Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Bioligandum - réz(II) egyensúlyi rendszerek ESR-spektroszkópiai vizsgálata vizes oldatban kétdimenziós értékelő módszerrel: mikroeloszlás és koordinációs módok

Nagy Nóra Veronika

Témavezető: Plánkáné Dr. Szabó Terézia

Szegedi Tudományegyetem

Fizikai Kémiai Tanszék

Szeged

2003

1. Bevezetés, célkitűzések

A réz az élő szervezetekben sokoldalú szerepet játszik. Leggyakrabban fehérjékhez kötődik, és bioredoxi folyamatokat katalizál. Többnyire az illető metalloenzim aktív centrumában található, vagy ha nem, akkor is döntő hatással van az aktív centrumra. A hisztidin oldallánc számos metalloenzim aktív centrumában vesz részt a fémion megkötésében. A rézvegyületek biológiai szerepének tisztázásához egyrészt a réz kötési helyek feltárása szükséges, másrészt a biológiai funkciót befolyásoló stabilitási, elektronszerkezeti és geometriai sajátságokra és az ezeket kialakító szerkezeti tényezőkre kell fényt deríteni. E célból gyakran kisebb molekulákat választanak modellként, ilyenek lehetnek a fehérjekomplexek esetében a kisebb-nagyobb tagszámú peptidek komplexei.

Részben ilyen megfontolásból, mint modellvegyületeket tanulmányoztam doktori munkám keretében a hisztidin tartalmú dipeptidek és néhány oligoglicin vizes oldatban képződő réz(II)-komplexeit. A fentebbi és kémiailag rokon ligandumok ugyanakkor nemcsak modellként szolgálhatnak, hanem maguk is biológiai hatásúak (pl. a triglicin és a tetraglicin réz(II)-komplexei szuperoxid-diszmutáz aktivitást mutatnak). Biológiai fontosságuk mellett (ami számos koordinációs kémikus érdeklődését felkeltette már az utóbbi egy-két évtizedben) az is indokolta tanulmányozásukat, hogy egészen új, fejlesztés alatt lévő ESR-spektroszkópiai értékelő módszert alkalmaztam, és e módszer tesztelése szempontjából kívánatos volt, hogy először olyan rendszereknél használjuk, amelyek többé-kevésbé ismertek.

Ugyancsak biológiai jelentősége miatt választottam vizsgálataim tárgyául néhány szekunder foszfinsav-réz(II) egyensúlyi rendszert (a bisz(aminometil)foszfinsav és nitrogénen szubsztituált származékainak komplexeit). Számos, a foszfinátcsoportot terminális pozícióban tartalmazó aminofoszfinát ligandumot tanulmányoztak már jelentős biológiai hatása miatt, de a láncközi foszfinátcsoportot tartalmazó ligandumok koordinációs tulajdonságai kevéssé ismertek. Ezek a molekulák oldalláncukban több erős donorcsoportot tartalmaznak, így biológiai aktivitásuk minden bizonnyal összefügg erős koordinációs hajlamukkal. A szimmetrikus szerkezetű foszfinsavaknál erős HIV proteáz gátló tulajdonságot mutattak ki; a bisz(L-prolino-N-metil)foszfinsavnak és a bisz(iminodikarboximetiL-N-metil)foszfinsavnak pedig (amelyeket jelen munkában is vizsgáltunk) növényi növekedést szabályozó hatása van.

Az ún. kétdimenziós ESR-spektroszkópiai értékelő módszer lehetőségeit kihasználva, célul tűztem ki (1) az oldatban kialakuló különböző összetételű komplexek, továbbá az azonos összetételű, de különböző szerkezetű molekulafajták (kötési és geometriai izomerek)

azonosítását és képződési állandóik meghatározását, az adott rendszerre jellemző mikroeloszlás felderítését; (2) az egyes komplexekben különböző helyzetben koordinálódó donorcsoportok azonosítását és (3) esetenként további szerkezeti sajátságok feltárását (fém-donoratom kötésjelleg, geometriai torzulás kimutatása).

