



# **Tioéter- és imidazolcsoportot tartalmazó peptidek fémkomplexeinek vizsgálata**

doktori (PhD) értekezés tézisei

Bóka Beáta

Debreceni Egyetem  
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék  
Debrecen, 2003

# **Tioéter- és imidazolcsoportot tartalmazó peptidek fémkomplexeinek vizsgálata**

doktori (PhD) értekezés tézisei

Bóka Beáta

Témavezető: Dr. Sóvágó Imre egyetemi tanár

Debreceni Egyetem  
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék  
Debrecen, 2003

## I. Bevezetés, célkitűzések

Már régóta ismert, hogy egyes fémionok bár csak kis mennyiségben fordulnak elő az élő szervezetekben, fontos szerepet játszanak számos biokémiai folyamat irányításában. A bonyolult biológiai folyamatok megértésében segítséget nyújthatnak a modellrendszerek vizsgálata során szerzett információk. Az élő szervezetekben előforduló ligandumok közül a fehérjék képesek legerősebben megkötni a fémionokat; e makromolekulákat peptidekkel modellezhetjük. A metalloenzimek aktív centrumában a fémiont a protein oldalláncában található különböző funkciós csoportok rögzítik. Munkánk során a leggyakoribbak közül kettő: az imidazol- és a tioétercsoport szerepét tanulmányoztuk.

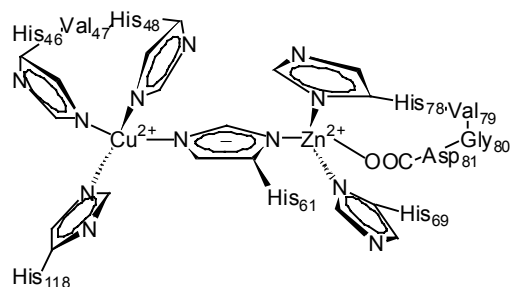
A tioétercsoport szerepe az enzimekben, illetve a komplexképződésre gyakorolt hatása kevésbé tisztázott. Az irodalomból ismert, hogy ezen soft donoratomot nagyfokú fémionszelektivitás jellemzi, s a koordinációja nagymértékben függ egyéb donoratomok jelenlététől. Célul tűztük ki tehát *a tioétercsoport koordinációjának vizsgálatát a fémionok széles körében, s a donorcsoportot különböző környezetben tartalmazó ligandumok esetén*. A választott kétértékű fémionok között találhatóak a 3d ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), a 4d ( $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ) és a főcsoportbeli elemek ( $\text{Pb}^{2+}$ ) közé sorolhatók is. A ligandumok köre a metionin aminosavat különböző számban és helyzetben tartalmazó di- és tripeptidekre terjedt ki (GlyMet, MetGly, MetGlyGly, GlyMetGly, GlyGlyMet, MetMetAla, MetGlyMet és MetMetMet).

Az említett fémionok közül az  $\text{Pb(II)}$ ion peptidekkel való kölcsönhatására az irodalomban kevés adat található, amelyekkel való összevetést nehezíti, hogy többségük az általunk alkalmazottól eltérő körülményekre vonatkozik. Ezen fémion vizsgálatát mérgező sajátsága is indokolja, hiszen a szervezetre gyakorolt káros hatásában is fontos szerepet játszhat kölcsönhatása bioligandumokkal, különösen proteinekkel, peptidekkel. Mindezek miatt céljaink között szerepelt az *Pb(II) aminosav- és peptidkomplexeinek szélesebb körű vizsgálata is*. *A tioéterkén szerepe mellett tanulmányoztuk más oldalláncbeli donoratomok, nevezetesen a hidroxil- és karboxiloxigén, a tiolkén és az imidazolnitrogén, komplexképződésre gyakorolt hatását is*.

