

# A $\gamma$ -karboxi-glutaminsav és néhány rokonvegyületének protonálódási, kalcium- és magnézium-komplexbépzési mikrofolyamatai\*

BURGER KÁLMÁN, SIPOS PÁL, VÉBER MARGIT és HORVÁTH ISTVÁN

JATE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, 6720 Szeged, Dóm tér 7.

NOSZÁL BÉLA

ELTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, 1088 Budapest, Múzeum krt. 4/b.

LŐW MIKLÓS

Kőbányai Gyógyszerárugyár, 1103 Budapest, Gyömrői út 19-21.

A  $\gamma$ -karboxi-glutaminsav (GLA) fontos szerepet játszik a K-vitamin dependens véralvadási faktorok és más kalciumion-függő fehérjék fémion- (elsősorban kalciumion) koordinációjában<sup>1-7</sup>.

A GLA 1974-es felfedezését követően<sup>8</sup> a természetes eredetű GLA-tartalmú polipeptidok fémion-koordinációjának tanulmányozása során<sup>9-16</sup> bebizonyosodott, hogy a GLA oldallánccok részt vesznek a fémionmegkötésben és a képződő komplexek viszonylag nagy stabilitásúak. E komplexképzés megváltoztatja a fehérje szekunder struktúráját is, és kalcium-hidak révén fehérje-fehérje kapcsolatok ill. fehérje-foszfolipid vegyesligandumú komplexek is létrejöhetnek.

A GLA protonálódási állandóit pH-metriás, elektroforetikus<sup>17</sup> és <sup>13</sup>C NMR<sup>18</sup> módszerrel határozták meg. Az így nyert protonálódási állandók azonban — főleg az alacsonyabb pK-k esetében — jelentősen eltérnek egymástól.

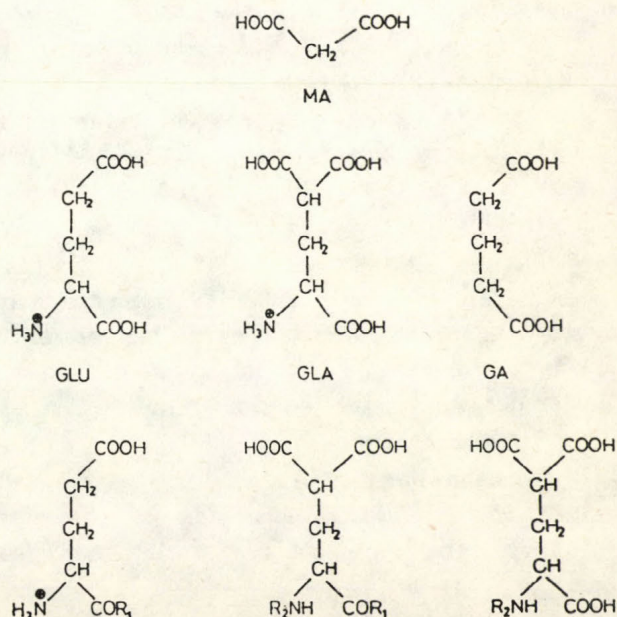
A GLA és szintetikus előállított, a K-vitamin dependens fehérjéket funkcionálisan modellező GLA tartalmú kisseptidek fémion-koordinációjának vizsgálata is ellentmondásos eredményekre vezetett. Megállapították, hogy a szabad GLA kalciumionnal csak kevéssé stabil 1:1 összetételű komplexet képez ( $\log K = 1,3$ )<sup>17,18</sup>, viszont a két szomszédos GLA-t („tandem”) tartalmazó kisseptidek már közel olyan egyensúlyi stabilitású kalcium-komplexet képeznek<sup>17,19,20</sup>, mint a protrombin ( $\log K = 3,5$ )<sup>16</sup>. Megállapították, hogy a biner M-GLA komplexekben (M = Gd<sup>3+</sup>, Tb<sup>3+</sup>, Eu<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) a fémion koordinációs szférájának egyik fele szabad, így hozzáférhető egy másik ligandum (pl. egy másik

GLA oldallánc vagy a membránfoszfolipid hidrofíli része) számára<sup>18,21</sup>. A GLA-nak ezt a sajátosságát később röntgenszerkezeti adatokkal<sup>22</sup> és elméleti számításokkal<sup>23</sup> is igazolták. A magányos GLA-t és a GLA-tandemet tartalmazó kisseptidek Eu<sup>3+</sup>-mal képzett komplexei viszont meglepő stabilitási és szerkezeti hasonlóságot mutattak<sup>12a,b</sup>.