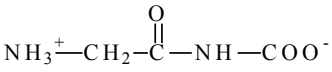
2. Az alkalmazott vizsgáló módszerek

A fentebbi rendszerek ún. komplex egyensúlyi rendszerek, amelyekben a komponensek (rézion, ligandum, H^+) koncentrációjától függően számos különféle összetételű komplex alakul ki. Az azonos összetételű komplexek is többféle szerkezeti formában létezhetnek attól függően, hogy az egymással versengő donorcsoportok közül melyek vesznek részt a koordinációban; ezen túlmenően geometriai izomerek is képződhetnek. Az ESR-spektroszkópia alkalmas az eltérő szerkezetű molekulafajták megkülönböztetésére, mert az egyes komplexek mágneses paraméterei érzékenyek a koordináció kis különbségeire is. Tipikusan azonban egyidejűleg többféle komplex van jelen adott oldatban, és ezek spektrumai átfedik egymást, ezért az egyes molekulafajták szerkezeti jellemzése érdekében fel kell bontani a mért görbéket a rendszerben képződő komplexek színképeire. Ennek megoldására a nemrégiben kifejlesztett, ún. "kétdimenziós" ESR-spektroszkópiai analízist alkalmaztam. A módszer elnevezése arra utal, hogy az adott rendszerben különböző körülmények között felvett spektrumok együttes értékelése során az ESR-jel intenzitását egyidejűleg két fizikai paraméter, a mágneses tér és a komponensek koncentrációjának függvényeként írja le. Így a rendszerről kétoldalú információt nyerünk: megkapjuk a komplexek stabilitási állandóit és ESR-paramétereit; előbbiekből kiszámíthatjuk az izomereket is megkülönböztető mikroeloszlást, utóbbiakból a koordinációs módokra (a rézionhoz kapcsolódó donorcsoportok minőségére, egyes fém-donoratom kötések jellegére, esetleges geometriai torzulásokra) következtethetünk.

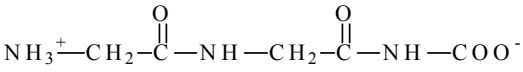
Ha a fenti értékelő módszert bonyolultabb rendszereknél alkalmazzuk, a nagyszámú paraméter egyértelmű meghatározásához jó kezdeti adatokra van szükségünk, amihez elengedhetetlen, hogy minél pontosabb egyensúlyi modellből induljunk ki. Ehhez nagy segítséget jelent a lineárisan független ESR-aktív részecskék számának előzetes meghatározása a rendszerben. E célból a "mátrix rang analízis (MRA) a maradék intenzitások módszerével" elnevezésű, tisztán matematikai elemzést adaptáltam az ESR-spektrumcsomagokra.

3. A vizsgált ligandumok

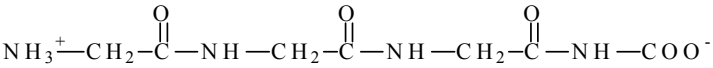
A vizsgált ligandumok egyrésze kereskedelmi forgalomban kapható, ezek a diglicin (GG), a triglicin (GGG), a tetraglicin (GGGG), a glicil-L-hisztidin (GH) és az L-hisztidil-glicin (HG). A szekunder foszfinsav ligandumokat a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén állították elő, tisztaságukat NMR-spektroszkópiai módszerrel ellenőrizték. Ezek a bisz(aminometil)foszfinsav (L1), a bisz(N-glicino-N-metil)foszfinsav (L2), a bisz(N-benzilglicino-N-metil)foszfinsav (L3), a bisz(L-prolino-N-metil)foszfinsav (L4) és a bisz(iminodikarboximetil-N-metil)foszfinsav (L5).