Az imidazolnitrogén szinte valamennyi metalloenzim esetén elsődleges fémmegkötőhely, ezért hatására vonatkozóan igen sok irodalmi adat áll rendelkezésre. Ezek egy része konkrét metalloenzimek vizsgálatával foglalkozik, egy másik csoportja pedig

modell rendszerekben tanulmányozza az imidazolnitrogén szerepét; ez utóbbi csoportba tartoznak a hisztidintartalmú peptidek fémkomplexeire vonatkozó munkák.

Igen érdekes, imidazolhidas szerkezetű enzim a szuperoxid-diszmutáz (SOD), amely a légzési folyamat közttermékeként képződő szuperoxid gyökanion diszproporcionálódását katalizálja. Ezen anion, illetve a belőle képződő szabadgyökök felhalmozódása olyan betegségek kialakulásához vezethet, mint a szívinfarktus, az ízületi gyulladás, a rák illetve egyes idegrendszeri rendellenességek, mint a Parkinson kór. Az enzim egyik csoportját



képező, a Cu,Zn-SOD-ok aktív centrumában (lásd az ábrán) a rézhez és a cinkhez koordinálódó két-két donoratom a peptidszekvenciában egymáshoz közel elhelyezkedő aminosavak oldalláncában található, amelyek a rézkötőhely esetén egy tripeptiddel (HisValHis), míg a cinkkötőhely esetén egy tetrapeptiddel (HisValGlyAsp) modellezhetők. Az

enzim aktív centrumában a két iont egy híd hisztidinoldallánc köti össze, amely a cinkhez a piridin-, a rézhez pedig a pirrol-típusú nitrogénen keresztül koordinálódik. Az értekezésben vázolt munka egyik további területe az előbb említett, védett láncvégi amino- és karboxilcsoporttal rendelkező két peptid Cu(II)- és Zn(II)komplexeinek vizsgálata volt.

## II. Alkalmazott vizsgálati módszerek

A vizsgált ligandumok közül a SOD modell vegyületek nem kaphatók kereskedelmi forgalomban, ezeket a Ioannina-i Egyetemen (Görögország), egy 6 hónapos tanulmányút során (Marie Curie ösztöndíj) állítottam elő szilárdfázisú peptidszintézissel, H-Linker-CLTR gyantát és Fmoc-védőcsoporttal ellátott aminosavakat használva. A HPLC-s tisztítást követően az előállított anyagok tisztaságát NMR spektroszkópiás módszerrel, valamint a szabad ligandum pH-potenciometriás titrálásával ellenőriztük.

Az egyensúlyi vizsgálatok során a ligandumok savi disszociációs állandóit, valamint a törzs- és vegyesligandumú rendszerekben képződő komplexek összetételét és stabilitási állandóját pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg ( $T=278\text{K}$ ,  $I=0,2\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (KCl, ill.  $\text{KNO}_3$ )). A stabilitási állandók számítását a PSEQUAD számítógépes programmal végeztük. A képződő komplexekben megvalósuló kötémódok meghatározására spektroszkópiás módszereket (UV-látható spektrofotometria, CD, ESR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{113}\text{Cd}$  NMR) alkalmaztunk.

### III. Új tudományos eredmények

#### 1. A tioéterkén donoratom koordinációjának fémionfüggése

A peptidek oldalláncában található tioétercsoport komplexképződésre gyakorolt hatása jelentősen eltér az egyes fémionok esetén. A kialakuló komplexben a tioéterkén donoratom és a fémion között létrejövő kölcsönhatás erőssége alapján az alábbi csoportok különböztethetők meg:

1.1. A **Zn(II)-, Co(II)-, Cd(II)- és Pb(II)ionokkal** képződő  $[ML]^+$  összetételű komplexben a vizsgált metionintartalmú peptidek ( $NH_2, CO$ ) koordinációja valósul meg, *a tioéterkén donoratom kötődése gyakorlatilag kizárható.*

1.2. A **Cu(II)- és Ni(II)ionnal** való komplexképződés során a *tioétercsoport hatása csak másodlagos*, a meghatározó szerepet a peptidlánc tölti be.

