

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT



-SXH- szekvenciát tartalmazó peptidek Ni(II)-komplexeinek hidrolízis-vizsgálata

Sándor Balázs

Vegyész Msc

II. évfolyam

Témavezető: Hőgyéné Dr. Grenács Ágnes
egyetemi adjunktus

Debreceni Egyetem

Természettudományi és Technológiai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

2021. november 18.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	- 1 -
2. Irodalmi előzmények	- 2 -
2.1 A nikkell koordinációs kémiai tulajdonságai és biológiai fontossága	- 2 -
2.2 Hisztidint tartalmazó peptidek koordinációs kémiája és biológiai jelentősége	- 3 -
2.3 -Ser-Xaa-His- és -Thr-Xaa-His- szekvenciát tartalmazó peptidek kémiai tulajdonságai Ni(II)-ionok jelenlétében	- 4 -
3. Az alkalmazott kísérleti módszerek.....	- 6 -
3.1 A mérésekhez használt vegyszerek.....	- 6 -
3.2 Szilárd fázisú peptidszintézis (SPPS)	- 7 -
3.3 pH-potenciometria	- 8 -
3.4 UV-látható spektrofotometria	- 9 -
3.5 Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia	- 10 -
3.6 Nagy nyomású folyadék kromatográfia (HPLC).....	- 11 -
3.7 Tömegspektrometria (ESI-TOF-MS)	- 11 -
4. Eredmények és értékelésük	- 13 -
4.1 Ac-Ser-Lys-His-Met-NH ₂ (Ac-SKHM-NH ₂)	- 13 -
4.2 Ala-Ala-Ala-Ser-Ser-His-NH ₂ (A ₃ SSH-NH ₂)	- 18 -
4.3 Ala-Ala-Ala-Ala-Ser-Ser-His-NH ₂ (A ₄ SSH-NH ₂)	- 26 -
5. Összefoglalás	- 35 -
6. Irodalomjegyzék	- 37 -

A dolgozatban előforduló rövidítések jegyzéke:

Ala, A	alanin
His, H	hisztidin
(ϵ -)Lys, (ϵ -)K	(ϵ -)lizin
Ser, S	szerin
Met, M	metionin
Ac	acetyl
ACN	acetonitril
Boc	terc-butoxi-karbonil
CD	cirkuláris dikroizmus
DCM	diklórometán
DIPEA	N,N-diizopropil-etilamin
DMF	N,N-dimetil-formamid
DODT	2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol
ESI	elektroporlasztásos ionizáció
Et ₂ O	dietiléter
Fmoc	9-fluorenil-metoxi-karbonil
HOBt	N-hidroxi-benzotriazol
HPLC	nagy nyomású folyadék kromatográfia
MS	tömegspektrometria
N ⁻	amidnitrogén
NH ₂	aminocsoport
N _{im}	imidazolnitrogén
NMP	N-metil-2-pirrolidon
NMR	mágneses rezonancia
SPPS	szilárd fázisú peptidszintézis
tBu	terc-butyl
TBTU	2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium-tetrafluoroborát
TFA	trifluorecetsav
TIS	triizopropil-szilán
TOF	repülési idő (time of flight)

1. Bevezetés

Az élőlények kiegyensúlyozott működéséhez elengedhetetlen az, hogy megfelelő mennyiségű nyomelem legyen a szervezetükben. Többek között ilyen nyomelemek közé tartoznak a következő fémionok is: Fe(II), Zn(II) és Cu(II). A szervezetben lejátszódó kémiai folyamatokban ezek a fémionok hajlamosak kölcsönhatásba lépni a fehérjékkel és a peptidekkel. Az ilyen fémionok meghatározott mennyiségben vannak jelen az élő szervezetekben így hiányuk, illetve többletük bizonyos degeneratív elváltozásokhoz vezethet.

Az embert felépítő alapvető vegyületek közé tartoznak az aminosavak, melyek peptidkötés kialakításával kapcsolódnak össze egymással. Az így képződött peptideket szekvenciájuk hossza alapján sorolhatjuk az oligopeptidek, a polipeptidek és a fehérjék csoportjába. Emellett kiemelt jelentőséggel bírnak az élő organizmusok biológiai folyamataiban a különböző enzimek, melyeknek többsége szintén fehérje alapú. Ilyen enzimek lehetnek az emberek esetén az amiláz-, lipáz-, kataláz- vagy a β -glükózidáz enzim is.

Az emberi gyomorban a *Helicobacter pylori* baktérium tartalmaz jelentős mennyiségű nikkell(II)-iont az ureáz enzimben. A *Helicobacter pylori*, a Ni(II)-homeosztázisa révén nem szolgáltat az emberi szervezetnek jelentős mennyiségű Ni(II)-fémiont, azonban a korábbi vizsgálatok mégis azt mutatják, hogy a diagnosztizált betegek 15 %-nál gyomorfekély és ugyan kevesebb mint 1%-nál, de gyomorrák is kialakult¹.

A nikkell(II) emellett allergiát válthat ki és karcinogén tulajdonságai is ismertek, aminek a következő bekezdésben említett jelenség is lehet az oka. A réz(II), mint biogén átmenetifémion koordinációs kémiai modelljeként is alkalmazható pl. NMR vizsgálatok során.

A kutatásunk célja az -SXH- aminosavszekvenciát tartalmazó peptidek és a Ni(II)-fémion kölcsönhatásának a tanulmányozása volt. Korábbi mérések és tanulmányok szerint, amely peptidben jelen van az imént említett szekvencia, annál a CD-spektrumok torzultak és a várthoz képest ellentétes előjelű sávok jelentek meg a Ni(II)-ionok jelenlétében, ami a szerkezet megváltozásra utal.

Munkámmal a *Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjának* munkájába nyílt lehetőségem bekapcsolódni, ahol több évtizede foglalkoznak peptidek tanulmányozásával. Ezen vizsgálatok az alap kutatás részét képezik, így például az itt elvégzett mérésekből származó adatokat felhasználva neurodegeneratív betegségek (pl.: Parkinson- vagy Alzheimer-kór) vagy daganatos megbetegedések kialakulásának okát, illetve annak kezelését is lehetőség nyílhat felkutatni.

2. Irodalmi előzmények

2.1 A nikkell koordinációs kémiai tulajdonságai és biológiai fontossága ²⁻⁴

A nikkell komplexeiben 0, +1, +2, +3 és +4 oxidációs állapotokban fordul elő. Emellett -1-es és -2-es oxidációs állapotban is képes fémorganikus vegyületekben létezni. A 0-ás oxidációs állapotú nikkelt tartalmazó komplexek mellett a +1-es és +3-as fémkomplexek is ismertek azonban azoknak előfordulása ritka. A fémion képes a +4-es oxidációs állapot felvételére is de ahhoz, hogy ebben az állapotban stabil maradjon speciális ligandumok szükségesek. A Ni(0)-komplexek d^{10} -es, a Ni(I)-komplexek d^9 -es és a Ni(III)-komplexek d^7 -es elektronkonfigurációval szerepelnek vegyületeikben.

Leggyakrabban +2-es oxidációs állapotban, d^8 elektronszerkezettel szerepel, ahol a fémiont négyes, ötös és hatos koordinációs szám jellemzi. A négyes koordinációs számmal rendelkező Ni(II)-komplexek közül a síknégyzetes geometria a legjellemzőbb. Ezeknek a komplexeknek a színe leggyakrabban sárga vagy vörös és az ilyen komplexek diamágnesesek. Előfordulnak még tetraédes geometriájú képviselői is a Ni(II)-vegyületeknek, melyek kék vagy zöld színűek és paramágneses tulajdonságúak. Az ötös koordinációs szám esetén a trigonális bipiramisos és a négyzetes piramisos geometria a jellemző. Hatos koordinációs számmal oktaédes vegyületeket képez a Ni(II)-ion. A fém vizes oldatában is hatos koordinációs számmal és oktaédes formában van jelen, ezáltal az ilyen geometriájú Ni(II)-vegyületek előállításuk a legkönnyebb.

A peptidek oldalláncon keresztüli koordinációjával oktaédes komplexek, míg az amidnitrogén belépésével a koordinációs szférába síknégyzetes, sárga színű és diamágneses tulajdonságú fémkomplexek képződnek. A koordináció során a Ni(II)-ion először az amino funkciók csoportjához koordinálódik, majd pH ~8 érték felett képes indukálni az amidnitrogén kooperatív deprotonálódását, abban az esetben, ha szabad az amino terminus és nincsenek oldalláncbéli koordinálódó donorcsoportok.

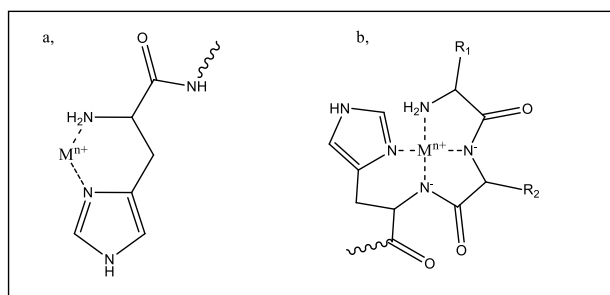
Biológiai szerepével kapcsolatos ismeretek az 1970-es évekre tekintenek vissza. A nikkellnek az élő szervezeteken belüli jelenlétéről és jelentőségéről nem tudtak konkrétumot 1975-ig. Ekkor azonosították egyértelműen azt, hogy az ureáz enzim jelentős mennyiségű nikkelt tartalmaz. Az ureáz enzim baktériumokban és növényekben lelhető fel, ahol a karbamid hidrolízisét katalizálja.

Az enzim aktív centrumában két Ni(II)-ion foglal helyet. Ezt követően több másik (baktériumokban fellelhető) enzimet találtak mely úgyszintén nikkeltartalommal rendelkezt: ezek a hidrogenázok, CO-dehidrogenázok. Továbbá a *Helicobacter pylori* baktérium életműködéséhez is nélkülözhetetlen ez a fémion, viszont fontos megjegyezni, hogy nagyobb mennyiségben emberi szervezetbe kerülve toxikus lehet és allergiás reakciót okozhat.

2.2 Hisztidint tartalmazó peptidek koordinációs kémiája és biológiai jelentősége⁵⁻⁹

A hisztidint tartalmazó peptidekhez igen nagy biológiai jelentőség tartozik, mert a hisztidin a képződő komplex stabilitását növeli és ezek a peptidek, illetve fehérjék gyakrabban fordulnak elő az élő szervezetekben. Az aminosav imidazol gyűrűje horgonycsoportként viselkedik több átmenetifémion megkötésében. Különösen nagy affinitást mutat az imidazol-horgony a Cu(II)- és a Ni(II)-ionokhoz. A képződő hisztidintartalmú peptidkomplexek stabilitását több tényező is befolyásolja. Legnagyobb hatással a komplexre a fémion és ligandum minősége, illetve mennyisége van, azonban a koordinációt befolyásoló horgonycsoporthoz viszonyított donoratomok helyzete és a terminális csoportok megléte is nagy jelentőséggel bír.

A hisztidint tartalmazó peptidek koordinációs kémiai sajátosságait többféleképpen is lehet osztályozni úgy, mint például a hisztidinek száma szerint a peptidben, a hisztidin helye az N-terminushoz viszonyítva, védett-e az N- vagy C-terminuson a peptid és ezek kombinációja. Az egy hisztidint tartalmazó szabad amino terminusú peptidek esetén az $-NH_2$ és a N_{im} is horgonyt biztosít a Ni(II)- és Cu(II)-fémionok számára. Abban az esetben, ha az N-terminus közvetlen környezetében van a hisztidin, akkor egy hisztaminszerű (1.a ábra) koordináció (NH_2, N_{im}) valósul meg egy rendkívül stabil hattaú kelátgyűrű képződésével.



1. ábra: Hisztaminszerű (a) és albuminszerű (b) koordináció

Az ilyen komplexek kialakulásával csökken az amidnitrogének deprotonálódásának a valószínűsége mert rendkívül stabil mono- és biszkomplexek jönnek létre. A ligandum fémionhoz viszonyított koncentrációjának függvényében képződhetnek $[ML]$ és $[ML_2]$ részecskék nikkell(II)- és réz(II)-ionokkal.

Azon peptidek esetén, ahol az -NH_2 funkciós csoporthoz viszonyítva a hisztidin a második helyet tölti be az aminosavszekvenciában a Cu(II)- és Ni(II)-fémionok mellett a Zn(II)-ionok megkötése is kedvezményezetté válik ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}$) kötésmóddal, 7-es pH körül.

A harmadik helyen hisztidinnel rendelkező és szabad N-terminusú peptidek tudják a legkedvezőbb módon megkötni a Ni(II)- és Cu(II)-ionokat. Ilyen feltételek mellett már enyhén savas pH-n $[\text{MLH}_2]$ összetételű komplex képződik. Az így létrejövő koordinációs módot albuminszerű koordinációnak hívják, (1.b ábra) melyben az ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}$) donoratomok vesznek részt.

A szabad amino terminushoz viszonyított negyedik vagy távolabbi pozícióban hisztidint tartalmazó peptidek esetében kisebb pH-n képződik egy makrokelát $[\text{ML}]$ komplex a(z) ($\text{NH}_2, \text{N}_{\text{im}}$) donoratomok részvételével. Emellett érdemes azt is tudni, hogy az aminocsoporttal kelátképző helyzetben lévő karboniloxigén is jelen lehet a fémion koordinációs környezetében. Az $[\text{ML}]$ komplex a kelátgyűrű tagszámának növekedésével kevésbé stabilá válhat. Emelve a pH-t a fémion indukálja az egymást követő amidnitrogének kooperatív deprotonálódását és $[\text{MLH}_3]$ fémkomplexet képez az aminotermus vagy a hisztidin imidazol nitrogénje felől. Hosszabb peptideknél ($\text{N}_{\text{im}}, 3\text{N}^-$) kötésmódot írtak le, míg a kisebb oligopeptidek esetén az aminotermus felőli koordináció a kedvezményezett ($\text{NH}_2, 3\text{N}^-$).

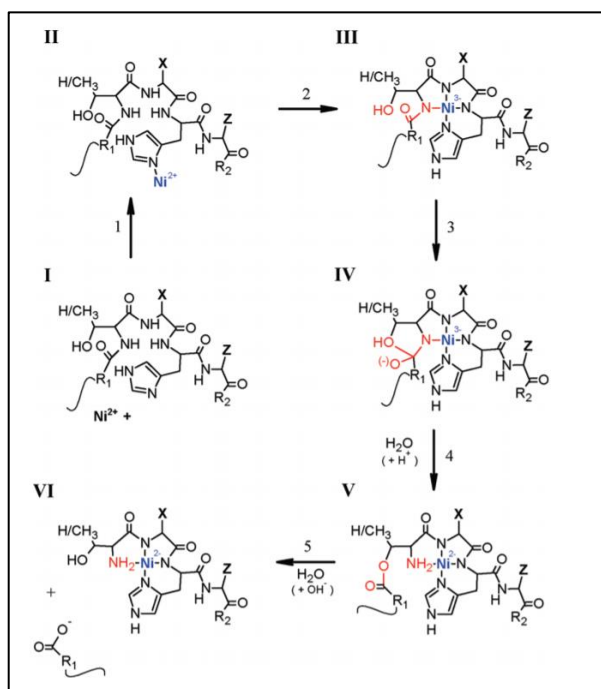
Ahogy azt az előző bekezdésekben láthattuk a hisztidin egy rendkívül jó komplexképző sajátságokkal rendelkező aminosav, az oldalláncbeli imidazol gyűrűjéből adódóan. Ezáltal számos biológiai rendszerben jelen van és fontos szerepet tölt be például a hemoglobin esetén az oxigénszállításban, mivel a globuláris fehérjerészben található hisztidin, a porfirin vázban elhelyezkedő Fe(II)-ionnal létesít kapcsolatot. Nagy a jelentősége az β -amiloidban, mert számos helyen tartalmazza a hisztidint a fehérje és biztosít ezáltal a szervezetben jelenlévő fémionoknak horgonyt a komplexek kialakításához. Továbbá az aminosav több helyen jelen van az élő szervezetekben előforduló, szuperoxid-dizmutáz enzimekben (CuZn-SOD, Fe-SOD, Ni-SOD), ahol a képződő szuperoxid gyökök bomlásának katalízise történik. De az emberi növekedési hormon dimerizációjában is két hisztidin és egy glutaminsav játszik fontos szerepet.

2.3 -Ser-Xaa-His- és -Thr-Xaa-His- szekvenciát tartalmazó peptidek kémiai tulajdonságai Ni(II)-ionok jelenlétében¹⁰⁻¹⁴

Több éve vizsgálják a -Ser/Thr-Xaa-His- (továbbiakban -(S/TXH)-) aminosavszekvenciához tartozó koordinációs kémiai anomáliák témakörét. Bizonyos -S/TXH- peptidekkel kapcsolatos elsődleges észrevételek azok voltak, hogy a nikkel(II)-iont tartalmazó rendszerekben más -Yaa-

Xaa-His- szekvenciákkal tapasztaltakhoz képest ellentétes előjelű sávok jelennek meg a CD-spektrumokban. Ez a jelenség a kialakuló fémkomplex szerkezetének megváltozására utal. Arra következtettek, hogy egy intermedier észter létrejötte és így egy szabad aminos csoport koordinációjának tudható be a várttól eltérő CD-spektrum. (2. ábra, V.)