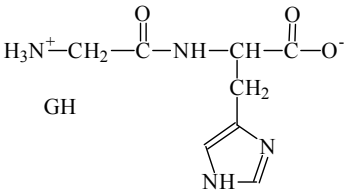
GG



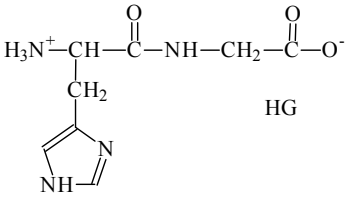
GGG



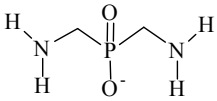
GGGG



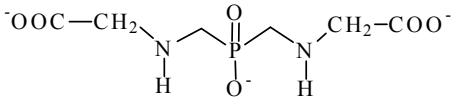
GH



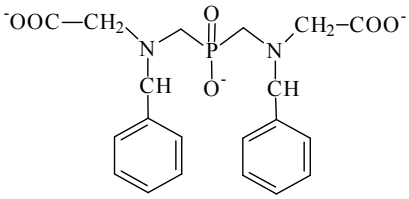
HG



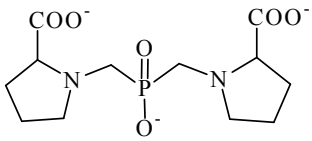
L1



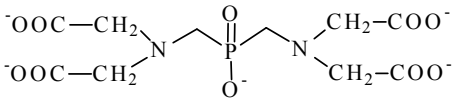
L2



L3



L4



L5

4. A legfontosabb új tudományos eredmények

A kétdimenziós értékelő módszer érzékenységének köszönhetően valamennyi rendszerben ki tudtam mutatni és jellemezni az irodalomban fel nem tételezett, új független komplexeket (elsősorban a savas tartományban olyan protonált komplexeket, amelyekben a ligandum(ok) protonszám változás nélkül kötődik(nek), néhány esetben a lúgos tartományban képződő deprotonált komplexeket; továbbá ESR-aktív és -inaktív oligomereket). Vizsgálataink felhívják a figyelmet arra is, hogy a legtöbb biszkomplex és egyes monokomplexek esetén izomeregyensúlyok alakulnak ki. (Fémkomplexek oldatbeli izomeregyensúlyai más módszerekkel rendkívül nehezen vagy nem vizsgálhatók.)

1. A réz(II) - oligoglicin rendszerekben nagyon változatos koordinációs módok alakulnak ki: a diglicin, triglicin és tetraglicin ligandumok esetén egyaránt 14-14 fémkomplexet mutattam ki.

a) Spektroszkópiai bizonyítékot találtunk arra, hogy az egymás utáni peptid-NH-csoportok lépcsőzetes deprotonálódásával kialakuló monokomplexekben a csatolt kelátgyűrűs szerkezetekeket erősen kovalens réz(II) - N síkbeli σ-kötések stabilizálják.

b) A csatolt kelátgyűrűs struktúrák a biszkomplexekben is kedvezményezettek: (i) az LH_{-1} ligandum stabil háromfogú ekvatoriális koordinációja a diglicin $[CuL_2H_{-1}]^-$ komplexét széles pH-tartományban dominánssá teszi, gátolva a $[CuL_2H_{-2}]^{2-}$ komplex képződését, amihez vagy szükség van a második kelátgyűrű felszakadására (ez valósul meg a 2. izomerben), vagy a második ligandum fémion-indukált deprotonálódását elősegítő horgonycsoport axiális helyzetbe kényszerül (ez alakul ki az 1. izomerben). (ii) A tetraglicin $[CuL_2H_{-1}]^-$ komplexének nagyobb mennyiségben képződő izomerjében (LH_2+LH) koordináció jön létre. (iii) A triglicin és tetraglicin esetében a $[CuL_2H_{-2}]^{2-}$ komplex mindkét izomerjében (LH_{-2}+L)-típusú a koordináció.