Kutatásaink célja a GLA és származékai protonálódási mikroegyensúlyainak egzakt megismerése és ezen keresztül annak kimutatása, hogy a polipeptidlánc milyen hatást gyakorolhat a GLA oldalláncára, hogyan változtatja meg a protonálódó csoportok bázicitását és ezzel fémi-onkoordinációs készségét.

1. táblázat

A vizsgált vegyületek szerkezeti képletei és a szövegben használt rövidítések.  
(R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>CO-; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>NH-)



\* E dolgozat az Inorganica Chimica Actában (152. 233. 1988.) megjelent közlemény magyar nyelvű változata.

E célból a következő vegyületek vizsgálatát végeztük el (1. táblázat).  $\gamma$ -karboxi-DL-glutaminsav (GLA), N-acetil- $\gamma$ -karboxi-DL-glutaminsav (PNGLA), N-acetil- $\gamma$ -karboxi-DL-glutaminsav- $\alpha$ -metilamid (PGLA), DL-glutaminsav- $\alpha$ -metilamid (PCGLU), DL-glutaminsav (GLU), malonsav (MA), glutársav (GA). A méréseket pH-metriás módszerrel, 1 mol/dm<sup>3</sup> (NaCl) ionerősségen, 25°C-on hajtottuk végre. Jelen közleményünkben a mérések eredményeiről számolunk be.

## Kísérleti rész

### Anyagok

A GLA és származékainak előállítása céljából N-benziloxikarbonil-DL- $\gamma$ -karboxi-glutaminsav- $\gamma$ ,  $\gamma$ -di-t-butilészter<sup>24</sup> szerinti hidrogénezésével DL- $\gamma$ -karboxi-glutaminsav- $\gamma$ ,  $\gamma$ -di-t-butilésztert állítottunk elő<sup>25</sup>, amelyet ecetsavanhidriddel acetileztünk piridines közegben. Az így nyert N-acetil-DL- $\gamma$ -karboxi-glutaminsav- $\gamma$ ,  $\gamma$ -di-t-butilésztert és DL- $\gamma$ -karboxi-glutaminsav- $\gamma$ ,  $\gamma$ -di-t-butilésztert trifluorecetsavas kezeléssel alakítottuk át N-acetil-DL- $\gamma$ -karboxi-glutaminsavvá (amorf, FAB-MS: M-H<sup>+</sup>: 234) és DL- $\gamma$ -karboxi-glutaminsavvá<sup>25,26</sup>.

Az N-acetil-DL- $\gamma$ -karboxi-glutaminsav- $\alpha$ -metilamid előállítása során először N-benziloxikarbonil-DL- $\gamma$ -karboxi-glutaminsav- $\gamma$ ,  $\gamma$ -di-t-butilésztert és metil-ammónium-pentafluor-fenolátot kondenzáltunk diciklohexil-karbodiimiddel<sup>27</sup>. A hidrogénezés és acetilezés, majd az ezt követő trifluorecetsavas kezelés kristályos terméket eredményezett (Op.: 142–144°C). Ez utóbbi műveletsort az acetilezés nélkül megismételve DL-glutaminsav- $\alpha$ -metilamidot (amorf, FAB-MS: M-H<sup>+</sup>: 161) nyertünk a várt DL- $\gamma$ -karboxi-glutaminsav- $\alpha$ -metilamid helyett.

Minden kristályos vegyület mikroanalízise kielégítő eredményre vezetett, az <sup>1</sup>H NMR spektrumok (Varian EM 360) összhangban voltak a szerkezettel.

A többi anyag: a DL-glutaminsav, a malonsav, a glutársav „Fluka” p.a. minőségű volt. A mérések során felhasznált egyéb vegyszerek szintén p.a. minőségűek. Az oldatok készítéséhez kétszer desztillált vizet használtunk.

A pH-metriás egyensúlyi méréseket korábbi dolgozatunkban<sup>28</sup> leírt módon  $\sim 2,5 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup> ligandumkoncentrációjú, 1,0 mol/dm<sup>3</sup> ionerősségre beállított rendszerekben végeztük el.

A Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup> komplexképződés tanulmányozása során az ionerősséget CaCl<sub>2</sub>-vel ill. MgCl<sub>2</sub>-vel állítottuk be. Ilyen körülmények között az azonos fogyáshoz tartozó elektromotoros erő értékek különbsége a komplexképző fémiont tartalmazó ill. nem tartalmazó rendszerek között 15–30 mV körüli érték volt. Az értékelés során csak az abban a pH-tartományban nyert adatokat vettük figyelembe, ahol a fémionok hidrolízise még nem indult meg.

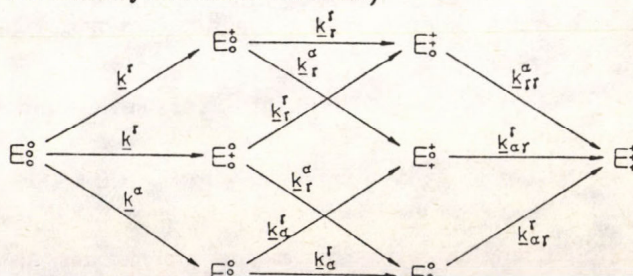
### Berendezés

A mérésekhez „Radiometer” G202 B félmikrométerű üvegelektrodot és „Radelkis” OP-08303 típusú, kettős diffúziós határrétegű Ag/AgCl vonatkoztatási elektrodot alkalmaztunk. Az elektrodoköpeny töltőfolyadékáa 1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl. A méréseket 25,0 $\pm$ 0,1°C-ra termosztált, zárt mérőedényben hajtottuk végre, nagytisztaságú N<sub>2</sub>-gáz folyamatos átbuborékolatása mellett.

A mérést egy „on line” üzemű számítógép-vezérlésű automatikus titrálóberendezés segítségével végeztük el, amelyet a <sup>29</sup>-ben leírt módon állítottunk össze, annak kivételével, hogy a vezérlést egy „ZX Spectrum” számítógép végezte. A mérési adatok kiértékelése is számítógépi úton történt.

### Értékelő módszer a mikroállandók meghatározására

Protonálódási mikroállandók meghatározására számos kombinált pH-metriás és spektroszkópiás módszert dolgoztak ki<sup>30,31</sup>. E módszerek azonban a GLA típusú vegyületek esetében nem használhatók a funkciós csoportok spektroszkópiás tulajdonságainak hasonlósága és a köztük lévő szénatomok kis száma miatt<sup>32</sup>. Mikroállandókat az ilyen esetekben deduktív módszerrel lehet meghatározni<sup>33</sup>. E módszert a GLA és a PNGLA esetében a következőképpen alkalmaztuk. A három karboxilcsoport protonálódási sémája (figyelembe véve, hogy a GLA  $\alpha$ -aminocsoportjának protonáltsági állapota e pH-tartományban nem változik):



A  $E_3^0$  sémán a két felső csoport az ekvivalens  $\gamma$ , az alsó az  $\alpha$ -COO<sup>-</sup> csoportot jelöli. A mikroállandók indexelése úgy történt, hogy a felső indexben az adott folyamatban protonálódó, az alsó index(ek)ben a már protonált csoportokat tüntettük fel.

$$\beta_1 = 2k^\gamma + k^\alpha \quad (1)$$

$$\beta_2 = k^\gamma \cdot k_\gamma^\gamma + k^\gamma \cdot k_\alpha^\alpha + k^\alpha \cdot k_\alpha^\gamma \quad (2)$$

$$\beta_3 = k^\alpha \cdot k_\alpha^\alpha \cdot k_\alpha^\gamma = k^\gamma \cdot k_\alpha^\alpha \cdot k_\alpha^\gamma = k^\gamma \cdot k_\gamma^\gamma \cdot k_\alpha^\alpha \quad (3)$$

Azonos csoportra vonatkozó megfelelő mikroállandók hányadosával két csoport kölcsönhatásának a mértéke kvantitativ megadható. Pl.

$$\frac{k_i^j}{k_i^i} \equiv \frac{k_j^j}{k_j^j} = E_{i,j} \quad (4)$$

ahol  $E_{i,j}$  az  $i$  és a  $j$  csoportok közti kölcsönhatási tényező.