Később hidrolízisre utaló jeleket is tapasztaltak, így több S/TXH-t tartalmazó vegyülettel kísérletezni kezdtek. A tanulmányok többségében HPLC-MS-technikával vizsgálódva azt állapították meg, hogy szobahőmérséklettől jóval magasabb hőmérsékleten, bázikus közegben, Ni(II)-ionok jelenléte esetén, hosszabb időtartam alatt a peptid specifikus hidrolízise játszódik le. A hidrolízis mechanizmusában látható (2. ábra), hogy az imént említett feltételek mellett a folyamat spontán végbemegy, egy átmeneti észterkötésen keresztül. A képződő termékek a szerint (vagy a treonint) megelőző peptidkötés hasításával alakulnak ki és szabad N-terminusú Ser-Xaa-His-R₂ peptid jön létre.



2. ábra: -S/TXH- szekvenciát tartalmazó peptidek Ni(II)-ionok által indukált hidrolízisének mechanizmusa

Továbbá fontos azt is megjegyezni, hogy a tanulmányozott peptidek esetén a hidrolízis csak órák múlva vagy a vizsgálat időtartama alatt egyáltalán nem következett be. Mértéke az említett befolyásoló tényezők (hőmérséklet, pH) növelésével arányosan változott, és attól is függött, hogy milyen egyéb aminosavak szerepelnek a koordinációs szférában és annak közvetlen környezetében. A fémion megszokottól eltérő környezete azonban továbbra is észlelhető volt a CD-spektruma révén.

3. Az alkalmazott kísérleti módszerek

3.1 A mérésekhez használt vegyszerek

A tanulmányozott rendszerek vizsgálata vizes oldatokban történt, a felhasznált vegyszerek analitikai tisztaságúak voltak és az oldatok háromszor ioncserélt vízzel készültek.

A pH-potenciometriás mérésekhez felhasznált KCl-, KOH-, és kálium-hidrogén-ftalát-oldat szilárd vegyszerekből készült. A használt HCl-oldat tömény savból lett hígítva háromszor ioncserélt vízzel. A KOH- és HCl-oldatok pontos koncentrációját pH-metriás titrálással határoztam meg, míg a nikkel(II)-oldat pontos koncentrációja gravimetriásan lett meghatározva.

A három vizsgált peptid közül az A₄SSH-NH₂-nek a szintézisét a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportban végeztem mikrohullámú Liberty 1 peptidszintetizátorral, míg az Ac-SKHM-NH₂ peptidet az olaszországi Consiglio Nazionale Delle Ricerche - Istituto Di Biostrutture e Bioimmagini (CNR-IBB, Catania) kutatóközpontban állították elő. Tisztaságuk 90% feletti volt. Az A₃SSH-NH₂ peptidet pedig a Synpeptide cég állította elő, tisztasága >95%. Minden esetben a peptidek TFA-sója állt rendelkezésre.

A peptidek előállítása során felhasznált vegyszerek és oldószerek kereskedelmi forgalomból származtak és analitikai tisztaságúak voltak. A Rink Amide AM gyantát, a 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium-tetrafluoroborátot (TBTU) és a Fmoc-védőcsoporttal ellátott aminosavakat (Fmoc-Ala-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH és Fmoc-Ser(tBu)-OH) a Novabiochem forgalmazza. Az N,N-dimetil-formamid (DMF), az N,N-diizopropil-etilamin (DIPEA) és a trifluorecetsav (TFA) a Merck Kft. termékei. Az N-hidroxibenzotriazol hidrátot (HOBt · H₂O), a triizopropil-szilánt (TIS), az N-metil-2-pirrolidont (NMP), a 2,2'-(etiléndioxi)-dietántiolt (DOT) és a 2-metil-2-butanolt a Sigma-Aldrich Co, forgalmazza. A diklórmétán (DCM), a dietil-éter (Et₂O) a 96%-os ecetsav és a piperidin a Molar Chemicals Kft., míg a szintézis során alkalmazott ecetsavanhidrid a VWR International terméke.

A HPLC-s méréseknél használt acetonitrilt (ACN) a VWR International, míg a trifluorecetsavat (TFA) a Sigma-Aldrich Co. forgalmazza. Emellett a poláris fázist (az eluensben) háromszor ioncserélt víz képezte. Mindhárom vegyszer HPLC-tisztaságú volt.

3.2 Szilárd fázisú peptidszintézis (SPPS)^{15,16}

A vizsgált peptidek egy részét szilárdfázisú szintézismódszerrel állítottuk elő. A módszer R. B. Merrifield nevéhez fűződik, mely 1984-ben került kidolgozásra. Az előállítás alapja egy speciális gyanta, mely egy finomszemcsés polimer anyag, ami mechanikailag és kémiaiilag is inertnek mondható az alkalmazott oldószerekkel és reagensekkel szemben. A szilárd hordozó egy olyan funkciós csoporttal rendelkezik, mely szelektíven képes kölcsönhatásba lépni a gyantához adagolt aminosavval és így a védőcsoportok lehasítását követően a megadott módszer szerint kapcsolja össze a kívánt szekvenciájú peptidet.

A fent írtakból adódóan a módszerről az mondható el, hogy rendkívül jó a reprodukálhatósága, az oldószerektől és reagensektől egy egyszerű szűréssel megszabadulhatunk és mindezt automatizálva, számítógépes vezérléssel tudjuk megtenni. Nehézséget jelent azonban a technika alkalmazásánál az, hogy a reakciók heterogén fázisban valósulnak meg, ami egy sokkal lassabb reakciót von maga után és sokkal több oldószert igényel, mint homogén oldatok esetén. A szintézis során a peptid végig a gyantához van kötve és a C-terminus felől halad a reakciók sora az N-terminus felé. Az aminosavakat egyesével adagoljuk a reakcióedénybe, amikor a gyanta, illetve az előző aminosav védőcsoportjának a hasítása már megtörtént. A megfelelő védőcsoportok alkalmazása elengedhetetlen a szelektív reakció kivitelezéséhez, így az aminosavak α -amino-csoportjának védelme érdekében Fmoc-csoport, a lizin oldalláncbeli amino-csoportjánál Boc-csoport, a hisztidin oldalláncbeli imidazolil csoport védelme céljából Trt-csoport, míg a szerin oldalláncbeli hidroxil-csoportja esetében tBu-csoport került alkalmazásra.

A peptideket a *Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén* található mikrohullámú Liberty 1 peptidszintetizáló készülékkel (CEM, Matthews, NC) állítottuk elő. A szintézishez a Rink Amide AM típusú gyantát választottuk, mely a C-terminusán savamid csoportot tartalmazó peptidek előállítását biztosítja. A szintézis során az oldószer DMF volt és az aminosavak aktiválása TBTU/HOBt/DIEA módszerrel történt.

Az oldatok betöltését követően a szintézis-program a gyanta duzzasztásával kezdődik (~15 perc), melyet a gyantán lévő Fmoc-védőcsoport eltávolítása követ. A hasítást a készülék 0,1 mol/dm³ koncentrációjú HOBt · H₂O és 20 V/V%-os piperidin-tartalmú DMF segítségével végzi, melyhez az emelt hőmérsékletet a mikrohullám segítségével biztosítja a készülék. Az Fmoc-védőcsoport hasításának sikerességét UV-monitoring egység segítségével ellenőrzi a készülék. Az aminosav 0,2 mol/dm³ koncentrációjú oldat formájában kerül adagolásra a reakcióedénybe. A kötések kialakítása a funkciós csoportok aktiválásával valósul meg: az

aktivátor 0,5 mol/dm³ HOBt és 0,5 mol/dm³ TBTU tartalmú DMF-oldat, míg az aktivátor bázis 2 mol/dm³ koncentrációjú DIPEA NMP-vel elegyítve. Az aminosavak gyantához, illetve az adott aminosav egységhez történő kapcsolása maximum 80 °C-on (a His esetén 50 °C-on és egyszer megismételve) megy végbe 300 másodperc alatt. Az aminosavak, reagensek és oldószerek maradékait a készülék DMF-es mosással, majd szűréssel távolítja el.

Az automatizált szintézist követően a gyantára kapcsolt peptid mosása történik a következő oldószerekkel: diklórmétán, 96%-os ecetsav, 2-metil-2-butanol és dietil-éter. A peptid gyantáról történő hasítása szobahőmérsékleten ~1,5 órán keresztül zajlik a következő hasítóeleggyel: 94% TFA, 2,5% TIS, 2,5% víz és az oxidációra érzékeny aminosav oldalláncok védelme céljából 1% DODT. A gyantáról lehasított peptid oldatot szűrjük, majd hűtés mellett, hideg éterbe csepegtetjük azt, és a peptid ekkor szilárd anyag formájában kiválik. A csapadékot további éterrel mossuk és centrifugáljuk, végül pedig argongázzal szárítjuk. A szilárd anyag minimális térfogatú vízben kerül feloldásra és fagyasztásra, majd liofilizálásra. Az előállított anyag egységességét nagy nyomású folyadékkromatográfiás módszer (HPLC), míg a szekvenciák helyességét ESI-MS mérés támasztotta alá.

3.3 pH-potenciometria

A pH-metria savak és bázisok pontos koncentrációjának, savi, illetve bázikus disszociációs állandójának meghatározására, illetve komplexképződési folyamatok egyensúlyi állandóinak megállapítására szolgáló indirekt potenciometriás módszer. Fontos megjegyezni, hogy pH-metriáról, csak oldatfázisban beszélhetünk. A módszer során a pH-változást mérjük a mérőoldat térfogatának függvényében. Az így kapott titrálási görbéből meghatározhatjuk a ligandumok protonálódási és a képződő komplexek stabilitási szorzatát.

A H⁺-ion és az M^{m+} fémion közötti kompetíciós folyamat reakcióegyenlete és a fémkomplex képződése:



Vizes oldatokban, fémionnal történő komplexképződési folyamat általános reakcióegyenlete (a könnyebb kezelhetőség érdekében a részecskék töltését nem tüntettem fel):



Az egyenlet alapján a képződő komplexek stabilitási szorzata:

$$\beta_{pqr} = \frac{[\text{M}_p\text{L}_q\text{H}_r]}{[\text{M}]^p [\text{L}]^q [\text{H}]^r} \quad (3)$$

A potenciometriás méréseket az Ac-SKHM-NH₂, A₃SSH-NH₂ és A₄SSH-NH₂ ligandumok protonálódási állandóinak meghatározásának céljából végeztük. Ezt követően ligandumfelesleg mellett, sztöchiometrikus mennyiségű és fémfelesleget is tartalmazó nikkell(II)-fémiont tartalmazó rendszereket állítottam össze, majd az ezekben a rendszerekben képződő részecskéknek határoztuk meg a stabilitási szorzatait. A méréseket MOLSPIN pH-mérővel, 6.0234.100 (Metrohm) kombinált üvegelektóddal és Mol-AcS mikrobürettával végeztük. A mérőoldat ($c_{\text{KOH}} = \sim 0,2 \text{ M}$) koncentrációját előzetesen pontosan meghatároztuk. Az adatok rögzítését és a mérőoldat adagolását is a MOLSPIN számítógépes program vezérelte. A mintát 25 °C-on termosztáltuk és mágneses keverőmaggal kevertettük a titrálás ideje alatt. A mérés alatt a minta és a mérőoldat felé argon gázt vezettünk, hogy inert gázatmoszféra alatt mehessen végbe a titrálás, azaz kizárhassuk a levegő CO₂- és O₂-tartalmának befolyásoló hatását. Az elektród kalibrációját 0,050 M-os kálium-hidrogén-ftalát oldattal végeztük, melynek a pH értéke 4,005, 25 °C-on.

A titrálendő mintákat a ligandumok (Ac-SKHM-NH₂, A₃SSH-NH₂, A₄SSH-NH₂) előzőleg megsavanyított törzsoldataiból készítettük beméréssel, majd 1 M-os KCl-oldatot adtunk hozzá, hogy az ionerősség állandó maradjon a titrálás ideje alatt. A mintákban a ligandum koncentrációja 2 mM volt. A pH-metriás titrálási görbe pontjai alapján meghatároztuk a pontos ligandum koncentrációkat és deprotonálódási állandóit a SUPERQUAD program segítségével. Az Irving-faktor kiszámításával és a mért pH értékek korrigálásával a diffúziós potenciálból származó pontatlanságokat küszöböltük ki. A fémiont tartalmazó rendszerek és a ligandum potenciometriás mérésénél is a minták kezdeti térfogata 3 ml volt az Ac-SKHM-NH₂ esetén és 4 ml volt az A₄SSH-NH₂-nél, valamint az A₃SSH-NH₂-nél. A MOLSPIN program által rögzített titrálási adatok és koncentrációk ismeretében PSEQUAD-programmal meghatároztuk a képződő komplexek stabilitási szorzatait. A komplexek eloszlási diagramjait a MEDUSA nevű programmal ábrázoltuk.

3.4 UV-látható spektrofotometria

Az UV-látható fotometriás módszerrel a Ni(II)-fémion tartalmú rendszerek kiválóan tanulmányozhatók, hiszen az átmenetifém-komplexekben d-d elektronátmenetek játszódnak le. Ezeknek az átmeneteknek megfelelően karakterisztikus fényelnyelés is megvalósul, ami a kvalitatív vizsgálatok alapját képezheti. Így tudunk következtetni a komplex szerkezetére, geometriájára és a donoratomok számára, valamint kémiai jellegére. A módszerrel lehetőség nyílik oldatok koncentrációjának kiszámítására is, azaz a kvantitatív analízisre, azonban ehhez kalibráló oldatsorozat készítése, és azokból kalibráló egyenes felvétele szükséges. A

koncentráció, az abszorpciós koefficiens és az abszorbancia között a Lambert-Beer törvény teremt kapcsolatot:

$$A = \lg \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (4)$$

ahol ε a moláris abszorpciós koefficiens ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), c a koncentráció (M), l a kuvetta hossza, ami általában 1 cm.

A moláris abszorbancia az anyagi minőségre jellemző, koncentrációtól független érték. Az abszorpciós spektrumból következtethetünk az anyag szerkezetére, az atomok és molekulák sajátosságaira, komplexek szerkezetére. Az UV-látható spektrofotometriás méréseket Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras fotométerrel végeztem. Az 1,000 cm-es kvarcküvetákban különböző fémion-ligandum arányokat vizsgáltam. A Ni:A₃SSH-NH₂ és Ni:A₄SSH-NH₂ 1:2, 1:1 és 2:1 arányú rendszerek esetén a c_L 2,0 mM volt. A vizsgálatok hullámhossz tartománya 200-1100 nm, pH tartománya pedig ~2,5-11,5 volt.

3.5 Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus spektroszkópia (vagy röviden: CD-spektroszkópia) egyike azoknak a spektroszkópiai módszereknek, amely a polarizált fény és egy optikailag aktív anyag kölcsönhatásán alapszik. Az élő szervezetek által szintetizált molekulák döntő többsége, így a peptidek is optikailag aktívak, azaz az oldatukon keresztül bocsátott polarizált fény síkját elforgatják. A síkban polarizált fénynyaláb egy balra és egy jobbra cirkuláló komponensre bontható fel, melyeknek fázisa és amplitúdója azonos. A kétféle fénysugár abszorpciójának különbségét ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{bal}} - \varepsilon_{\text{jobb}}$) a hullámhossz függvényében ábrázolva megkapjuk a CD-görbét. Tehát a CD vagy más néven a Cotton-effektus a síkban polarizált fény két összetevőjének különböző abszorpciója. Nagy előnye a módszernek, hogy a kapott spektrumok értékei additívak, így könnyen lehet velük számításokat végezni.

Az átmenetifém-komplexek optikai aktivitása a komplex molekulának vagy a ligandumnak az aszimmetriájából következik. Királis komplexek általában akkor jönnek létre, ha a komplexek kelátgyűrűket tartalmaznak. Az enantiomerek akkor valósulhatnak meg, ha a komplexben lévő fémion kinetikailag inert komplexek kialakítására hajlamos. A komplex molekula optikai aktivitását okozhatja a központi atom aszimmetriája, vagy a komplexképződés hatására a ligandum donoratomján kialakuló aszimmetria.

A méréseket JASCO-810 típusú készüléken végeztem a Ni(II):Ac-SKHM-NH₂, Ni(II):A₃SSH-NH₂ és Ni(II):A₄SSH-NH₂ különböző arányú rendszereiben kialakuló komplexek szerkezeteinek vizsgálatának céljából. A Ni(II):Ac-SKHM-NH₂ 1:1 arányú

rendszer esetén a $c_L \sim 2$ mM volt. A Ni(II):A₃SSH-NH₂, Ni(II):A₄SSH-NH₂ vizsgált rendszereiben a $c_L \sim 2$ mM volt. A spektrumokat szobahőmérsékleten és különböző pH értékeken vettem fel. A méréseket 0,100 cm és 1,000 cm úthosszú kvarc küvettákban végeztük. A spektrumokat Microsoft Office Excel programban ábrázoltuk.