2. A réz(II) - glicil-L-hisztidin rendszerben a C-terminális helyzetű oldalláncbeli donorcsoport eltérő koordinációs szerepet játszik savas és közel semleges, illetve lúgos oldatokban.

a) Kevésbé lúgos és savas oldatokban, pH=10 alatt az egyszerű dipeptidkomplexekéivel megegyező vagy azokkal analóg koordinációs módok alakulnak ki a glicil-L-hisztidin kötődésekor; az oldalláncbeli imidazolcsoport csupán a $[CuLH_{-1}]$ komplexben és a biszkomplexek LH_{-1} összetételű ligandumában koordinálódik: a karboxilátocsoportot szorítja ki a harmadik ekvatoriális pozícióból. A $[CuL_2]$ és $[CuL_2H_{-1}]^-$ biszkomplexek megfelelő izomerjeinek koordinációs módjai azonosak; az LH és L ligandumok amino-

N és peptid-O atomjaikkal kapcsolódnak a fémionhoz, az izomerpárokban e donoratomok ekvatoriális, ill. axiális helyzete felcserélődik.

b) Lúgos oldatokban, pH=10 felett a pirrol-NH deprotonálódása jelentősen megváltoztatja a koordinációs sajátságokat. Ekvimoláris oldatban három részecske van egyensúlyban: a monomer $[CuLH_{-2}]^-$ komplex, amelyben az imidazolgyűrű deprotonálódott, kis koncentrációbam képződik; az imidazoláto-hidakkal összekapcsolt $[Cu_4L_4H_{-8}]^{4-}$ ESR-inaktív, ciklikus tetramer van jelen legnagyobb mennyiségben, és kevés $[CuLH_{-1}(OH)]^-$ vegyes hidroxokomplex is kialakul a rendszerben.

3. A réz(II) - L-hisztidil-glicin rendszerben a peptidváz és a hisztaminszerű N-terminális rész versengése a réz(II)ion körüli helyekért változatos koordinációs módokat hoz létre. A csatolt kelátgyűrűs szerkezetek nagy stabilitása ebben a rendszerben is megnyilvánul: majdnem minden körülmények között kialakul a váz-donorcsoportok dipeptidszerű háromfogú koordinációja (kivéve az erősen savas oldatokat, továbbá a ligandumfelesleget tartalmazó közel semleges oldatokat).

a) Erősen savas közegben az oldallánc játszik meghatározó szerepet, egyfogú imidazol, majd hisztaminszerű koordináció jön létre a $[CuLH_2]^{3+}$, ill. $[CuLH]^{2+}$ komplexekben.

b) A peptidcsoport deprotonálódása is bekövetkezik mérsékelten savas oldatban, pH=3 fölött, valamivel nagyobb valószínűséggel, mint a hisztaminszerű kötődés (a $[CuL]^+$ két izomerjében alakul ki e kétféle koordináció). Ligandumfeleslegben, a $[CuL_2H]^+$ molekulafajtában a két ligandum kapcsolódása révén egyidejűleg van jelen a dipeptidszerű háromfogú, ill. az egyfogú imidazol kötésmód.

c) Ekvimoláris oldatban semleges és lúgos közegben pH 12-ig az egyszerű dipeptidek háromfogú ekvatoriális koordinációja a meghatározó. Az oldallánc csak híd szerepet tölt be (az aktív $[Cu_2L_2H_{-2}]$ dimerben), amely erősen lúgos oldatban felbomlik, és kialakulnak a szokásos $[Cu_2L_2H_{-3}]^-$ és $[CuLH_{-2}]^-$ vegyes hidroxokomplexek..

d) Ligandumfeleslegnél, közel semleges oldatban az N-terminális rész hisztaminszerű koordinációja felülkerekedik a peptidszerű kötődésen: az egyik L ligandum diekvatoriálisan kapcsolódik mindkét $[CuL_2]$ izomerben, míg a másik ligandum az egyik izomerben két ekvatoriális, a másik izomerben egy ekvatoriális és egy axiális pozíciót foglal el.

e) pH=9 felett ligandumfeleslegben is a váz donoratomjai veszik át a főszerepet, a c) pontban ismertetett molekulafajtákban, továbbá a $[CuL_2H_{-1}]^-$ komplexben is. Utóbbiban a

második ligandum N-terminális donorcsoportjainak ekvatoriális-axiális kapcsolódása révén jelen van a hisztaminszerű koordináció is.

