-299
13. Fábián I., *Spektrofotometria* (oktatási segédanyag), Debreceni Egyetem (2009)
14. H. Sigel and R. B. Martin: *Chem. Rev.*, **82**, 385
15. C. R. Cantor, P. R. Schimmel, in: *Biophys. Chem.*, Vol. 2, Chapter 8 (1980)
16. dr. Kiss A., *Spektroszkópiai módszerek* (előadásanyag), Debreceni Egyetem
17. G. Gran, *Acta Chem. Scand.*, **4**, 559 (1950)
18. R. B. Merrifield, *J. Am. Chem Soc.*, **85**, 2149 (1963)
19. Merrifield B. ACS, *Washington, D.C.J.I.Seeman.Ed.* (1993)
20. Carpino L. A., Han G. Y., *J. Org. Chem*, **37**, 3404-3409 (1972)
21. Takács Gergely, *Két hisztidint tartalmazó tetrapeptid réz(II)-komplexeinek vizsgálata*, Szakdolgozat, Debrecen (2014)
22. Serfőző Dóra, *SOD-enzimet modellező peptidek szintézise és réz komplexeinek vizsgálata*, Diplomamunka, Debrecen (2012)

23. K. Várnagy, J. Szabó, I. Sóvágó, G. Malandrinos, N. Hadjliadis, D. Sanna and G. Micera, *J.Chem.Soc., Dalton Trans.*, 2000, 467-472
24. Huszenicza Gyöngyi, *Hisztidintartalmú tetrapeptid átmenetifém komplexeinek vizsgálata*, Szakdolgozat (2014)
25. Pósn Adrienn, TDK dolgozat (2014)
26. K. Várnagy, J. Szabó, I. Sóvágó, G. Malandrinos, N. Hadjliadis, D. Sanna and G. Micera, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2000, 467-472.
27. Duli Tímea, Multihisztidin peptidek nikkell(II)-komplexeinek vizsgálata, Szakdolgozat (2014)
28. K.Várnagy, J.Szabó, I.Sóvágó, G.Malandrinos, N.Hadjiliadis, D.Sanna and G.Micera, *J.Chem.Soc., Dalton Trans.*, 2939 (1994)

Köszönetnyilvánítás

Őszintén köszönöm témavezetőmnek, Dr. Várnagy Katalin egyetemi docensnek a munkám során nyújtott sokrétű, önzetlen segítségét, végtelen türelmét és megértését.

Köszönettel tartozom a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport minden tagjának a munkám során adott tanácsaikért, segítségükért és biztatásukért, valamint azért, hogy a munkám elvégzéséhez baráti légkört biztosítottak.

A kutatás a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0043 számú ENVIKUT projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.