3.6 Nagy nyomású folyadék kromatográfia (HPLC)

A mintákban jelenlévő részecskék igazolásához (megfelelő standard-ek ismeretében) és a lejátszódó folyamatok követéséhez az egyik leghatékonyabb módszer a HPLC. A mérések során minőségi vizsgálatokat végeztünk, de fontos azt is megjegyezni, hogy mennyiségi vizsgálatokhoz is felhasználható a módszer a csúcsok alatti terület integrálértékeinek és az injektált térfogatnak az ismeretében. A Ni(II):Ac-SKHM-NH₂, Ni(II):A₃SSH-NH₂ Ni(II):A₄SSH-NH₂ vizsgált rendszereiben a ligandum koncentrációja $\sim 2,0$ mM volt. A kvalitatív vizsgálatokat analitikai Teknokroma C8 típusú kolonnán (250 mm x 4,6 mm, pórusméret: 300 Å, szemcseméret: 5 µm) és Jasco MD-2010 plus diódasoros detektorral rendelkező Jasco HPLC-készüléken végeztük. A detektálás hullámhossz értéke 222 nm volt. Azért használtuk ezt a hullámhossz értéket mert ezen van maximális fényelnyelése a peptidkötésnek. A mérésekhez 0,1 V/V% TFA-t tartalmazó desztillált vizet és 0,1 V/V% TFA-t tartalmazó acetonitrilt alkalmaztunk eluensként. Az áramlási sebesség 0,8 ml/perc volt. A Ni(II):A₃SSH-NH₂ és Ni(II):A₄SSH-NH₂ rendszerek esetén gradiens elúciót alkalmaztunk ahol 0-25-0% MeCN volt a gradiens profilja. A Ni(II):Ac-SKHM-NH₂ esetén izokratikus elúciós technikával dolgoztunk, ahol 3% MeCN-t tartalmazott az eluens a víz mellett. A mérések ideje 30 perc volt. Kiértékeléshez a ChromNav programot használtuk.

3.7 Tömegspektrometria (ESI-TOF-MS)

Az előállított peptidek és a fémkomplexek azonosításához kiváló módszert biztosít a tömegspektrometria. A vizes oldatok elektroporlasztásos ionizáció segítségével lettek gázhalmazállapotúvá alakítva. A képződött részecskék lágy ionizáción mentek keresztül, tehát a fragmentáció olyan kis mértékben következett be, hogy a kapott jelekhez a komplexek direkt molekulatömegei hozzárendelhetők. A mérés során a csúcsok intenzitás értékeit rögzítették a tömeg/töltés (m/z) függvényében. Az m/z értékekből és a hozzájuk tartozó izotópeloszlásból a részecskék azonosíthatóvá váltak.

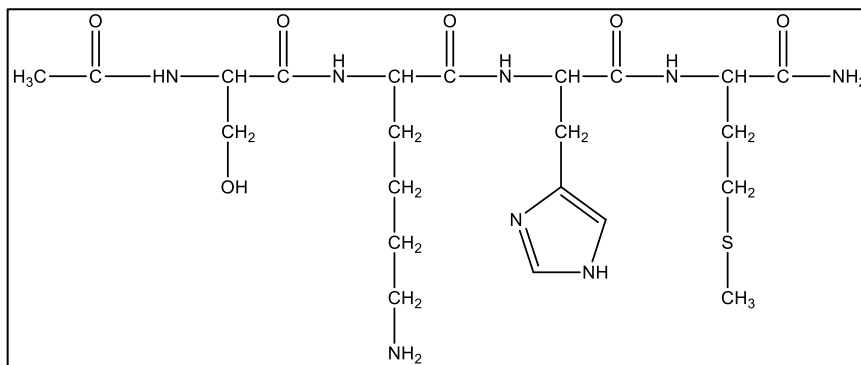
A méréseket a *Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék* maXis II UHR ESI-TOF MS (Bruker)-típusú készülékén végezték, az adatfeldolgozást Compass DataAnalysis-szoftverrel értékeltük ki. A ligandumoknak csak a negatív töltésű Ni(II)-komplexeit vizsgáltuk, így az ESI-MS spektrumokat negatív módban rögzítették.

A módszerrel a Ni(II):A₃SSH-NH₂ és Ni(II):A₄SSH-NH₂ 2:1 arányú rendszereit vizsgáltuk. A ligandum koncentrációja az oldatban 0,01 mg/ml volt. Az oldathoz a fémionfelesleget 0,1 M koncentrációjú NiCl₂-oldatból adtuk. A pH értékét ~0,2 M koncentrációjú KOH-oldattal állítottuk be.

4. Eredmények és értékelésük

A dolgozatomban vizsgált három peptid az Ac-Ser-Lys-His-Met-NH₂ (Ac-SKHM-NH₂) tetrapeptid, az Ala-Ala-Ala-Ser-Ser-His-NH₂ (A₃SSH-NH₂) hexapeptid és az Ala-Ala-Ala-Ala-Ser-Ser-His-NH₂ (A₄SSH-NH₂) heptapeptid volt. Mindhárom peptidet Ni(II)-ionok jelenlétében vizsgáltuk. Célunk az -SXH- szekvencia és a Ni(II)-ionok együttes jelenlétének tanulmányozása volt.

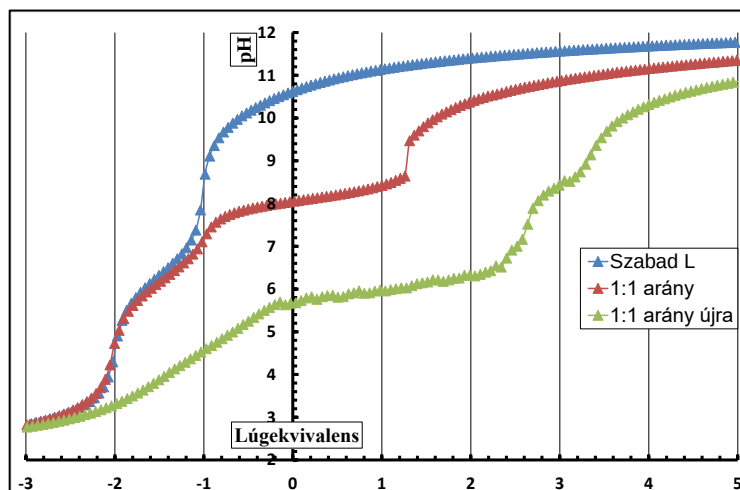
4.1 Ac-Ser-Lys-His-Met-NH₂ (Ac-SKHM-NH₂)



3. ábra: Ac-SKHM-NH₂ szerkezete

Ennek a mindkét terminusán védett tetrapeptidnek korábban már megtörtént a pH-potenciometriás vizsgálata a kutatócsoportban, leírták a disszociációs folyamatait és a nikkell(II)komplexeinek stabilitási állandóit. A további jellemzés könnyebb megértése érdekében bemutatom az ezzel kapcsolatos eddigi eredményeket. A szabad ligandum (Ac-SKHM-NH₂) két disszociálabilis protont tartalmaz a hisztidin imidazóliumionja és az ϵ -ammóniumion révén a lizin oldalláncában. (3. ábra) Az Ac-SKHM-NH₂ peptid titrálási görbéjén azonban csak egy ekvivalens lúg fogyása figyelhető meg egy erős sav - erős lúg titrálásához képest (4. ábra), ami a hisztidin oldalláncához rendelhető korábbi irodalmi értékek alapján. Az ϵ -ammóniumion deprotonálódása csak az erősen lúgos tartományban következik be. (1. táblázat) Az Ac-SKHM-NH₂, koordinációs kémiai szempontból vett potenciális kötőhelyei a hisztidin imidazol nitrogénatomja (N_{im}) és az amidnitrogének (N⁻), melyek a pH emelésével képesek deprotonálódni bizonyos fémionok jelenlétében.

A Ni(II):Ac-SKHM-NH₂ 1:1 arányú rendszer titrálási görbéjén (piros színű) az látható, hogy pH=6,5 alatt a görbék teljesen illeszkednek és ebből arra lehet következtetni, hogy a rendszerben lévő Ni(II)-ionok nem indítanak el kisebb pH-n a szabad ligandumétól eltérő lúgfogyasztó folyamatot.



4. ábra: Az Ac-SKHM-NH₂ (Szabad L) és ekvimoláris Ni(II)-iont tartalmazó rendszer titrálási görbéje, illetve annak ismétlése (c_L~2 mM)^{(*)1}

Az imént említett pH érték felett a görbék elválnak egymástól és az ekvimoláris rendszer titrálási görbéjén egy platószerű szakasz figyelhető meg. Ennek az a magyarázata, hogy a Ni(II)-ionok indukálják az amidnitrogének kooperatív deprotonálódását 8-as pH érték körül.

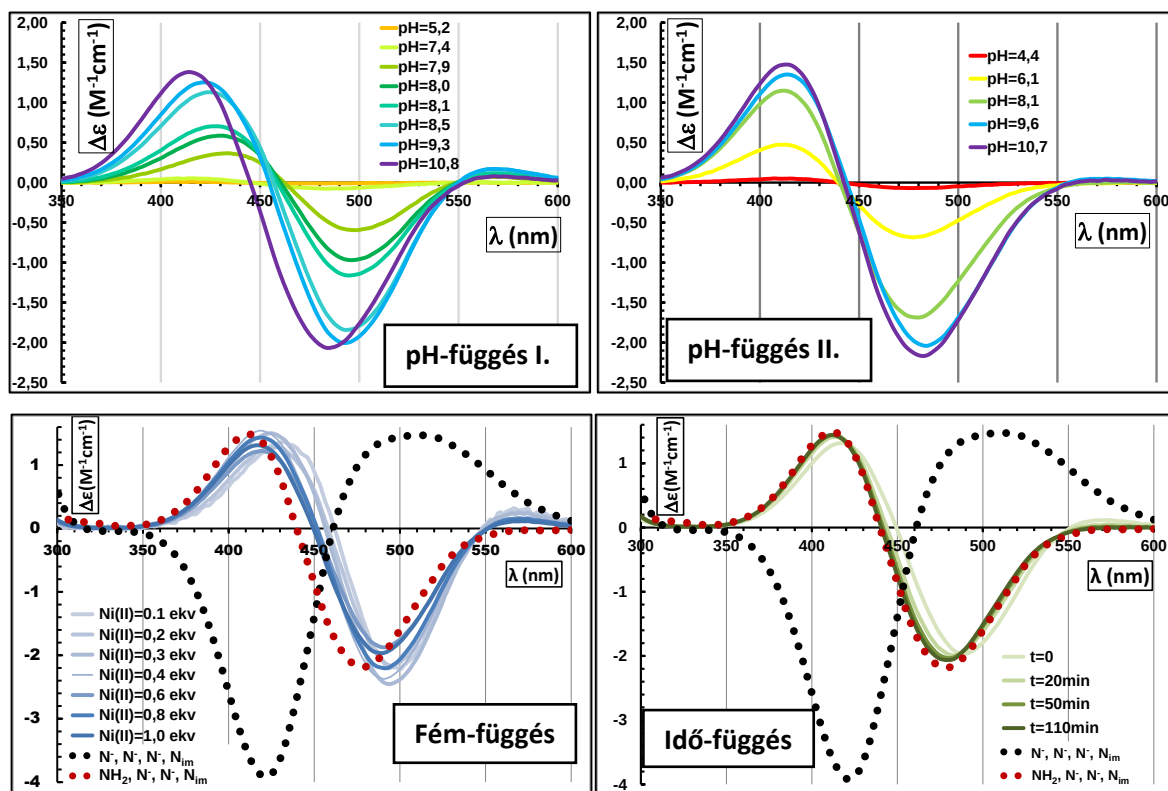
Részecske	Mért ^{(*)2}		Irodalom ¹⁷	
	lgβ	pK	lgβ	pK
[HL] ⁺	10,23(1)	10,23	10,33	10,33
[H ₂ L] ²⁺	16,47(1)	6,24	16,56	6,23
[NiLH] ³⁺	12,51(13)	-	-	-
[NiL] ²⁺	5,04(7)	7,47	-	-
[NiLH ₂]	-10,78(3)	7,91	-	-
[(NiLH ₃) ⁻] [#]	-21,19(7)	10,41	-	-

1. táblázat: Az Ac-SKHM-NH₂ ligandum deprotonálódási állandói és a Ni(II):Ac-SKHM-NH₂ 1:1 arányú rendszerben képződő Ni(II)-komplexek stabilitási szorzatai^{(*)2}

Az oldatban képződő részecskéket az 1. táblázatban feltüntetett deprotonálódási állandó és stabilitási szorzat értékekkel lehet jellemezni, melyet a titrálási adatok felhasználásával kaptak. Fontos megjegyezni azt, hogy a #-el jelölt [NiLH₃]⁻ részecske csak úgy volt leírható, hogy ha a másik három nikkelkomplex stabilitási állandó értékeit konstansként vették figyelembe a számítás során. Feltételezve, hogy a titrálás ideje alatt a peptid hidrolízise is bekövetkezhet a rendszerben,¹⁰ indokolt volt ugyanannak a mintának az ismételt titrálását elvégezni azonnali visszasavanyítást követően (zöld színű titrálási görbe). A különbség szembeűnő: a titrálási görbék már pH~3,5 körül elválnak egymástól. A síknégyszetes, koordinált amidnitrogént is tartalmazó nikkel(II)-komplexek képződését már 6-os pH körül jelzi az oldat sárga színe. A titrálások időtartama kb. 3 óra volt.

(*)1: nem publikált eredmény

(*)2: nem publikált eredmény



5. ábra: Ni(II):Ac-SKHM-NH₂=1:1 arányú rendszer CD spektrumai (c_L~2 mM)

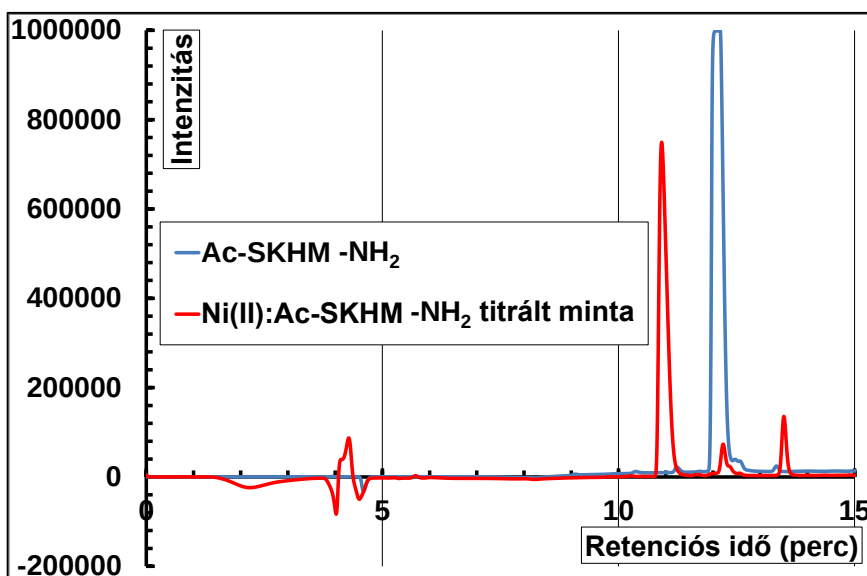
A rendszert CD spektrumok segítségével is kívántuk jellemezni és a pH-potenciometriás vizsgálatokhoz hasonlóan az első titrálást követően a visszasavanyított mintáról újból felvettük a CD-görbéket. (5. ábra, pH-függés I. és II.) A szemléletesség kedvéért a két CD-spektrumsorozaton azonos színnel jelöltem a hasonló pH-n rögzített görbéket. A 5. ábrán (pH-függés I.) látható, hogy pH=7,4-ig nincs jelentős CD-aktivitás, csak a [NiLH]³⁺ részecske van jelen az oldatban. A pH=7,9-nél megjelenő CD aktivitás az amidkoordinált részecskék képződését mutatja, melynek intenzitása a pH emelésével növekszik és a spektrum szélsőértékei tolódnak a kisebb hullámhossz irányába. Visszasavanyítva a mintát és azonnal megismételve annak a titrálását (pH-függés II.), az tapasztalható, hogy jóval kisebb pH-n (pH=6,1) jelenik meg CD-aktív részecske a rendszerben és a sávok nem tolódnak, csak az intenzitásuk nő. Ez arra utal, hogy az újratitrálás során stabilabb kötésmóddal rendelkező komplex képződik kisebb pH-n, (ezzel alátámasztva a pH-metriás vizsgálat eredményét), aminek a szerkezete nem, csupán a mennyisége változik a pH emelésével. A szerint ebben a pozícióban nem tartalmazó ligandumok esetén a fekete pontokkal jelölt görbét kapjuk nagy pH-n, (N⁻, N⁻, N⁻, N_{im}) kordináció esetén.