4. A N-en szubsztituált bisz(aminometil)foszfinátok réz(II)-komplexeinek koordinációs módjai és stabilitása több tényező együttes hatása alapján értelmezhető (egy, két, ill. három donorcsoport erős koordinációs képessége a ligandum mindkét végén, a csatolt kelátgyűrűs szerkezetek merevsége és feszülése, amit eltérő mértékben befolyásolnak a nem koordinálódó szubsztituensek, a ligandumok donorcsoportjainak eltérő bázicitása, a foszfinát- és karboxilátcsoportok közötti versengés a rézion kötéshelyeiért).

a) Ha az aminocsoportokon nincsenek szubsztituensek (L1 ligandum), különböző mono- és biszkomplexek képződnek. A deprotonált ligandum diaminszerűen kötődik, míg az egyik aminocsoportján protonált ligandum aminofoszfináto-típusú koordinációt alakít ki.

b) Amikor mindkét aminocsoporton van egy-egy karboximetil-szubsztituens (L2, L3 és L4 ligandumok), az aminokarboxiláto kötésmód és a monokomplexek kedvezményezettek. A terminális donorcsoportok egyidejű koordinációja nagy stabilitást biztosít a CuL komplex számára, különösen az L2 ligandumnál. Ugyanakkor a nem koordinálódó szubsztituensek sztérikus hatása (L3) vagy a ligandum merev szerkezete, ha a N egy merev gyűrű része (L4) ellensúlyozza a fenti effektust: a CuL komplex képződése magasabb pH-kra tolódik, nő a dimerizációs hajlam; fémfeleslegben jelentős mennyiségű Cu_2L alakul ki.

c) Ha mindkét nitrogénatomon két karboximetil-csoport helyezkedik el (L5), mindkét láncvég háromfogú koordinációra képes, ami nagy stabilitású kötésmódnak bizonyult. Kétmagvú és dimer komplexekben valósul meg, geometriai torzulások kíséretében.

Az értekezés anyagához kapcsolódó közlemények

1. T. Szabó-Plánka, **N. Nagy**, A. Rockenbauer, L. Korecz: An ESR study of the copper(II) - glycyl-l-histidine system in aqueous solution by the simultaneous analysis of multi-component spectra. Formation constants and coordination modes, *Polyhedron*, **19**, 2049-2057 (2000). IF=1.200

2. T. Szabó-Plánka, **N. V. Nagy**, A. Rockenbauer, L. Korecz: Microspeciation in the copper(II) - L-histidylglycine system. An ESR study by the two-dimensional computer simulation method, *Inorg. Chem*., **41**, 3483-3490 (2002). IF=2.946

3. **N. V. Nagy**, T. Szabó-Plánka, A. Rockenbauer, G. Peintler, I. Nagypál, L. Korecz: Great structural variety of complexes in copper(II)-oligoglycine systems. Microspeciation and coordination modes as studied by the two-dimensional simulation of electron paramagnetic resonance spectra, *J. Am. Chem. Soc.,* **125**, 5227-5235 (2003). IF=6.079

4. T. Szabó-Plánka, A. Rockenbauer, **N. V. Nagy**, G. Peintler, I. Nagypál, L. Korecz: Use of the two-dimensional EPR evaluation method in the study of equilibria of paramagnetic metal complexes, *Progress in Coordination and Bioinorganic Chemistry,* **6**, 175-180 (2003), Eds. M. Melník and A. Sirota, Slovak Technical University Press, Bratislava, Slovakia. IF=0

5. **N. V. Nagy**, T. Szabó-Plánka, Gy. Tircsó, R. Király, Zs. Árkosi, A. Rockenbauer, and E. Brücher: Copper(II) complexes of some N-substituted bis(aminomethyl)phosphinate ligands. An integrated EPR study of microspeciation and coordination modes by the two-dimensional evaluation method. *Közlésre benyújtva*

Az értekezés anyagához nem kapcsolódó közlemények

1. K. Felföldi, M. Sutyinszky, **N. Nagy** and I. Pálinkó: Synthesis of E- and Z-o-methoxy-substituted 2,3-diphenyl propenoic acids and its methyl esters. *Synth. Commun.* **30**, 1543-1553 (2000). IF=0.86