- Valamennyi vizsgált tripeptid  $[NiLH_2]^+$  összetételű komplexében, a peptidekre általánosan jellemző koordinációs mód ( $(NH_2, N^-, N^-, COO^-)$ ) valósul meg. A tioétercsoport gyenge koordinációja csak az N-terminális helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek  $[NiL]^+$  összetételű, oktaéderes komplexében mutatható ki.

- Cu(II)ion esetében a tioétercsoport térbeli helyzetétől függően *a kénatom is kötődhet* egyes komplexekben, melyek sztöchiometriai összetétele és a peptid aminosavszekvenciája között szoros összefüggést mutattunk ki.

Az N-terminális helyzetben glicint tartalmazó peptidek  $[CuL]^+$  összetételű komplexében az aminonitrogén és a szomszédos karboniloxigén koordinálódik a fémionhoz. Utóbbi donoratomot a tioéterkén váltja fel a fémion koordinációs szférájában, ha metionin található N-terminális helyzetben (MetGlyGly, MetMetAla, MetGlyMet és MetMetMet). Az eltérő koordináció nem eredményezi a stabilitási állandó jelentős változását, de az UV-látható és CD spektrumokban 320-330 nm körül megfigyelhető CT sáv bizonyítja a Cu(II)-S kölcsönhatás létrejöttét.

Ha a tripeptid közbenső helyzetben tartalmaz metionint (GlyMetGly, MetMetAla és MetMetMet) a CT sáv (az UV spektrumban ~310 nm-nél, míg CD spektrumban 340-360 nm tartományban) a  $[CuLH_1]$  komplex képződésével párhuzamosan jelentkezik. Az ESR spektrumok és az CD átmenet ellentétes előjele a tioétercsoport ekvatoriális koordinációját valószínűsítik.

A GlyGlyMet, MetGlyMet és MetMetMet  $[\text{CuLH}_2]^-$  összetételű komplexekben a  $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{COO}^-)$  és a  $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S})$  koordinációs mód is megvalósulhat. A kétféle, egymással egyensúlyban lévő izomer ESR paraméterei eltérőek, így oldatbeli arányuk meghatározható volt az egyes ligandumok esetén.

1.3. A **Pd(II)ion** számára a *tioétercsoport az elsődleges fémionkötőhely*, amely pH-tól függetlenül koordinálódik.

- A peptid oldalláncában található tioéterkén donoratom kötődése a képződő komplexek kiemelkedő termodinamikai stabilitását és az átmenetifém-ionok peptidkomplexeire jellemzőtől eltérő szerkezetek kialakulását eredményezi.
- A C-terminális, illetve közbenső helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek tioétercsoportja horgonydonorként viselkedik, így az amidnitrogén deprotonálódása és koordinálódása már erősen savas közegben bekövetkezik,  $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S})$  illetve  $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S})$  koordináció alakul ki.
- Ezzel ellentétben a tioétercsoport kötődése gátolja a tőle a C-terminális láncvég irányában található peptidcsoport deprotonálódását, így ez a folyamat a MetGlyGly esetében nagyobb pH-n játszódik le, míg a GlyMetGly második amidnitrogénje a teljes vizsgált pH-tartományban protonált marad, vagyis dipeptidszerű viselkedés tapasztalható.
- Utóbbi ligandum esetén egy- és háromfogú molekulákat tartalmazó biszkomplexek képződését is kimutattuk, ezek kötési izomereit a tioéter/amino-koordináció pH-függése és az NMR spektrumok alapján azonosítottuk.
- N-terminális metionint tartalmazó peptidekkel képződő biszkomplexekben ellenben az amino- és a tioétercsoport kötődésével hattaú kelátgyűrű képződik.