A tetrapeptid fémfüggésének vizsgálatát úgy végeztem, hogy 0,1 ekvivalens Ni(II)-fémiont tartalmazó oldatrészleteket adagoltam a pH~10-es peptid törzsoldathoz, majd a fémion-oldat hozzáadását követően az oldatnak a pH értékét 0,2 M-os KOH-val

visszaállítottam pH~10-re. A 0,1 M Ni(II) ekvivalensek és a lúgos közeg hatására, a pH-függés vizsgálatától eltérően, közvetlenül tudott képződni az amidkoordinált részecske. A fémion-ekvivalensek hozzáadásával arányosan megfigyelhető, hogy a görbe szélsőértékei hipszokróm eltolódást szenvednek és minimálisan változik a lefutása. Amint elértem az 1 ekvivalenst, hagytam a mintát a CD spektropolariméterben és bizonyos időintervallumonként felvettem a CD görbéjét az ekvimoláris rendszernek. (5. ábra, Idő-függés) Ennél a kísérletnél azt tapasztaltam, hogy ~2 óra alatt 20-30 nm-t változnak a görbe szélsőértékei, ami összhangban van a pH-függésnél kapott CD-spektrumokkal és pH-potenciometriás vizsgálatokkal. Ezek a minimális változások azonban nem tudhatók be jelentős szerkezeti különbségnek, pusztán a lassú komplexképződésnek, a spektrumok állandónak mondhatók. Kutatócsoportunkban korábban mért két modell peptid CD-görbéjét ábrázoltam együtt a felvett spektrumokkal (piros és fekete színű pontozott görbék), hogy megállapítsam mely kötésmód valósul meg az Ni(II):Ac-SKHM-NH₂ 1:1 rendszer esetén.

A várt (N⁻, N⁻, N⁻, N_{im}) kötésmód CD-görbéje teljesen különbözik a mért spektrumtól és az albuminszerű (NH₂, N⁻, N⁻, N_{im}) koordinációval pedig szinte 100%-ban egyező görbét kaptunk, ami igazolja a szerkezet jelentős megváltozását és a visszasavanyított és ismételt titrált mintáknál tapasztalt kisebb pH-n képződő stabilabb komplexek jelenlétét.

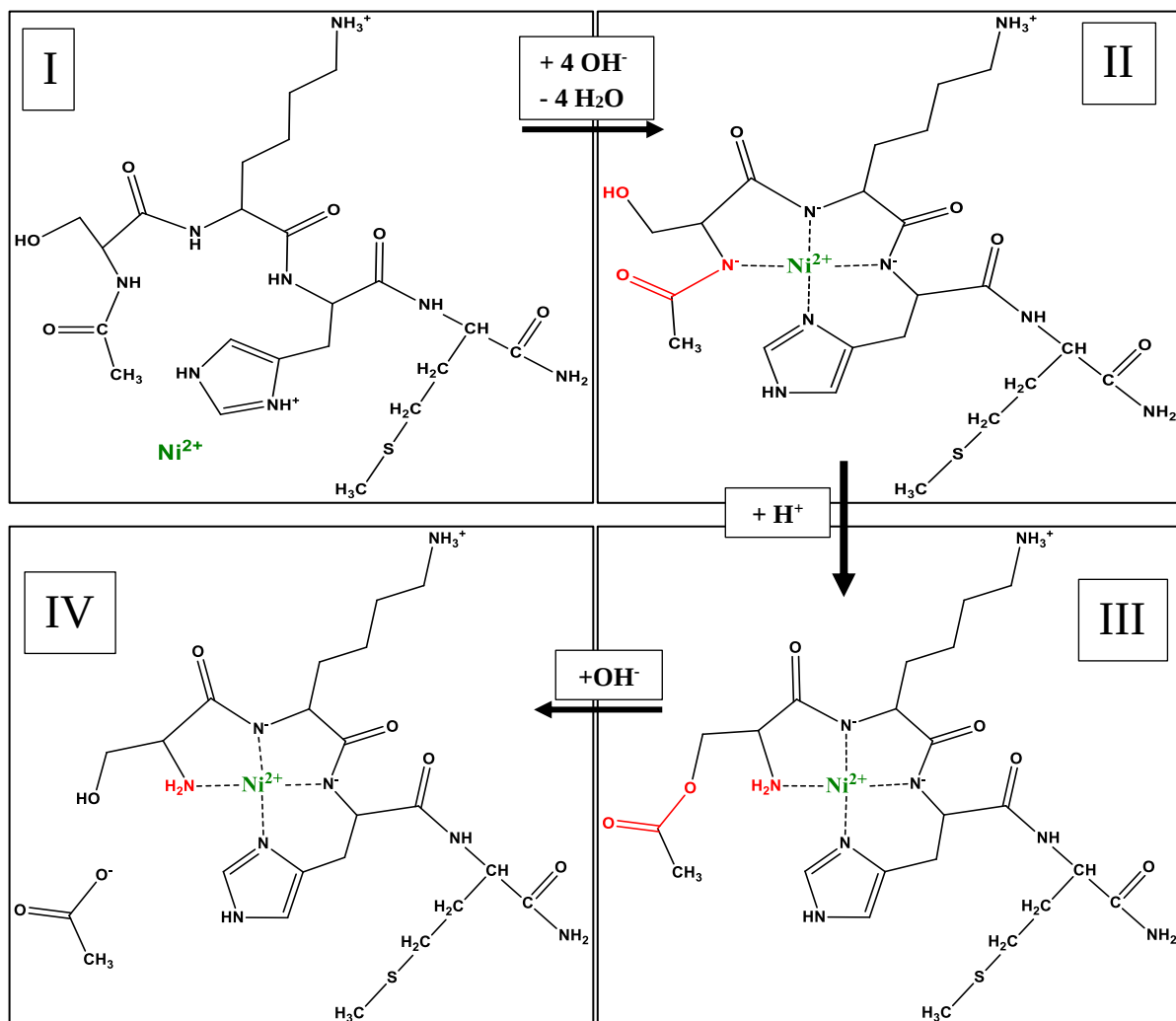
Ezen a ponton biztosak voltunk abban, hogy 2. ábrán látható reakciómechanizmus, V. intermediere képződik ebben a rendszerben, de annak igazolására, hogy hidrolízist szenved-e a ligandum, elveszíti-e az acetil védőcsoportját vagy sem, HPLC vizsgálatokat végeztünk.



6. ábra: Az Ac-SKHM-NH₂ és Ni(II):Ac-SKHM-NH₂=1:1 arányú minta titrálását követő HPLC kromatogramjai (c_L~2 mM)

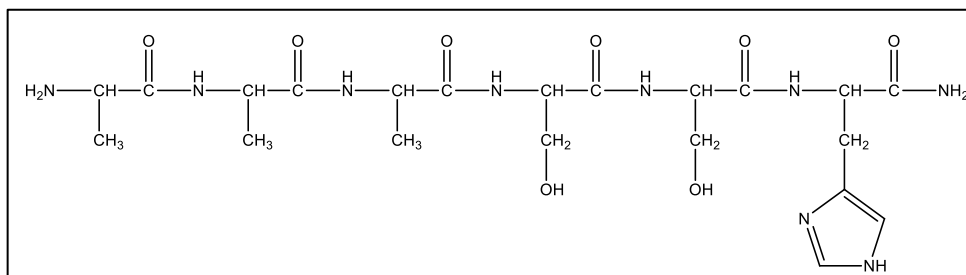
Elsőnek az Ac-SKHM-NH₂ peptid törzsoldatából injektáltunk a folyadékkromatográfiás rendszerbe, mely kék színnel látható a 6. ábrán. A tetrapeptidnek a csúcsa 12 perces retenciós időnél volt detektálható. Ezt követően egy ekvivalens nikkel(II)-iont tartalmazó titrált mintának vettük fel a kromatogramját (piros szín). A HPLC kromatogramok egyértelműen mutatják, hogy irreverzibilis folyamat játszódik le szinte teljes mértékben a titrálás ideje alatt. A tény, hogy kisebb retenciós időnél tapasztaljuk a titrált mintában jelentkező új csúcsot arra enged következtetni, hogy a szabad ligandumtól polárisabb a képződő termék.

Mindez összhangban van az irodalomban is megfogalmazott tapasztalattal, miszerint nikkel(II)-ionok jelenlétében az -SXH- szekvenciájú peptidok hidrolízise bekövetkezhet, a szerint megelőző amidkötésnél, stabil, albuminszerű koordináció létrejöttével. A képződő szabad amino terminusú SKHM-NH₂ peptid polárisabb, mint az eredeti, acetil csoporttal védett ligandum és a másik termék ebben az esetben egy ecetsav molekula. Az eredményeink bizonyítják, hogy a peptid nagyfokú és irreverzibilis hidrolízise nagyon rövid idő alatt, szobahőmérsékleten megtörtént, ami befolyásolja az oldategyensúlyi vizsgálatok eredményét.



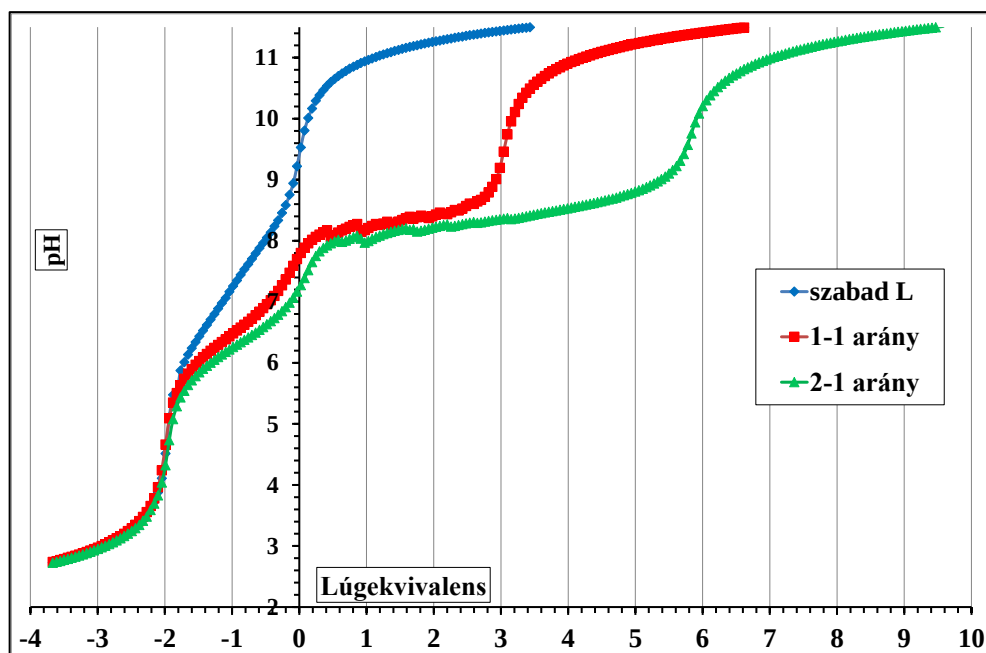
7. ábra: Ac-SKHM-NH₂ Ni(II)-indukált hidrolízisének mechanizmusa

4.2 Ala-Ala-Ala-Ser-Ser-His-NH₂ (A₃SSH-NH₂)



8. ábra: Ala-Ala-Ala-Ser-Ser-His-NH₂ (A₃SSH-NH₂) szerkezete

Az A₃SSH-NH₂-nél két deprotonálódásra képes csoportról beszélhetünk. Az egyik az amino funkciós csoport mely 8 körüli pK értékkel rendelkezik, míg a másik az imidazólium funkciós csoport melynek pK értéke 6,5 körül van. Az ábrán látható peptid védett C-terminussal rendelkezik, így a koordinatív kötések kialakulásának a lehetséges helyei: a terminális amino funkciós csoport nitrogén atomja, az öt amidnitrogén és az imidazol csoport nitrogén atomja.



9. ábra: Az A₃SSH-NH₂ (szabad L), Ni(II):A₃SSH-NH₂=1:1, 2:1 arányú rendszer titrálási görbéje (C_L~2 mM)

A szabad ligandum (A₃SSH-NH₂) titrálási görbéjén az látható, hogy a peptid két ekvivalens lúg hozzáadására teljesen deprotonálttá válik, bekövetkezik az ammónium- és imidazólium funkciós csoportok disszociációja.

A titrálási adatokból meghatározott stabilitási szorzatokat az irodalmi értékekkel összevetve megállapítható, hogy a ligandum két pK értéke nagy hasonlóságot mutat a Gly₅His és DAEFRH-NH₂ (A_β (1-6)) peptidek két nagyobb pK értékével. Az összehasonlítás alapját azt

képz, hogy a peptidek szabad amino terminussal rendelkeznek és a hisztidin a hatodik helyen foglal helyet az aminosav szekvenciában mindhárom esetben.

	A ₃ SSH-NH ₂		Gly ₅ His ¹⁸		DAEFRH-NH ₂ ¹⁹	
Részecske	lgβ	pK	lgβ	pK	lgβ	pK
[HL]	8,00(1)	8,00	8,00	8,00	7,59	7,59
[H ₂ L]	14,44(2)	6,44	14,87	6,87	13,86	6,27
[H ₃ L]	-	-	17,73	2,96	18,04	4,18
[H ₄ L]	-	-	-	-	20,85	2,81

2. táblázat: Gly₅His¹⁸, Aβ (1-6)¹⁹, A₃SSH-NH₂ deprotonálódási állandói

A Gly₅His esetén jelen van egy [H₃L] részecske, ami eltér az A₃SSH-NH₂-től. Ennek a [H₃L] részecskének a jelenlétét a terminális karboxil csoport eredményezi. Az DAEFRH-NH₂ esetén azért beszélhetünk négy részecskékről, mert a két oldalláncbeli karboxilátcsoport sav-bázis folyamataival is számolni kell. Ezek a további oldalláncok enyhén befolyásolhatják a bázikus funkciós csoportok deprotonálódását is.

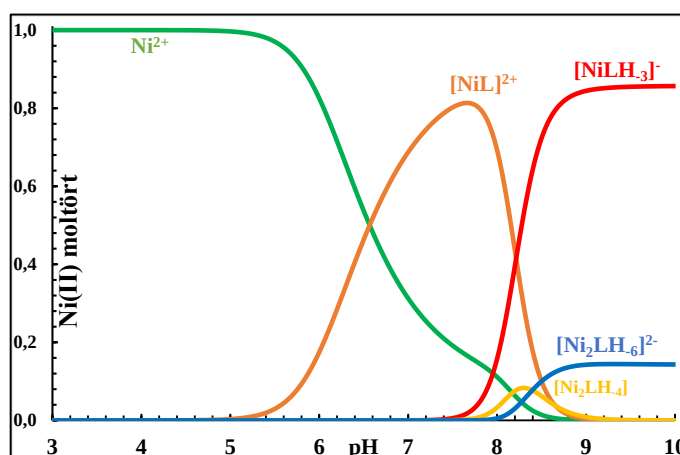
A Ni(II):A₃SSH-NH₂ 1:1 arányú rendszernél 5,7-es pH-ig a görbe teljes egészében illeszkedik a szabad ligandum titrálási görbéjéhez. 5,7-es pH felett a két görbe elválk egymástól, megkezdődik a komplexképződés és egy platószerű szakaszban 3 extra ekvivalens lúg fogy a szabad ligandumhoz viszonyítva. A Ni(II):A₃SSH-NH₂ 2:1 arányú rendszer esetén is pH=5,7 felett válnak el egymástól a titrálási görbék. A szabad ligandumhoz képest 6 extra ekvivalens lúg fogyása figyelhető meg, egy hosszan elnyúló platóban. Ez a jellemző a Ni(II) által indukált kooperatív amidnitrogén deprotonálódásra és koordinációra. A titrálás során pH>8 tartományban halványsárga színt lehetett látni, mely a pH emeléssel egyre intenzívebbé vált jelezve a síknégyzetes nikkell(II)-komplexek kialakulását. A titrálási görbéket visszasavanyítás után újra rögzítve nem tapasztaltunk eltérést az eredeti görbékhez képest.

A titrálási adatokból meghatározott stabilitási állandók a 3. táblázatban tekinthetők meg. Az állandók közül a [NiLH₃] komplex értékei jól egyeznek a Ni(II):Gly₅His és Ni(II):DAEFRH-NH₂ rendszerek stabilitási szorzataival. A [NiL] komplex esetén összehasonlíthatóak az értékek, de nagyobb eltérés van a két másik rendszerrel összevetve. Ez abból fakad, hogy a [NiL] komplex makrokelát típusú komplexek közé sorolható és bár mindhárom esetben ugyanaz (NH₂,N_{im}) van a koordinációs szférában, a további oldalláncbeli karboxilátcsoportok hozzájárulása enyhén megnövekedett stabilitási állandókat eredményez.