2. Zs. Árkosi, T. Szabó-Plánka, A. Rockenbauer, **N. V. Nagy**, L. Lázár, F. Fülöp: An electron paramagnetic resonance study of copper(II)-β-substituted β-amino acid systems by the two-dimensional simulation method. First evidence of primarily steric effects of substituents on equilibria of metal complexes, *Inorg. Chem*. **42**, 4842-4848 (2003). IF=2.946

Az értekezés anyagához kapcsolódó konferencia előadások és poszterek

1. Plánkáné Szabó T., **Nagy N.**, Rockenbauer A., Korecz L.: A réz(II) - glicil-l-hisztidin egyensúlyi rendszer ESR-spektroszkópiai vizsgálata, *XXXIV. Komplexkémiai Kollokvium,* Tata, 1999 (előadás)

2. **Nagy N.**, Plánkáné Szabó T., Rockenbauer A. és Korecz L.: A képződési állandók és a koordinációs módok ESR-spektroszkópiai meghatározása a réz(II) - l-hisztidil-glicin egyensúlyi rendszerben, *XXXV. Komplexkémiai Kollokvium,* Kecskemét, 2000 (előadás)

3. **Nagy N.**, Plánkáné Szabó T., Peintler G., Rockenbauer A. és Korecz L.: Kétdimenziós ESR-spektroszkópiai vizsgálatok alapján kialakított egyensúlyi modell a réz(II) - triglicin rendszerben, *XXXVI. Komplexkémiai Kollokvium*, Pécs, 2001 (előadás)

4. **Nagy N.**, Plánkáné Szabó T., Rockenbauer A., Árkosi Zs., Korecz L. Tircsó Gy., Király R., Brücher E.: Szekunder foszfinsavak Cu(II)komplexeinek egyensúlyi és szerkezetvizsgálata kétdimenziós ESR-spektroszkópiai módszerrel, *XXXVII. Komplexkémiai Kollokvium,* Mátraháza, 2002 (előadás)

5. **N. V. Nagy**, T. Szabó-Plánka, Gy. Tircsó, R. Király, Zs. Árkosi, A. Rockenbauer, E. Brücher: Microspeciation and coordination modes in solutions of copper(II) and some aminocarboxylate ligands containing in-chain phosphinate group. A two-dimensional EPR study, *19th International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry*, Smolenice, Slovakia, 2003. p. 78 (poszter)

6. T. Szabó-Plánka, A. Rockenbauer**, N. V. Nagy**, G. Peintler, I. Nagypál, L. Korecz: Use of the two-dimensional EPR evaluation method in the study of equilibria of paramagnetic metal complexes, *19th International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry,* Smolenice, Slovakia, 2003. p. 98 (előadás)

7. **N. V. Nagy**, T. Szabó-Plánka, Gy. Tircsó, R. Király, Zs. Árkosi, A. Rockenbauer, and E. Brücher: A two-dimensional EPR study of copper(II) and some N-substituted bis(aminomethyl)phosphonic acid. Microspeciation and coordination modes, *28th International Conference on Solution Chemistry,* Debrecen, Hungary, 2003. p.C-P16 (poszter)

Az értekezés anyagához nem kapcsolódó poszterek

1. Zs. Árkosi, T. Szabó-Plánka, A. Rockenbauer**, N. V. Nagy**, L. Lázár, F. Fülöp: A two-dimensional EPR study of copper(II)-β-substituted β-amino acid systems. Steric effects of the substituents on equilibria of metal complexes. *19th International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry*, Smolenice, Slovakia, 2003. p. 73

2. Zs. Árkosi, T. Szabó-Plánka, A. Rockenbauer, **N. V. Nagy**, L. Lázár, F. Fülöp: A two-dimensional EPR study of copper(II)-β-substituted β-amino acid systems. Steric effects of the substituents on equilibria of metal complexes. *28th International Conference on Solution Chemistry,* Debrecen, Hungary, 2003 p. A-P2