1.4. A donorcsoport fémionszelektivitását kihasználva **tioéterhidat tartalmazó vegyes fémkomplexek** állíthatók elő.

Koordinatív telítetlen Pd(II)komplexek ( $[\text{Pd}(\text{dien})]^{2+}$  illetve  $[\text{Pd}(\text{GlyMetH}_1)]$ ) szabad koordinációs helyére Cu(II)- illetve Ni(II)komplexek nem koordinálódó oldalláncában található tioétercsoport kötődésével képződő vegyes fémkomplexeiket is vizsgáltunk. A kölcsönhatás igazolására és egyensúlyi állandó számítására közvetlen módszerként a spektrofotometria, illetve síknégyszetes, diamágneses Ni(II)komplexek esetében az NMR spektroszkópia alkalmazható.

Megállapítottuk, hogy a képződő vegyes fémkomplex stabilitása kisebb, ha a Pd(II)törzskomplex tartalmaz kén donoratomot ( $[\text{Pd}(\text{dien})]^{2+}$  és  $[\text{Pd}(\text{GlyMetH}_{-1})]$  eredményeit összevetve), ami a két komplexbeli Pd(II)ion eltérő soft karakterével magyarázható. A kölcsönhatás mértékét az is befolyásolja, hogy a híd szerepét betöltő tioétercsoport mely fémion (Cu(II)- vagy Ni(II)) komplexének nem koordinálódó oldalláncában található. Pd(II)- és Cu(II)ionot tartalmazó vegyes fémkomplex stabilitási állandója kisebb, mint a megfelelő Pd(II)- és Ni(II)ionot tartalmazó komplexé. Ennek oka feltehetően az oldalláncbeli donorcsoport és a Cu(II)ion közötti igen gyenge axiális kölcsönhatás.

## 2. Aminosavak és peptidek Pb(II)komplexei

Az Pb(II)ion az aminosavakkal és peptidekkel igen kis stabilitású komplexeket képez, a peptidek amidnitrogénjének deprotonálódása és koordinálódása nem következik be. Egyes oldalláncbeli donoratomokkal kialakuló kölcsönhatás azonban növeli a komplexképződés mértékét.

- Kimutattuk, hogy a tioéter-, a karboxil- és az imidazolcsoportot tartalmazó aminosavak komplexének stabilitása nagyobb, mint a legegyszerűbb aminosav, a glicin megfelelő komplexéé. A tioéterkénatom és a fémion közötti gyenge kölcsönhatás azonban csak abban az esetben valósulhat meg, ha az Pb(II)iont a ligandum másik két donoratomja kelátként köti, s a kénatom koordinálódásával még egy öttagú kelát alakulhat ki (például az S-metil-cisztein Pb(II)komplexében). A hisztidin és az S-metil-cisztein esetében az oldalláncbeli donorcsoport koordinálódását NMR spektroszkópiás módszerrel is igazoltuk. Az eredményeink az irodalmi adatoktól egy ponton térnek el jelentősebben: a biszkomplexek képződését, az irodalommal ellentétben, nem tudtuk kimutatni.

- A Pb(II)komplex kismértékű stabilitásnövekedését eredményezi, ha a peptid N-terminális helyzetben aszparaginsavat illetve hisztidint tartalmaz. Utóbbi esetén az oldalláncbeli donoratommal kialakuló kölcsönhatást az NMR spektrumok is bizonyítják.

- A vizsgált három tiolcsoportot tartalmazó peptid a tiolátkén donoratommal kialakuló erős kölcsönhatás következtében a többi peptidnél lényegesen jobb komplexképző. A fő koordinációs hely szerepét a tiolcsoport tölti be, emellett a kénatommal kelátképző helyzetben lévő egyéb donoratomok is koordinálnak, a peptidnitrogén deprotonálódása azonban ezen ligandumok Pb(II)komplexeiben sem következik be.