	Ni:A ₃ SSH-NH ₂	Ni:Gly ₅ His ¹⁸	Ni:DAEFRH-NH ₂ ¹⁹
Részecske	lgβ	lgβ	lgβ
[NiLH]	-	-	10,60
[NiL]	4,84(3)	5,46	5,63
[NiL ₂]		9,06	-
[NiLH ₋₁]	-	-	-3,05
[NiLH ₋₂]	-	-10,75	-
[NiLH ₋₃]	-19,80(4)	-19,94	-20,00
[Ni ₂ LH ₋₄]	-24,97(5)		-
[Ni ₂ LH ₋₆] ²⁻	-41,76(4)		-
pK [Ni ₂ LH ₋₄]/[Ni ₂ LH ₋₆] ²⁻	8,40	-	-

3. táblázat: Ni:Gly₅His¹⁸, Ni:DAEFRH-NH₂¹⁹, Ni:A₃SSH-NH₂ rendszerekben képződő komplexek stabilitási szorzatai

A kétmagvú [Ni₂LH₋₄] és [Ni₂LH₋₆]²⁻ összetételű komplexek képződése csak a Ni(II):A₃SSH-NH₂ rendszer esetén volt megfigyelhető (vagy nem is vizsgálták korábban a fémionfelesleges rendszert). Ez a megfigyelés utalhat a szerin szerepére a fémion-ligandum kölcsönhatás során.

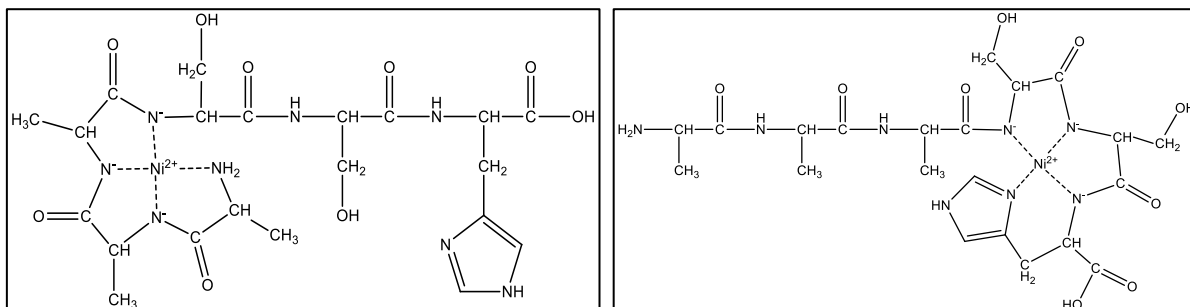


10. ábra: Ni(II):A₃SSH-NH₂=1:1 arányú rendszer eloszlási görbéje (c_L~2 mM)

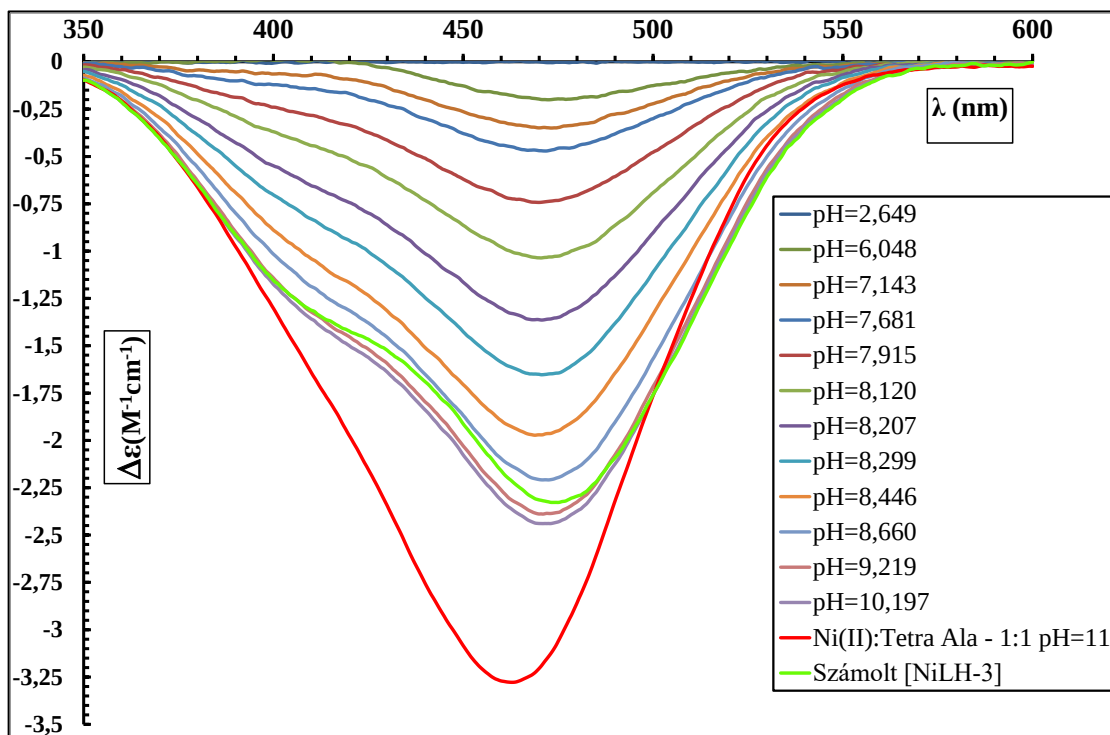
Az ekvimoláris rendszer koncentráció eloszlási görbéiről az olvasható le, amit a titrálási görbe is igazol: 5,5 pH felett a Ni(II)-fémionok komplexeket képeznek a ligandummal. (10. ábra) A pH=5,5-7,5 tartományban a [NiL]²⁺ komplex az uralkodó részecske, míg 9,0-es pH érték felett egyensúly áll be a [NiLH₃]⁻ és [Ni₂LH₆]²⁻ fémkomplexek között. Az egyensúlyban a [NiLH₃]⁻ komplex mondható dominánsnak kisebb mennyiségű [Ni₂LH₆]²⁻ részecske mellett.

Az 1:1 arányú rendszer abszorpciós spektruma az eloszlással és titrálási görbével jó egyezést mutat. A [NiL]²⁺ komplex egy (NH₂,N_{im}) makrokelát szerkezettel írható le, míg a [NiLH₃]⁻ komplex esetén 4N-es Ni(II)-komplex képződik, amire az abszorpciós spektrumok is utalnak. A tetraalanin nikkell(II)-komplexéhez hasonló spektrum alapján feltételezhető lenne, hogy a

Ni(II)-ion az amino- és három amidnitrogénhez kötődik, de a hisztidin horgony felőli koordinációja az amidnitrogének részvételével szintén 4N-es síknégyszetes, diamágneses, sárga színű komplexet eredményezne. (11. ábra)

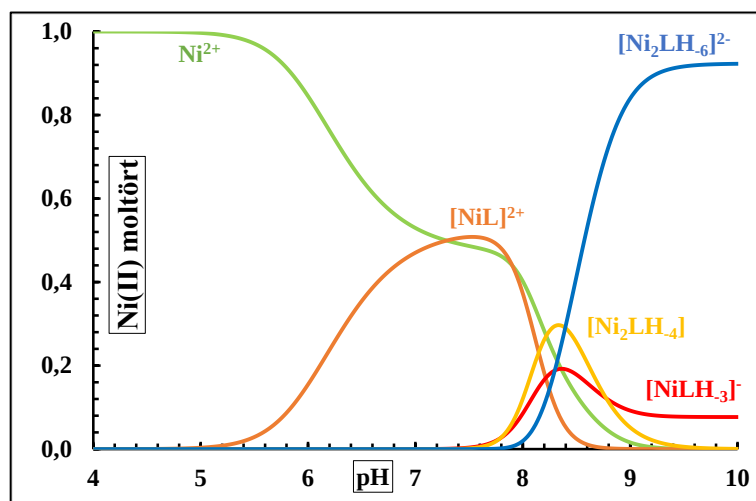


11. ábra: $[\text{NiLH}_3]^-$ komplex két lehetséges izomer szerkezete



12. ábra: Ni(II):A₃SSH-NH₂=1:1 arányú rendszer CD spektruma
(c_L ~ 2 mM)

Az ekvimoláris rendszer 12. ábrán látható CD-spektrumát az eloszlási diagram alapján tudjuk értelmezni. Jól látszik, hogy kisebb pH tartományban még nincs CD-aktivitás, majd a $[\text{NiL}]^{2+}$ makrokelát megjelenésével a rendszer forgatóképessége is változik. 8,2-es pH alatt a tetraalanin CD-spektrumához hasonló lefutású görbét kapunk, azonban a nagyobb pH-tartományokban eltérés látható. Figyelembe véve ezeket arra lehet következtetni, hogy a C-terminuson koordinált Ni(II)-ion is jelen van az oldatban. Jelenléte koordinációs izomernek vagy az eloszlás alapján megjelenő dinukleáris részecskének is lehet köszönhető.



13. ábra: Ni(II):A₃SSH-NH₂=2:1 arányú rendszer eloszlási görbéje
(c_L~2 mM)

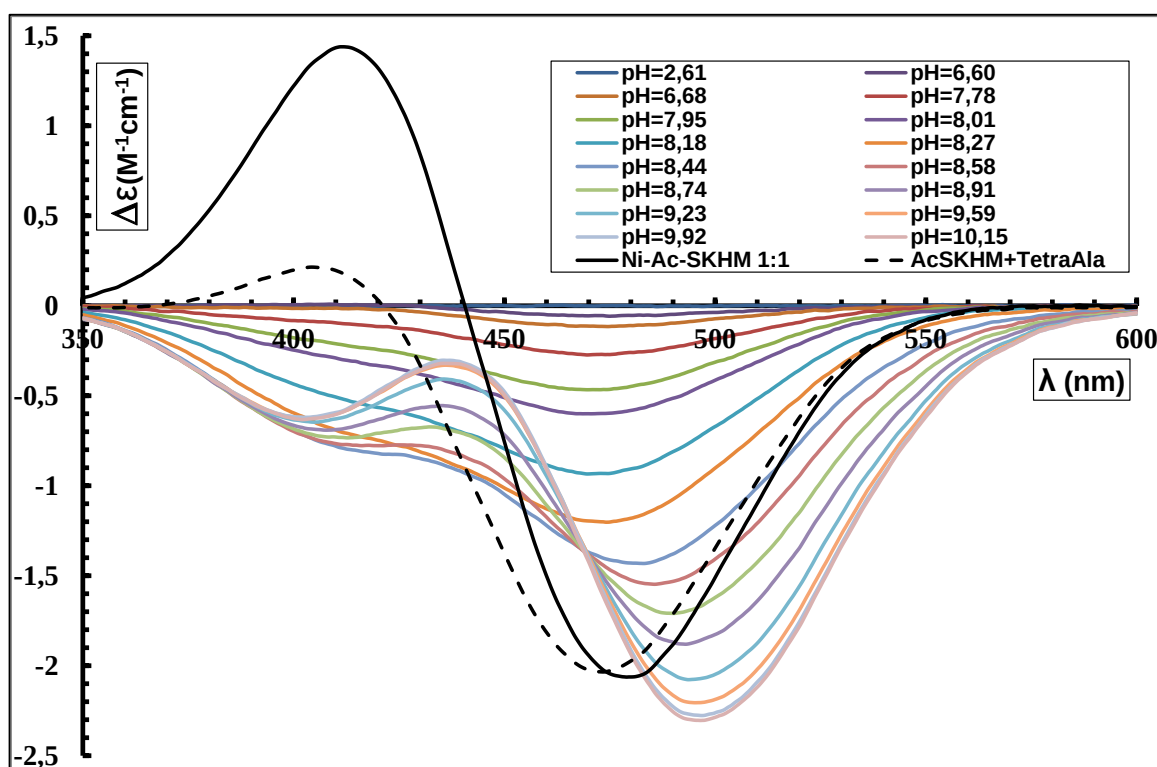
A fémionfelesleget tartalmazó rendszert összevetve az ekvimoláris rendszer eloszlási görbéivel az mondható el, hogy a $[\text{NiL}]^{2+}$ komplex kialakulását követően a pH növelésével egy lépésben képződik pH=8 körül a $[\text{Ni}_2\text{LH}_4]$ részecskéből a $[\text{Ni}_2\text{LH}_6]^{2-}$ fémkomplex.

Az A₃SSH-NH₂-vel összevethető korábban tanulmányozott peptidek komplexeit figyelembe véve egy $[\text{Ni}_2\text{LH}_5]^-$ összetételű részecske képződését várnánk, mivel 5 amidnitrogén található a ligandumban, azonban ezt a komplexet nem tudtuk leírni a titrálási adatok segítségével. Megjelenik egy extra deprotonálódási lépés, amit több folyamat eredményezhet: vegyes hidroxokomplex képződése, a láncvégi savamidcsoport deprotonálódása és koordinálódása, a pirrol típusú nitrogén deprotonálódása és koordinálódása, de a szerin hidroxil-csoportjának részvételét sem zárhatjuk ki.

Továbbá az -SXH- motívum jelenléte miatt az irodalomban [10] korábban leírt pH=8 felett Ni(II)-ionok jelenlétében lejátszódó intermedier észter képződés és az azt követő peptid hidrolízis lehetőségét sem hagyhatjuk figyelmen kívül.

A Ni(II):A₃SSH-NH₂=2:1 arányú rendszer abszorpciós spektrumáról az mondható el, hogy pH=8,3-ig jó egyezést mutat a Ni(II)-tetraalanin ekvimoláris rendszerének spektrumával, tehát a fémion a ligandum N-terminális régiójához koordinálódik. Azonban nagyobb pH-értékeken 450-500 nm hullámhossz tartományban egy „váll” megjelenését tapasztaltuk, ami utalhat arra, hogy a képződő komplexben az N-terminális régió mellett a C-terminális rész is koordinálódik és a hisztidin imidazol gyűrűjének és az amidcsoportok nitrogén donorja mellett oxigén donor is jelen lehet a koordinációs szférában.

A Ni(II):A₃SSH-NH₂ 2:1 arányú rendszer CD-spektrumán (14. ábra) látható, hogy pH=7,8-ig kis intenzitású Cotton-effektus jelenik meg. Ezen a pH-n a [NiL]²⁺ komplex van jelen az oldatban, tehát makrokelátszerű kötőmód jön létre, amidkoordinációról itt még nem beszélhetünk. 7,8-as pH felett CD-aktivitás figyelhető meg, azaz megjelennek az amidkoordinált részecskék. Az ekvimoláris minta CD spektrumával összehasonlítva, az mondható el, hogy úgyszintén jelen van az inverzió 8,2-es pH felett, azonban jóval élesebb, hiszen a [Ni₂LH₆]²⁻ komplex mennyisége a meghatározó a nagyobb pH értékeken. A C-terminális koordinációs módra jellemző CD spektrum tehát nagyobb mértékben adódik hozzá a tetraalaninszerű kötőmód CD görbéjéhez.

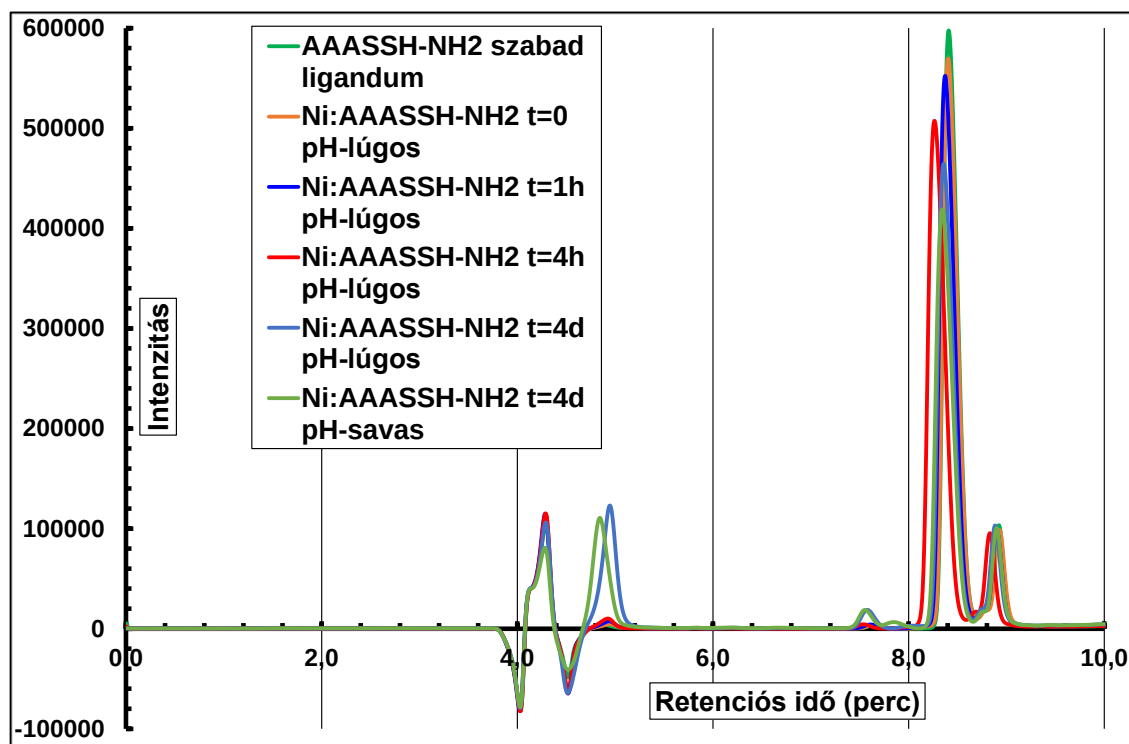


14. ábra: Ni(II):A₃SSH-NH₂=2:1 arányú rendszer CD spektruma (c_L~2 mM)

Amint a diagram jelmagyarázatában is látható, több modell CD-spektrum kombinálásával próbálkoztunk, hogy közelítsük az Ni:A₃SSH-NH₂ 2:1 arányú rendszer esetén felvett spektrumot. Az Ac-SKHM-NH₂ és a(z) AAAA 4N nikkell(II)-komplexeire jellemző modellspektrumokat használtuk, hiszen az Ac-SKHM-NH₂ az -SSH- résznek, míg a tetraalanin az -AAAS- résznek feleltethető meg. Az összspektrum (zöld színű) azonban nem mutat hasonlóságot a mért görbével. A Ni(II):A₃SSH-NH₂ 2:1 arányú rendszerének 10,5 pH-n felvett spektrumából a [Ni(AAAA)H₃]²⁻ komplex spektrumát azért vontuk le, hogy megtudjuk, milyen a C-terminuson kötött nikkell-ion környezete (feltételezve azt, hogy az N-terminuson kötött

nikkel(II)-ion koordinációs szférája telített). Az így kapott különbségspektrum azonban nem egyezik a feltételezett koordinációs módokkal, a szerin hatása látható a kialakuló részecskében.

Ezt követően HPLC-méréseket végeztem, vizsgálva azt, hogy az A₃SSH-NH₂ hexapeptid szenved-e hidrolízist a Ni(II)-ionok és az erősen bázikus közeg hatására.



15. ábra: AAA, A₃SSH-NH₂ és Ni(II):A₃SSH-NH₂=1:1 arányú rendszer különböző körülmények között rögzített HPLC-kromatogramjai

Az A₃SSH-NH₂ injektálását követően, rögzítettem a Ni(II):A₃SSH-NH₂ ekvimoláris rendszer kromatogramját. A peptid hidrolízisének egyik feltétele, hogy a (3N⁻,N_{im}) kötőmódú nikkel(II)-komplex képződjön. Ezen komplex képződésének céljából biztosítjuk a lúgos közeget, ez a részecske alakulhat tovább az intermedier észterre a szerin hidroxil csoportjának részvételével, majd pedig a rendszerben lévő hidroxid ionok hatására elhasadhat.

Az A₃SSH-NH₂ szobahőmérsékleten, lúgos közegben, ekvimoláris mennyiségű Ni(II)-ion és hosszabb reakcióidő (4 nap) alatt részben hidrolízist szenvedett, hiszen két további, kis intenzitású csúcs jelent meg a kisebb retenció időknél. Továbbá látható az is, hogy az 1 órás injektálásnál is minimális mennyiségben, de képződik a két termék. A trialanin szabad ligandum HPLC-kromatogramját referenciaként vettem fel, melynek csúcsa minimálisan „tailing” hatást szenved, de jó egyezést mutat a 7,6 percnél detektálható csúccsal.

További HPLC méréseket végeztem a 2:1 arányú Ni(II):A₃SSH-NH₂ rendszert illetően is, azonban ebben az esetben a hidrolízis kis mértékben valósult meg, hosszabb idő után és

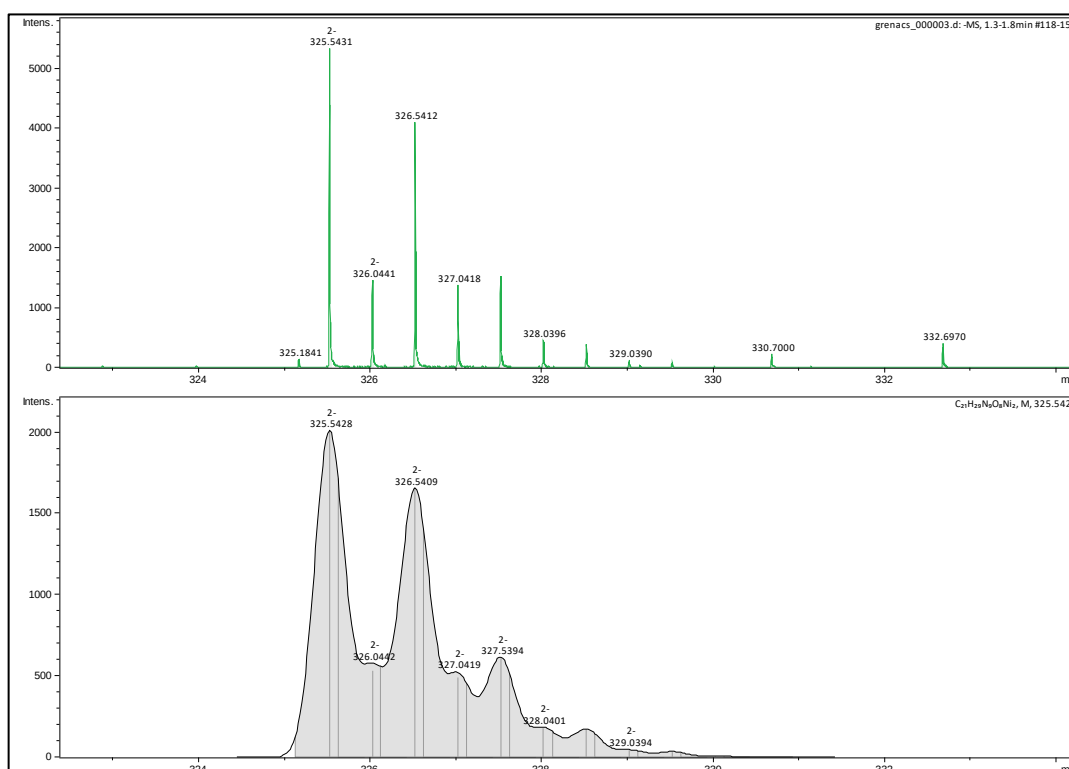
magasabb hőmérséklet alkalmazásával. Ez utalhat arra, hogy kisebb mennyiségben alakult ki a (3N⁻,N_{im}) kötés mód a nikkell(II)-ionok körül, ami a peptidhidrolízishez szükséges.

A HPLC-mérésekkel párhuzamosan tömegspektrumot is felvettünk a fémionfelesleget tartalmazó rendszerről, 9,8-as pH-n.

m/z	intenzitás	összegképlet	részecske
652	4271	C ₂₁ H ₂₉ N ₉ O ₈ Ni ₂ +H vagy C ₂₁ H ₃₀ N ₉ O ₈ Ni ₂	[Ni ₂ LH ₆] ²⁻ [Ni ₂ LH ₅] ⁻
596	21352	C ₂₁ H ₃₂ N ₉ O ₈ Ni	[NiLH ₃] ⁻
325	5272	C ₂₁ H ₂₉ N ₉ O ₈ Ni	[Ni ₂ LH ₆] ²⁻
286	7204	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₄ Ni	[NiAla ₃ H ₂] ⁻

4. táblázat: Ni(II):A₃SSH-NH₂=2:1 arányú rendszer MS-spektrumának adatai

A bázis csúcs 596 m/z értéknél jelent meg és a hozzá tartozó részecske összegképlete alapján a [NiLH₃]⁻ komplexnek felel meg. Jelen van 325 m/z értéknél is egy csúcs, ez a [Ni₂LH₆]²⁻ komplexnek felel meg, igazolva potenciometriás adatokból számolt modellt és megerősítve azt, hogy a részecske nem vegyes hidroxokomplex. (16. ábra)



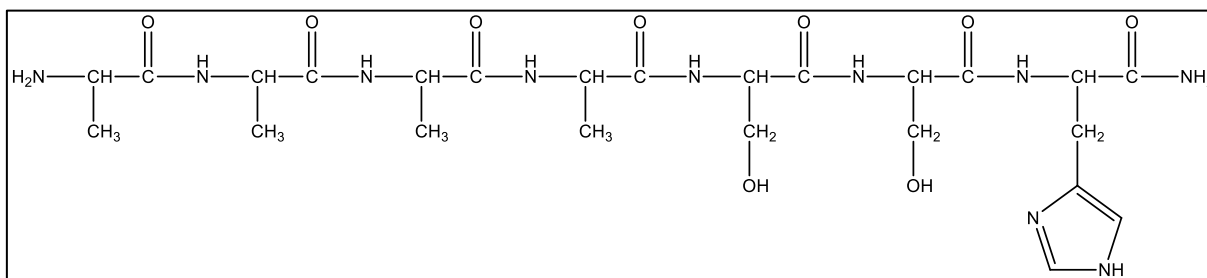
16. ábra: Ni(II):A₃SSH-NH₂=2:1 arányú rendszer tömegspektruma (c_L~2,0mM)

Emellett 652 m/z értéknél is detektálható egy csúcs, azonban [M] vagy [M+H] adduktumként is repülhet a részecske. Amennyiben [M+H] részecskéről beszélünk, úgy a $C_{21}H_{29}N_9O_8Ni_2+H$ összetétellel adja meg a $[Ni_2LH_6]^{2-}$ komplexet, viszont ha nem adduktumként tekintünk erre, akkor az [M] részecske lehet a $[Ni_2LH_5]^-$ is mely a $C_{21}H_{30}N_9O_8Ni_2$ összetétellel írható le. A potenciometriás eredményeket figyelembe véve a $[Ni_2LH_6]^{2-}$ jelenléte feltételezhető, mert ez a komplex kis hibával leírható volt a SUPERQUAD-programmal, míg a $[Ni_2LH_5]^-$ komplex nem.

Látható még a spektrumon 286 m/z értéknél egy -1 töltésű részecske, mely egy nikkel(II)-iont tartalmaz. A $C_9H_{14}N_3O_4Ni$ összetétel pontosan megfelel a 286-os molekulatömegnek, a töltést is figyelembe véve a $[NiAla_3H_2]^-$ komplexszel találtunk egyezést, ezzel igazolva a peptid részleges, szelektív hidrolízisét.

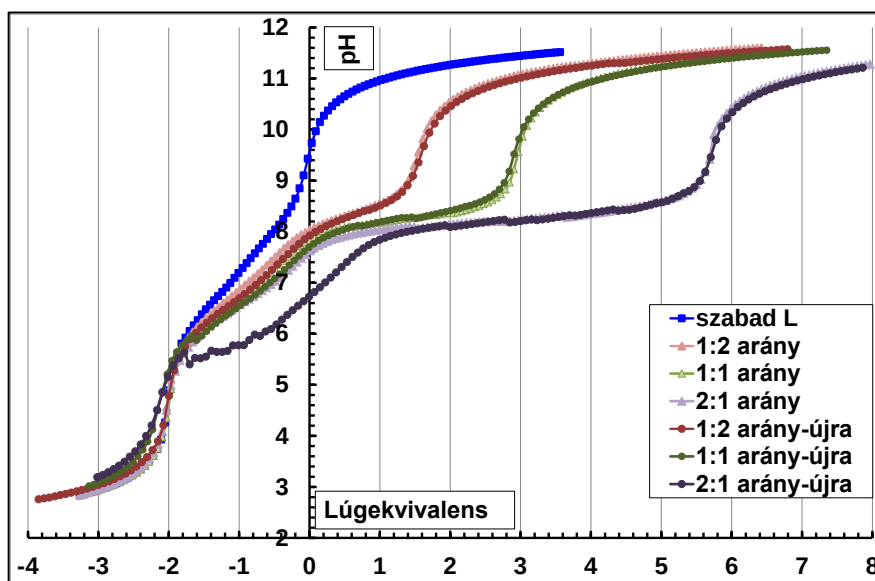
Fontos megjegyezni a HPLC és MS adatok ismeretében, hogy az $A_3SSH-NH_2$ ligandumnál csak részlegesen valósul meg a hidrolízis a Ni(II)-ionok hatására erősen bázikus közegben és ez az oldategyensúlyi vizsgálatokat nem befolyásolja egyik vizsgált rendszerben sem.

4.3 Ala-Ala-Ala-Ala-Ser-Ser-His- NH_2 ($A_4SSH-NH_2$)



17. ábra: Ala-Ala-Ala-Ala-Ser-Ser-His- NH_2 ($A_4SSH-NH_2$) szerkezete

Az $A_4SSH-NH_2$ az $A_3SSH-NH_2$ -től csak egy alanin aminosavban különbözik, így hasonló deprotonálódási állandókat várunk a két peptidtől. A His imidazólium csoportjának és terminális Ala ammónium ionjának várjuk a deprotonálódását, mely folyamatok átfedő lépésben mennek végbe (18. ábra). A titrálási adatok alapján meghatároztuk a deprotonálódási állandóit a peptidnek: $lg\beta_1 (A_4SSH-NH_2) = 7,89(1)$, a $lg\beta_2 (A_4SSH-NH_2) = 14,26(1)$. Ez jó egyezésben van az $A_3SSH-NH_2$ megfelelő értékeivel: $lg\beta_1 (A_3SSH-NH_2) = 8,00(1)$ $lg\beta_2 (A_3SSH-NH_2) = 14,44(2)$. Korábbi irodalmi értékek alapján a kisebb pH-n bekövetkező folyamat a hisztidin, míg a nagyobb pH-n végbemenő folyamat a terminális alanin disszociációjához rendelhető.

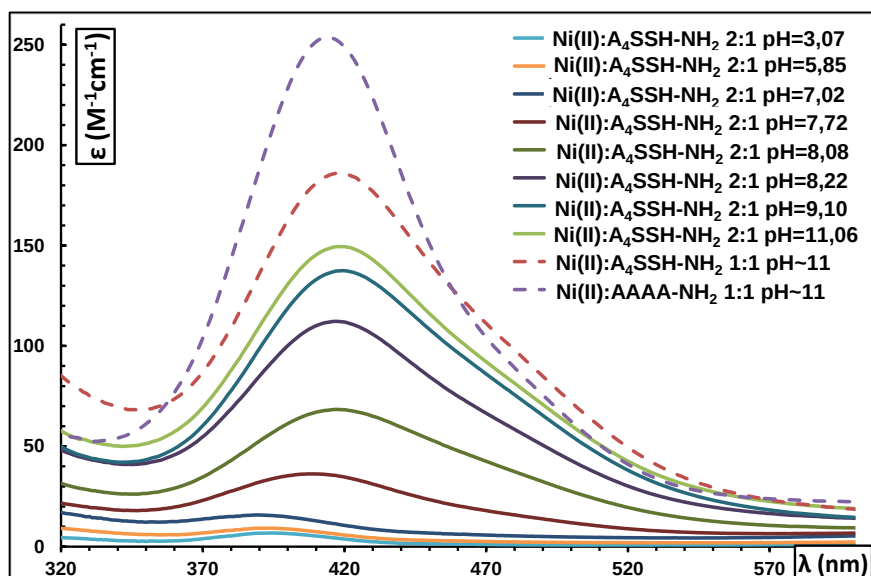


18. ábra: Az A₄SSH-NH₂ (Szabad L) és a Ni(II):A₄SSH-NH₂=1:2, 1:1 és 2:1 arányú rendszerek titrálási görbéi (c_L~2 mM)

A szabad ligandum titrálási görbétől 6-os pH felett válnak el a nikkel(II)-iont tartalmazó rendszerek titrálási görbéi (18. ábra). Mind a három (1:2, 1:1 és 2:1 fémion-ligandum arányú) rendszerben pH=8-tól kezdődik egy platószerű szakasz kiépülése. Arányosan a Ni(II)-fémion mennyiségének növelésével egyre hosszabb platót figyelhetünk meg a különböző arányú rendszerekben.

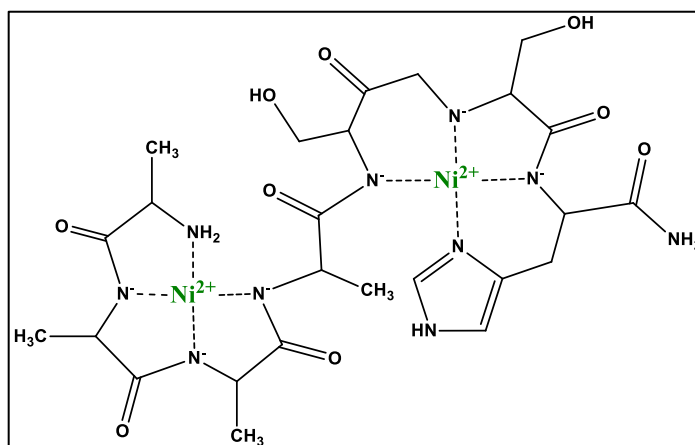
Az 1:2 aránynál ~1,5, az 1:1 aránynál ~3, míg a 2:1 arányú Ni(II):A₄SSH-NH₂ rendszerben ~6 ekvivalens extra lúg fogyását várjuk. Ez a Ni(II)-ionok által indukált kooperatív amidnitrogén-deprotonálódásból adódik.