A tiolokhoz való nagy affinitása következtében az Pb(II)ion a Zn(II)ionnal való kompetíció során kiszoríthatja a Zn(II)-t a tiolcsoportot tartalmazó metalloenzimekből, valamint a cinkujjakkból. Többek között ez a kölcsönhatás is okolható az Pb(II)ion élő szervezetre gyakorolt káros hatásáért.

### 3. A Cu,Zn-SOD aktív centrumát modellező peptidek Cu(II)- és Zn(II)komplexei

Megállapítottuk, hogy az enzimbéli aminosavszekvenciát kiugró fémmegkötő képesség jellemzi. Az AcHisValHisNH<sub>2</sub> és AcHisValGlyAspNH<sub>2</sub> jó komplexképző a Cu(II)- és Zn(II)ion számára.

- Az enyhén savas oldatban jelenlévő, ML összetételű komplexekben az enzimhez hasonló módon, makrokelát szerkezet jön létre.
- Az amidnitrogén deprotonálódása a ligandumok Zn(II)komplexeiben nem következik be. A Cu(II)ion esetén azonban az oldalláncbeli donorcsoportok horgonydonor szerepet töltenek be, azaz kötődésük elősegíti az amidnitrogének deprotonálódását és koordinálódását. Az AcHisValHisNH<sub>2</sub>-dal lúgos közegben [CuLH<sub>2</sub>] és [CuLH<sub>3</sub>]<sup>-</sup> komplexek képződnek, melyekben a peptid négy nitrogén donoratomja koordinálódik a fémionhoz. Míg az előbbiben a két deprotonálódott peptidnitrogén mellett a két imidazolnitrogén kötődik, az utóbbiban a deprotonálódó acetamidocsoport felváltja az N-terminális hisztidin imidazolcsoportját. Az AcHisValGlyAspNH<sub>2</sub> erősen lúgos oldatban képződő, [CuLH<sub>4</sub>]<sup>3-</sup> összetételű komplexében pedig a négy deprotonálódott amidnitrogéne keresztül koordináció kialakulását feltételezzük.
- Az N-acetil-hisztaminnal képződő vegyesligandumú komplexek stabilitása nem kiugró, ami arra enged következtetni, hogy az enzimbéli többmagvú szerkezet létrejöttében nem specifikus fémion-ligandum kölcsönhatás kialakulása, hanem az enzimfehérje konformációjának hatása a döntő.

#### IV. Az eredmények hasznosítási lehetőségei

Munkánk során egy biológiai szempontból igen jelentős vegyületcsoport, a peptidek komplexképző sajátosságait vizsgáltuk. Eredményeink és a belőlük levonható következtetések egyes biológiai folyamatok, hatások megértéséhez, új ligandumok tervezéséhez szolgáltathatnak hasznos információkat. A fémion-tioéterkén kölcsönhatás vizsgálatának fontosságát támasztja alá a kék rézproteinekben betöltött szerepük mellett az is, hogy a daganatos megbetegedések kezelése során alkalmazott platinatartalmú kemoterapikumok (pl. ciszplatin) hatásmechanizmusában, a szervezeten belüli transzportjában és mérgező hatásában is a Pt-tioéterkén kötést tartalmazó komplexek kialakulásának fontos szerepét valószínűsítik. A platínát modellező Pd(II)komplexekre kapott eredményeink azt mutatják, hogy a tioéter kénatom elsődleges fémmegkötőhely, s amennyiben nitrogén donoratomokkal kelátképző helyzetben van, koordinációja termodinamikailag is stabilis lehet.

A vegyes ligandumú, vegyes fémkomplexek elektrontranszfer rendszerek modelleinek tekinthetők, a folyamatok értelmezése során szolgáltathatnak hasznos információkat.

A természetes enzimfunkciót utánzó kismolekulatömegű vegyületek, szintetikus enzimek a betegségek kezelése során potenciális gyógyszerek lehetnek. Az enzimhez hasonló szerkezetű és koordinációs módú komplex esetén jelentős enzimaktivitást várhatunk, tehát modell ligandumok Cu(II)- és Zn(II)ionnal képezett komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata segítségünkre lehet potenciális SOD mimetikus komplexek kiválasztása során.

Az értekezés anyagához kapcsolódó közlemények:

1. K. Várnagy, B. Bóka, I. Sóvágó, D. Sanna, P. Marras and G. Micera:

**Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) and nickel(II) complexes of tripeptides of methionine**

*Inorg. Chim. Acta*, 275-276 (1998) 440-446.

2. B. Bóka, Z. Nagy, K. Várnagy and I. Sóvágó:

**Solution equilibria and structural characterisation of the palladium(II) and mixed metal complexes of peptides containing methionyl residues**

*J. Inorg. Biochem.*, 83 (2001) 77-89.

3. K. Ósz, B. Bóka, K. Várnagy, I. Sóvágó, T. Kurtán and S. Antus:

**The application of circular dichroism spectroscopy for the determination of metal ion speciation and coordination modes of peptide complexes**

*Polyhedron*, 21, (2002) 2149-2159.

4. B. Bóka, I. Sóvágó, A. Myari, J.C. Plakatouras, N. Hadjiliadis:

**Copper(II) and zinc(II) complexes of the peptides Ac-HisValHis-NH<sub>2</sub> and Ac-HisValGlyAsp- NH<sub>2</sub> related to the active site of the enzyme CuZnSOD**

*J. Inorg. Biochem.*, (közlésre előkészítve)

Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások, poszterek:

1. Bóka Beáta (témavezetők: dr. Várnagy Katalin, dr. Sóvágó Imre) (előadás)

**Metionintartalmú tripeptidek átmenetifém komplexei**

*XXIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, 1997. április 2-4. Pécs*

2. Katalin Várnagy, Imre Sóvágó, Beáta Bóka, Csaba Gábor Ágoston, Giovanni Micera and Daniele Sanna (poszter)

**Equilibrium and Spectroscopic Studies on Copper(II) Complexes of Peptides Containing Sulfur Atoms**

*The 3<sup>rd</sup> Cost D1 Workshop on Biocoordination Chemistry, 11-13 September 1997, Bergen, Norvégia*

3. Bóka Beáta (előadás)

**Tioéterhidat tartalmazó vegyes fémkomplexek képződésének vizsgálata**

*XXI. Kémiai Előadói Napok, 1998. október 26-28. Szeged*

4. Imre Sóvágó, Zoltán Nagy and Beáta Bóka (előadás)

**Thermodynamic, Kinetic and Structural Studies on Palladium(II) Complexes of Thioether Ligands**

*5<sup>th</sup> International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 13-17 April 1999, Ioannina, Görögország*

5. Bóka Beáta, Várnagy Katalin és Sóvágó Imre (előadás)

**Tioétercsoportot tartalmazó peptidek átmenetifém komplexeinek egyensúlyi és szerkezeti vizsgálata**

*XXXIV. Komplexkémiai Kollokvium, 1999. május 19-21. Tata*

6. Beáta Bóka and Imre Sóvágó (poszter)

**Palladium(II) Complexes of Peptides Containing Thioether Side Chains**

*V<sup>th</sup> Symposium on Inorganic Biochemistry, 23-27 September 1999, Wroclaw, Lengyelország*

7. B. Bóka and I. Sóvágó (poszter)

**Metal ion dependence of thioether coordination**

*10<sup>th</sup> International Conference on Bioinorganic Chemistry, 26-31 August 2001, Florence, Olaszország*

8. Bóka Beáta, Nagy Zoltán, Sóvágó Imre, Alexandra Myari, Nick Hadjiliadis (előadás)

**A Cu,Zn-SOD aktív centrumát modellező peptidek Cu(II)- és Zn(II)komplexei**

*XXXVIII. Komplexkémiai Kollokvium, 2003. május 21-23. Gyula*