A rendszerek reverzibilis viselkedésének ellenőrzése céljából visszاسavanyítottuk a mintákat a titrálások befejeztével és azonnal újra titráltuk azokat. Az 1:2 és 1:1 arányú rendszerek esetén csak minimális eltérést tapasztaltunk a pH=6-8 tartományban, de a 2:1 összetétel esetén szembetűnőbb a különbség. Minél nagyobb a nikkel mennyisége, annál látványosabb a változás. A titrálási adatok alapján stabilitási állandókat tudtunk számolni az egyes komplexekre, azonban ezek nem tekinthetők reprezentatívnak, mert irreverzibilitásra következtethetünk a megismételt pH-metriás mérésekből.



19. ábra: A Ni(II):A₄SSH-NH₂ 2:1 arányú rendszer abszorpciós spektrumai (c_L=2 mM)

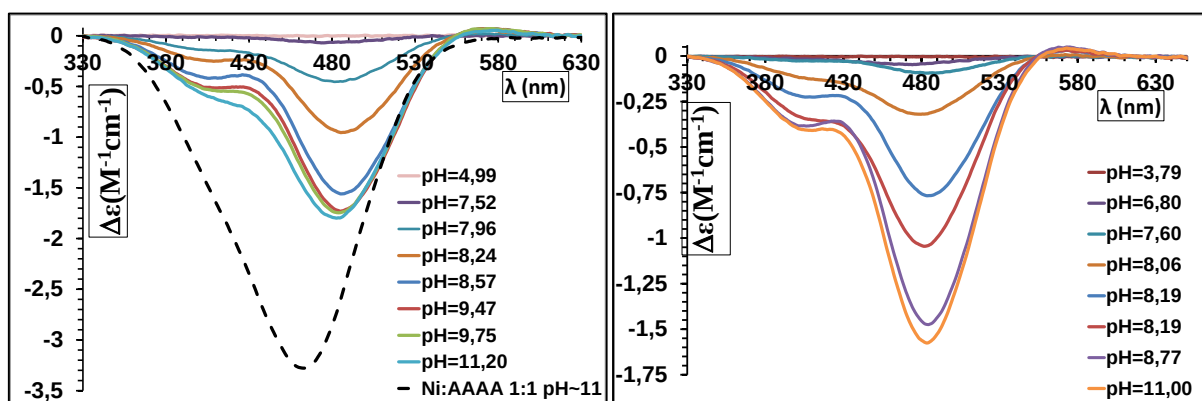
Fotometriás vizsgálatokat is végeztünk, melyek során egyik minta sem lett csapadékos, ami a nikkell(II)-ion hidrolízisére utalt volna, tehát a 2:1 arányú fémfelesleges rendszerben megvalósult a két fémion megkötése. A 19. ábrán látható, fémfelesleget tartalmazó rendszer abszorpciós spektrumáról az mondható el, hogy pH~7-ig csak makrokelátszerű komplexek képződnek, melyeknek kisebb a fényelnyelése. 7,7-es pH-tól figyelhető meg egy sáv kiépülése, melynek abszorpciós maximuma 420 nm-nél található. Ez az érték a 4N koordinált nikkell(II)komplexekre jellemző. Az abszorpciós spektrumok kiszélesedése arra utal, hogy egyidejűleg többféle koordinációs környezet is jelen van mindhárom aránynál. Ezt kívánja szemléltetni a 20. ábrán látható dinukleáris részecske is, ami a fémionfelesleget tartalmazó rendszerben képződik a nikkellionok koordinációs szférájának telítődésével. Az 1:2 és 1:1 arányú rendszerekben az N-, és C-terminuson kötött izomerek okozzák a spektrumszélesedést.



20. ábra: A Ni(II):A₄SSH-NH₂ 2:1 arányú rendszerben képződő dinukleáris, [Ni₂LH₆]⁻² összetétellel rendelkező részecske feltételezett szerkezete

Emellett megállapítható a Ni(II):AAAA-NH₂ 1:1 arányú rendszer pH~11-es spektrumából, ahol csak egyféle, tetraalaninszerű koordinációs környezet valósul meg, hogy a nikkel(II)-heptapeptid három vizsgált arányú rendszerének abszorpciós spektrumaiban, a 420 nm-nél található maximum az N-terminuson kötött komplexhez tartozik, míg a váll kiépüléséért a C-terminuson található izomer a felelős.

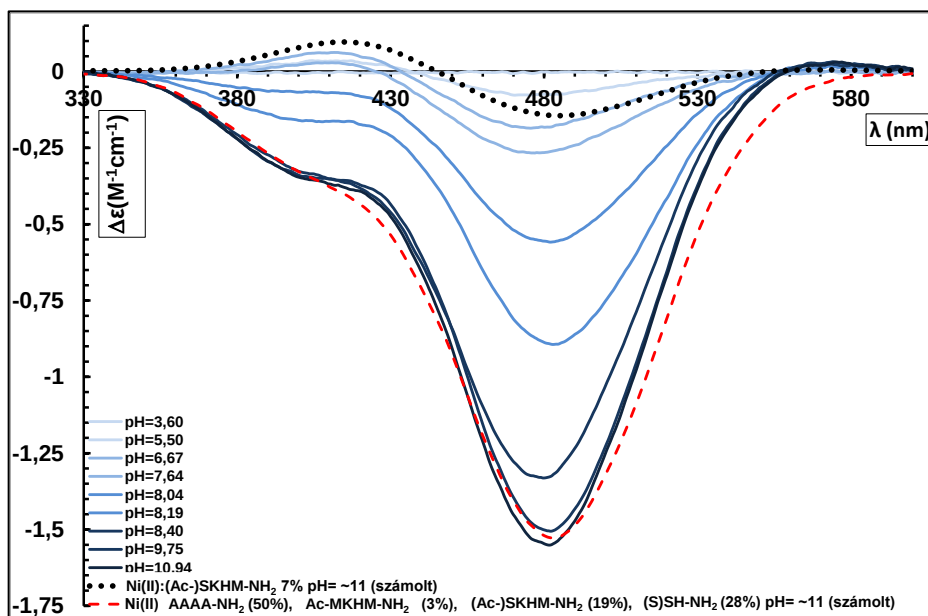
A Ni(II):A₄SSH-NH₂ 1:2 és 1:1 arányú rendszer pH-függő CD spektrumai nagyon hasonlóak, ebből kifolyólag csak az 1:1 arány görbéit tüntetem fel dolgozatomban. (21. ábra) 7,5-ös pH érték alatt jelentősebb Cotton-effektus nem tapasztalható, majd 7,9-es pH-tól a Ni(II)-ion amidkoordinált komplexeket képez a ligandummal és így változik az oldat forgatóképessége. A(z) AAAAA (NH₂,3N⁻) koordinált nikkelkomplexének CD-spektrumához nagyon hasonlítanak az 1:2 és 1:1 arányú rendszerek CD görbéi, azonban 440 nm körül a spektrumban a pH emelésével egy pozitív sáv kiépülését láthatjuk pH=8,24-től. (21. ábra (bal)) Ez azt jelenti, hogy a tetraalaninszerű koordináció mellett egyéb kötőmód is megvalósul a ligandummal és koordinációs izomerek jönnek létre.



21. ábra: Ni(II):A₄SSH-NH₂=1:1 arányú rendszer (bal) és 2:1 arányú rendszer (jobb) CD spektrumai (c_L~2 mM)

A fotometriás vizsgálatok bizonyították, hogy a két fémion megkötése megvalósul, így a Ni(II):A₄SSH-NH₂= 2:1 rendszer CD spektrumában (21. ábra (jobb) és 22. ábra), mind a C- és az N-terminális régióra jellemző kötőmód is megjelenik. A torzulás még nagyobb mértékben bekövetkezik a fémionfelesleget tartalmazó rendszerénél, mint az 1:2 és 1:1 fémion-ligandum arányú rendszerek esetében. Az N-terminuson létrejövő, (NH₂,3N⁻), tetraalaninszerű kötőmódú komplexre jellemző görbe tehát egyetlen, negatív sávot mutat 463 nm-nél, melyet a 21. ábra bal oldali spektrumán láthatunk. Az ettől való eltérés a C-terminuson kialakuló részecskére jellemző CD-aktivitás miatt következik be, hiszen a CD-spektrumok additívak. A 400 nm körül megjelenő negatív sáv azonban nem feleltethető meg a megszokott (N_{im}, 3N⁻) koordinációs módnak, amely pozitív CD sáv ráépülését

eredményezné 570 nm és negatív sávot 420 nm körül (Lásd: 5. ábra, fekete színű pontozott görbe). Ez az eltérés is mutatja a szerin hatását a kialakuló komplexek koordinációs környezetére, hiszen csak a -Ser/ThrXaaHis- motívumok esetén tapasztalható ez a fajta módosulás, más -YaaXaaHis- szekvenciák esetén nem.



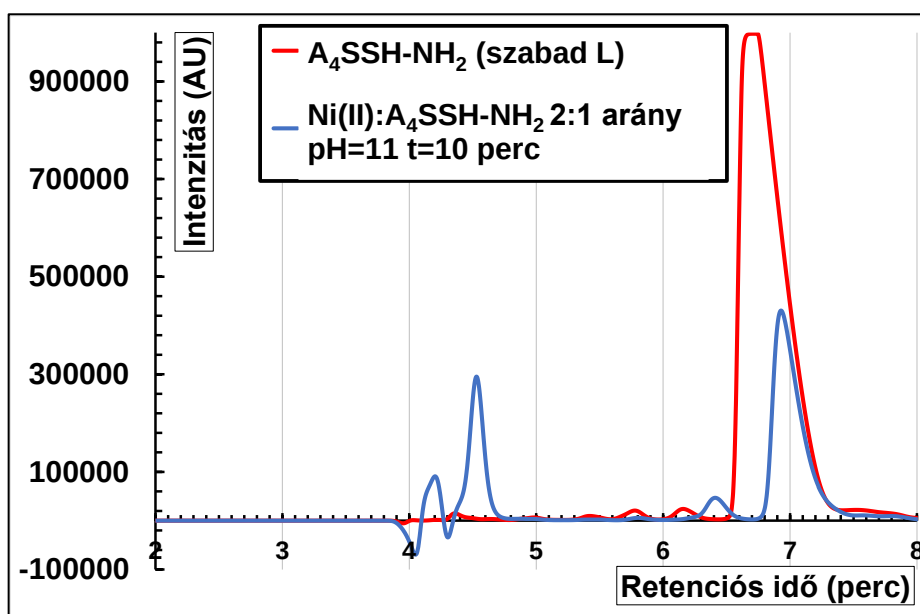
22. ábra: Ni(II):A₄SSH-NH₂=2:1 arányú rendszer ismételt rögzített pH-függő CD spektrumai a számolt görbékkel kiegészítve (c_L~2 mM)

A 22. ábra alapján, a visszasavanyítást és az azonnali újra titrálást követően, a Ni(II):Ac-SKHM-NH₂ ekvimoláris rendszer CD spektrumaihoz hasonlóan (5. ábra), kisebb pH-n jelenik meg CD aktivitás. Egy pozitív előjelű sáv kiépülése tekinthető meg ~415 nm-nél és a spektrum lefutása a Ni(II):Ac-SKHM-NH₂ 1:1 arányú minta (fekete, pontozott) CD-görbéjéhez hasonló. Ez a jelenség azért is érthető, mert a tetrapeptid az A₄SSH-NH₂ ligandum C-terminális kötőhelyének modelljeként is tekinthető.

Kiseb pH-n, stabilabb komplex képződik, amit a CD spektrumok ismételt felvétele is mutat, tehát az egyensúlyi folyamatokon túlmutató reakció is lejátszódhatott, ami kedvezőbb komplexképzéshez vezetett.

Modellpeptidek CD görbéi segítségével közelítőlegesen meghatároztuk, hogy a fémfelesleget tartalmazó rendszerben milyen koordinációs környezetben van jelen a nikkell(II)-ion (22. ábra, piros színű, szaggatott görbe). Az AAAA-t 50%-os mennyiségben vettem figyelembe, feltételezve, hogy a dinukleáris komplexben az egyik fémion a ligandum A₄-részletéhez kötődik (NH₂,3N⁻) donoratomokon keresztül. A C-terminális végen kötött nikkellion koordinációs szférája azonban nem írható le önmagában az Ac-SKHM-NH₂ nagy pH-n megjelenő fémkomplexéével, sem a várt (3N⁻,N_{im}) kötőmóddal. Az -SSH-NH₂ részletre

jellemző CD-görbe modellezése esetén azt kaptam eredményül, hogy mindössze 3%-ban valósul meg a klasszikus ($N_{im}, 3N^-$) koordináció (Ac-MKHM-NH₂ (26. ábra)), ahol a szerin módosító hatásával nem kell számolni. 19%-ban -SXH- szerű (tulajdonképpen albuminszerű) koordinációval sikerült leírni, melynek modellje az (Ac-)SKHM-NH₂ CD görbéje volt. (5. ábra) Végül pedig a Ni(II):A₃SSH-NH₂ 2:1 arányú rendszer 11-es pH-n felvett CD görbéjéből kivontam a Ni(II):AAAA 1:1 arányú 11-es pH-n felvett görbéjét, azaz az (NH₂,3N⁻) koordinált fémionra jellemző spektrumot. Az így kapott, -SSH- szekvenciára jellemző modellt 28%-ban figyelembe véve kaptam a legjobb egyezést a mért spektrummal.

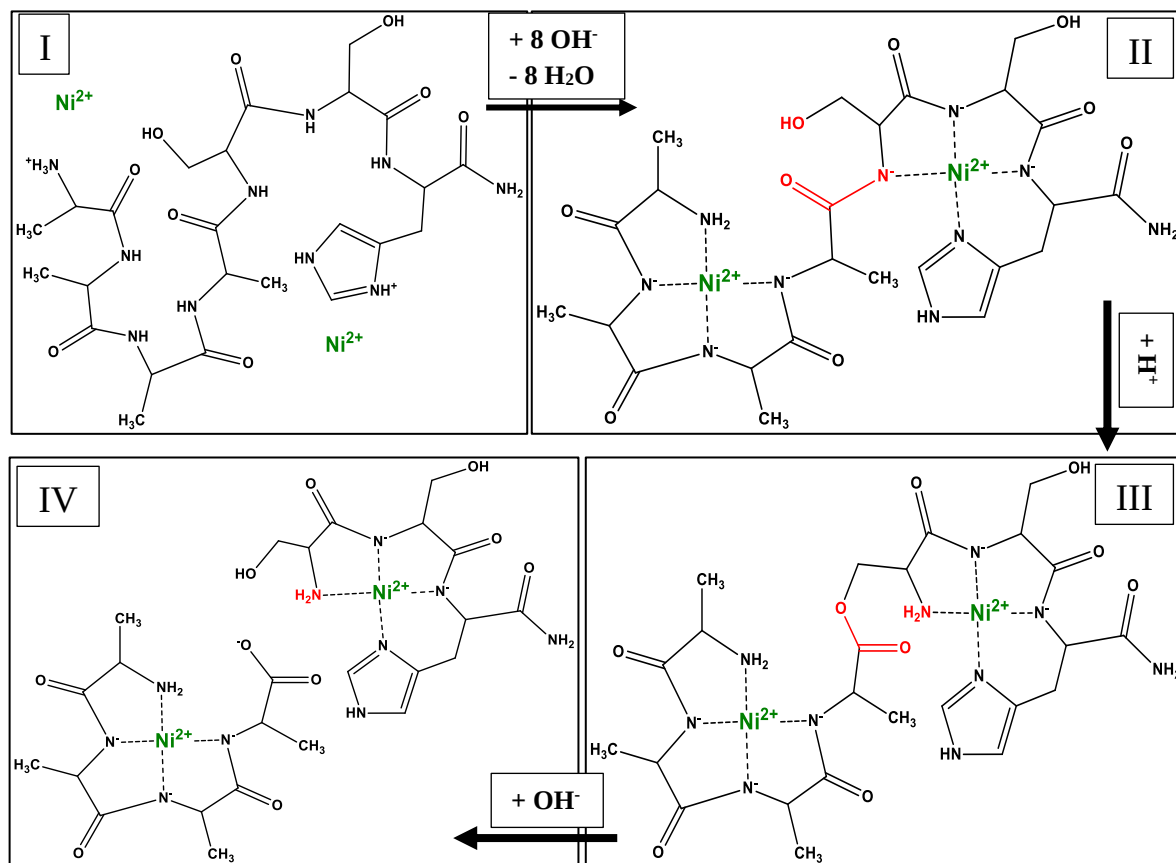


23. ábra: Ni(II):A₄SSH-NH₂=2:1 arányú rendszer HPLC-kromatogramjai (c_L= 2 mM)

Annak megállapítására, hogy szenved-e a ligandum hidrolízist nikkell(II)-ionok jelenlétében, hasonlóan a Ni(II):Ac-SKHM-NH₂ rendszerhez, vagy úgy viselkedik, mint a Ni(II):A₃SSH-NH₂ rendszer, ahol csak több nap elteltével valósult meg a peptid szelektív hasadása, HPLC vizsgálatokat végeztem.

Az A₄SSH-NH₂ szabad ligandum kromatogramja tekinthető meg piros színnel, a retenciós idő 6,7 perc. Ezt követően egy friss mintát készítettem, amihez 2 ekvivalens, Ni(II)-ionokat tartalmazó oldatot adtam és beállítottam az oldat pH-ját ~11-re. Az oldat a pH állítás hatására sárga színű lett, azaz képződtek a síknégyszetes nikkell-komplexek. 10 perc állást követően injektáltam a mintát a HPLC rendszerbe, melynek kromatogramja kék színnel látható a 23. ábrán. Nikkell(II)ionok jelenlétében, lúgos közegben, 10 perc után a ligandum jelentős mennyisége átalakult és új csúcsok jelentek meg 4,5 és 6,4 percnél a kromatogramon.

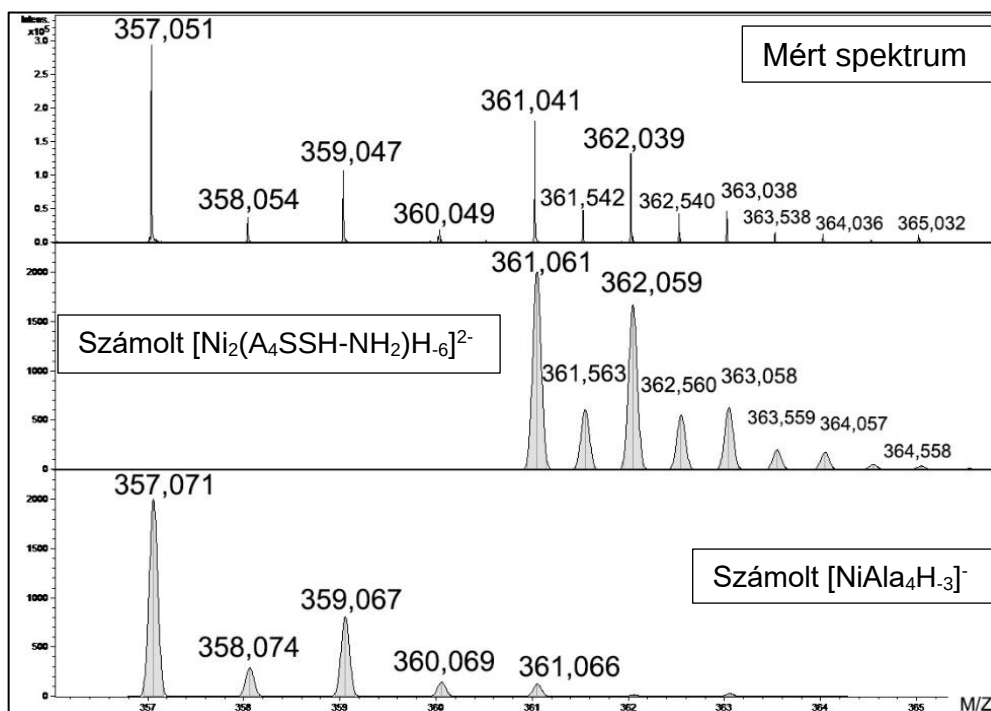
A kromatogram nagyban hasonlít az A₃SSH-NH₂ esetén négy nap elteltével rögzítettethez¹⁶, ami ebben az esetben is mutatja a nikkell(II)ionok által indukált szelektív hidrolízis lejátszódását. Ennek következménye a(z) AAAA és az SSH-NH₂ peptid fragmensek képződése, mely a 24. ábrán látható.



24. ábra: A₄SSH-NH₂ Ni(II)-indukált hidrolízisének reakciómechanizmusa

A 24. ábrán tekinthető meg az A₄SSH-NH₂ ligandum, Ni(II) indukált specifikus hidrolízisének reakciómechanizmusa. Látható az ábrán, hogy az Ala-Ser peptidkötés szenved szelektív hidrolízist, melynek feltétele, hogy a Ni(II)-fémion (3N⁻,N_{im}) kötésmódot alakít ki a C-terminuson.

Feltételezéseink alátámasztására a Ni(II):A₄SSH-NH₂=2:1 arányú rendszerről tömegspektrometriás mérést készítettünk. (25. ábra) A spektrumot negatív módban rögzítették és a felső sorban láthatjuk a mért tömegspektrumnak a 360 m/z körüli régióját. A középső sor a kétszeres negatív töltésű kétmagvú komplexének számolt tömegspektrumát tartalmazza, míg az alsó sorban a tetraalanin egyszeres negatív töltésű [NiLH₃]⁻ komplexének tömegspektruma tekinthető meg.

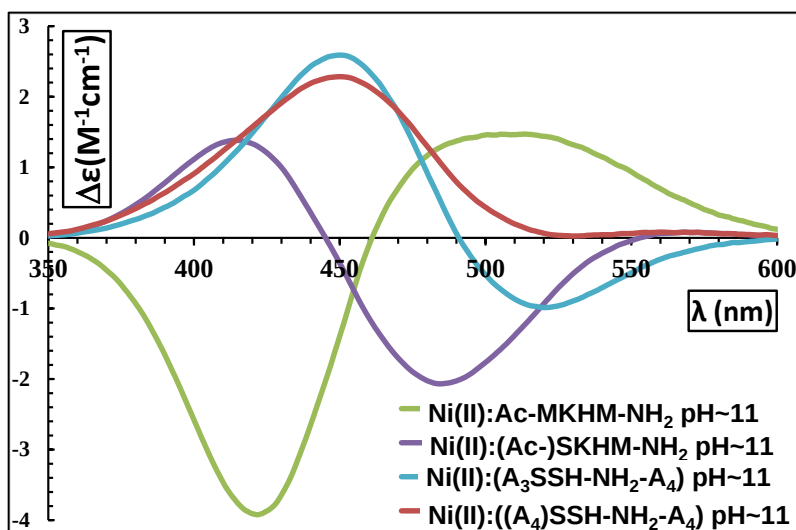


25. ábra: Ni(II):A₄SSH-NH₂=2:1 arányú rendszer tömegspektruma
(c_L= 2 mM)

Az MS spektrum összhangban van a HPLC, CD és pH-potenciometriás eredményekkel és bizonyítja a peptid hidrolízisét, ugyanis a mért spektrumban jelen van a dinukleáris komplex mellett a tetraalanin nikkell(II)komplexére jellemző jelcsoport is (m/z=357, felső spektrum).

m/z	összegképlet	részecske
361	C ₂₄ H ₃₄ N ₁₀ O ₉ Ni ₂	[Ni ₂ LH ₋₆] ²⁻
357	C ₁₂ H ₁₉ N ₄ O ₅ Ni	[NiAla ₄ H ₋₃] ⁻

5. táblázat: Ni(II):AAAASSH-NH₂=2:1 arányú rendszer MS-spektrumának adatai



26. ábra: Az -SKH-, -MKH- és (S)SH- peptidrészletek nikkellkomplexeinek CD spektrumai erősen bázikus közegben

A 26. ábrán összesítő CD spektrumokat láthatunk a vizsgált peptidekről erősen bázikus közegben, illetve a kék és a piros spektrumok esetén a hisztidin környezetében kialakuló Ni(II)-komplexről. (A következő bekezdésekben az „általános körülmények” alatt a szobahőmérsékletet és a pH-potenciometriás vizsgálat során a lúgos tartományban rögzített pontok regisztrációjának idejét (0,5-3 órát) értem.)

A zöld színű spektrum a klasszikus koordinációt mutatja be ahol csak a hisztidin imidazol nitrogénje és a deprotonált amidnitrogének vannak a koordinációs szférában (N_{im} , $3N^-$), melyek nem szerintől származnak.

A lila színű spektrum egy olyan koordinációs környezetet modellez, ahol a szerin egy aminosav távolságra található a hisztidintől. Ennek az aminosavnak az oldalláncában található funkciós csoport nem vesz részt a koordinációban (-SXH-). Ebben az esetben csak egy Ni(II)-fémion megkötése tud megvalósulni és az általános körülmények mellett a peptid hidrolízise jelentős mértékű. Ennek következményeként a CD görbe az albuminszerű koordinációs módhoz hasonló, hiszen a hidrolízis termékeként (NH_2, N^-, N^-, N_{im}) kötésmódú nikkkelkomplex alakul ki. A kék színű spektrum modellezi az -SSH- részlet koordinációját abban az esetben, ha nincs lehetőség a fémion koordinációs szférájának telítésére (N^-, N^-, N_{im}). A mintában a hidrolízis az oldategyensúlyi vizsgálatok ideje alatt elhanyagolható.

A piros színű spektrum modellezi egy olyan peptid C-terminusának kötésmódját, melynél az -SSH- részlet részvételével telítődhet a fémion koordinációs szférája, azonban a klasszikus (N_{im} , $3N^-$) kötésmódtól eltér a CD görbe. Itt az általános körülmények mellett a hidrolízis szintén megvalósul.

5. Összefoglalás

Dolgozatomban az Ac-SKHM-NH₂, A₃SSH-NH₂ és A₄SSH-NH₂ peptidek nikkell(II)-komplexeivel foglalkoztam. Célom az említett peptidek Ni(II)-ionok által indukált specifikus hidrolízisének tanulmányozása volt az oldategyensúlyi vizsgálatoknál fennálló körülmények mellett. Korábbi publikációk ezt a szelektív, hidrolitikus folyamatot a -TXH- és -SXH- motívumot tartalmazó peptidek esetén már leírták, azonban erélyesebb körülmények alkalmazása során. Feltételeztük, hogy ez érintheti a kevésbé erélyes, oldategyensúlyi méréseket is, mert a korábbi CD-vizsgálatok megmagyarázhatatlan anomáliát mutattak a -TXH- és -SXH- szekvenciát tartalmazó peptidek Ni(II)-komplexeinél.

A peptidek pH-potenciometriás, UV-látható-fotometriás és CD-spektroszkópiás vizsgálataival az N- és C-terminális kötőhelyen koordinált nikkell(II)-ionok spektrális adatait és a képződő komplexek stabilitási állandóit kívántuk meghatározni. Annak megállapítására, hogy szenvednek-e a ligandumok hidrolízist, HPLC és ESI-MS vizsgálatokat végeztünk.

Az Ac-SKHM-NH₂ tanulmányozása során kiderült, hogy a ligandum hidrolízise a Ni(II)-ionok jelenlétében az oldategyensúlyi vizsgálatok ideje alatt bekövetkezik. HPLC-vel igazoltuk, hogy a ligandum szinte teljes mennyisége átalakult a titrálás ideje alatt, ez látható a CD-spektrumánál is.

Az A₃SSH-NH₂ nikkell(II)-iont tartalmazó rendszereinél képződött a síknégyszetes, sárga színű komplex, azonban az újra titrált mintáknál lényeges különbséget nem tapasztaltunk a titrálási görbékben. A CD-görbék mutatták a korábban tapasztalt anomáliát, azonban a HPLC és MS vizsgálattal a peptid nagyon kis százalékban megvalósuló hidrolízisét tudtuk csak igazolni, mely az oldategyensúlyi vizsgálatokat nem befolyásolja.

A Ni(II):A₃SSH-NH₂ 2:1 arányú rendszer esetén a titrálási adatokból meghatároztuk, hogy a peptid képes két nikkell(II)iont megkötni, ellentétben a korábban vizsgált hasonló peptidekkel, sőt a [Ni₂LH₆]²⁻ komplex képződését is kimutattuk, amit az MS mérés is igazol. Korábbi tanulmányok és vizsgálatok alapján a [Ni₂LH₅]⁻ összetételű komplex képződését várnánk, azonban ez meg sem jelenik és egy lépésben képződik [Ni₂LH₆]²⁻ részecske. Az extra deprotonálódási lépést eredményezheti pirrol- vagy savamid N-deprotonálódás és koordináció, hidrolitikus folyamat és szerin hidroxil funkciós csoportjának deprotonálódása is.

Az Ni(II):A₄SSH-NH₂ rendszerek pH-metriás vizsgálatánál, a Ni(II)-ionok anyagmennyiségének növelésével egyre nagyobb különbséget tapasztaltunk az első és második titrálási görbék között. A ligandum CD-spektrumánál tapasztaltuk az anomáliát, valamint a HPLC és az MS is igazolta, hogy a peptid hidrolizál az oldategyensúlyi vizsgálatok alatt az Ac-SKHM-NH₂-vel hasonló módon.

Mindemellett sikerült a Ni(II):A₄SSH-NH₂ fémfelesleget tartalmazó rendszer újra titrált mintájánál, 11-es pH-n meghatározni az izomerösszetételt a modellpeptidek CD-spektrumai segítségével: Ni(II):(AAAA=50%, Ac-MKHM=3%, Ac-SKHM=19%, A₃SSH-AAAA=28%).

A meghatározott izomer összetételből és 26-os ábrán látható spektrumokból megállapítható, hogy a klasszikus (N_{im}, 3N⁻) koordinációs szférát, a szerint tartalmazó rendszerek nem reprodukálják Ni(II)-ionok jelenlétében. Ennek oka egyrészt a peptid nikkel(II) indukált szelektív hidrolízise, másrészt a szerin eddig ismeretlen komplexszerkezetre gyakorolt hatása.

6. Irodalomjegyzék

1. S. Y Owyang, J. Luther, J. Y Kao, *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 5(6), 649–651 (2011)
2. B. Decock-Le Reverend, L. Andrianarijaona, C. Livera, L.D. Pettit, I. Steel és H. Kozłowski, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2221. (1986)
3. Brücher Ernő: Szervetlen kémia (A fémek és vegyületeik), KLTE, Debrecen (1983)
4. I. Sóvágó, K. Ősz: *Dalton Trans.*, 3841 (2006)
5. B. Decock-Le Reverend, L. Andrianarijaona, C. Livera, L.D. Pettit, I. Steel and H. Kozłowski, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2221 (1986)
6. K. Várnagy, J. Szabó, I. Sóvágó, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, G. Micera *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 467-472 (2000)
7. L.D. Pettit, S. Pyburn, W. Bal, H. Kozłowski, M. Bataille *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 3565-3570 (1990)
8. W. Bal, H. Kozłowski, R. Robbins, L.D. Pettit *Inorg. Chim. Acta*, 231, 7-12 (1995)
9. H. Kozłowski, T. Kowalik-Jankowska, M. Jezowska-Bojczuk *Coord. Chem. Rev.* 252, 1069-1078 (2008)
10. Edyta Kopera, Artur Krezel, Anna Maria Protas, Agnieszka Belczyk, Arkadiusz Bonna, Aleksandra Wyslouch-Cieszyńska, Jarosław Poznanski, Wojciech Bal *Inorg. Chem.* 49, 6636–6645 (2010)
11. Wojciech Bal, Jan Lukszo, Karol Białkowski, Kazimierz S. Kasprzak *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1014-1023 (1998)
12. Anna Maria Protas, Arkadiusz Bonna, Edyta Kopera, Wojciech Bal *J. Inorg. Biochem.* 105, 10-16 (2011)
13. Nina Ewa Wezynfeld, Arkadiusz Bonna, Wojciech Bal, Tomasz Fraczyk, *Metallomics*, 7, 596-604 (2015)
14. Artur Krezel, Edyta Kopera, Anna Maria Protas, Jarosław Poznanski, Aleksandra Wyslouch-Cieszyńska, Wojciech Bal *J. Am. Chem. Soc.* 132, 3355-3366 (2010)
15. R. B. Merrifield *J. Am. Chem. Soc.* 85, 14 (1963), 2149-2154
16. H. Rink *Tetrahedron Letters* 28 (1987), 3787-3790
17. Cs. Kállay, I. Turi, S. Timári, Z. Nagy, D. Sanna, G. Pappalardo, P. De Bona, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, *Monatsh Chem.*, 142:411-419 (2011)
18. K. Várnagy, J. Szabó, I. Sóvágó, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, G. Micera, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 467 (2000)
19. É. Józsa, K. Ősz, C. Kállay, P. De Bona, C. Damante, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, I. Sóvágó *Dalton Trans.*, 39, 7046-7053 (2010)

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék őszinte köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Grenács Ágnes egyetemi adjunktusnak a munkám és a dolgozat elkészítése során nyújtott önzetlen segítségért. Hálásan köszönöm a lelkiismeretes témavezetést és azt az elméleti és gyakorlati tudásanyagot ami nélkül a dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönöm Prof. Dr. Várnagy Katalin egyetemi tanárnak, hogy részt vehetek az általa vezetett Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport munkájában és rendelkezésemre állt szakmai kérdéseim esetén.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Gáspár Attila tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy dolgozatomat az általa vezetett Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken készíthettem el és lehetőséget biztosított a tömegspektrometriás mérésekhez.

Köszönöm Prof. Dr. Kurtán Tibor egyetemi tanárnak, hogy lehetőséget biztosított a cirkuláris dikroizmus mérések elvégzéséhez.

Köszönöm Dr. Tircsó Gyula egyetemi docensnek és Váradi Balázs PhD hallgatónak a liofilizálásnál nyújtott segítséget.

Köszönöm a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport tagjainak a barátságos, segítőkész légkör biztosítását, amely nagyban megkönnyítette a munkám elvégzését.

Végül őszintén köszönöm családomnak és barátaimnak a biztatásukat, támogatásukat és megértésüket.

A kutatás a GINOP-2.3.2-15-2016-0000 számú projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.