Szimmetrikus dikarbonsavak (pl. MA, GA) esetén ennek értéke a makroállandókból is számítható:

$$E_{i,j} = \frac{K_1}{4K_2} \quad (5)$$

A kölcsönhatási tényezők felhasználásával az (1)–(3) egyenletekben lévő alsó indexszel is jelölt mikroállandók az alábbi módon fejezhetők ki:

$$k_\gamma^\gamma = k^\gamma \cdot E_{\gamma\gamma} \quad (6)$$

$$k_\alpha^\alpha = k^\alpha \cdot E_{\alpha\alpha} \quad (7)$$

$$k_\alpha^\gamma = k^\alpha \cdot E_{\alpha\gamma} \quad (8)$$

$$k_{\alpha\gamma}^\gamma = k_\alpha^\alpha \cdot E_{\gamma\gamma} = k^\gamma \cdot E_{\alpha\gamma} \cdot E_{\gamma\gamma} \quad (9)$$

$$k_{\alpha\gamma}^\alpha = k_\alpha^\alpha \cdot E_{\alpha\gamma} = k^\alpha \cdot E_{\alpha\gamma}^2 \quad (10)$$

(6)–(10)-et visszahelyettesítve (1)–(3)-ba

$$\beta_1 = 2k^\gamma + k^\alpha \quad (11)$$

$$\beta_2 = (k^\gamma)^2 \cdot E_{\gamma\gamma} + 2k^\alpha k^\gamma E_{\alpha\gamma} \quad (12)$$

$$\beta_3 = (k^\gamma)^2 k^\alpha E_{\gamma\gamma} E_{\alpha\gamma}^2 \quad (13)$$

A  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  állandókat\* a szokásos pH-metriás módszerrel, az  $E_{\alpha\gamma}$ ,  $E_{\gamma\gamma}$  felhasadási tényezőket pedig az MA és GA makroállandóiból meghatározva  $k^\alpha$ ,  $k^\gamma$  protonálódási mikroállandókhöz, majd a (6)–(10) egyenletben megadott mikroállandókhöz jutottunk. Számításaink során a GLA és a PNGLA esetében azokat a  $k^\alpha$ ,  $k^\gamma$  értékpárokat határoztuk meg, amelyek a legkisebb eltéréssel egyszerre elégítik ki mindhárom egyenletet.

A protonálódási mikroállandók ismeretében megadhatók a részecskék képződési fok függvé-

nyei. Speciálisan a GLA és a PNGLA esetére a következő összefüggések érvényesek:

$$\alpha_{E_3^0} = \frac{1}{A} \quad (14)$$

$$\alpha_{E_2^0} = \frac{2k^\gamma \cdot [H^+]}{A} \quad (15)$$

$$\alpha_{E_1^0} = \frac{k^\alpha \cdot [H^+]}{A} \quad (16)$$

$$\alpha_{E_3^+} = \frac{k^\gamma \cdot k_\gamma^\gamma \cdot [H^+]^2}{A} \quad (17)$$

$$\alpha_{E_2^+} = \frac{2k^\alpha \cdot k_\alpha^\alpha \cdot [H^+]^2}{A} \quad (18)$$

$$\alpha_{E_1^+} = \frac{k^\gamma \cdot k_\gamma^\alpha \cdot k_\alpha^\gamma \cdot [H^+]^3}{A} \quad (19)$$

$$A = \sum_{i=1}^3 \beta_i \cdot [H^+]^i \quad (20)$$

Figyelembe véve, pl. hogy az

$$\frac{\alpha_{E_3^0}}{\alpha_{E_2^0} + \alpha_{E_1^0}} = \frac{k^\alpha}{\beta_1} \quad (21)$$

hányados megadja az egyszer protonált részecskék közül azoknak a hányadát, amelyek a  $\alpha$ -karboxil csoportjukon protonáltak, és ez a számítás elvégezhető a kétfajta lehetséges kétszer protonált részecskére is, kiszámítható, hogy a GLA és PNGLA három különböző lehetséges protonálódási útvonala közül — a szó statisztikai értelmében — melyik milyen valószínűségű.

2. táblázat

A vizsgált vegyületek protonálódási makroállandói

	log $K_1$	log $K_2$	log $K_3$	log $K_4$
MA	4,97	2,71	–	–
GA	4,82	4,11	–	–
GLU	9,50	4,07	2,39	–
PCGLU	7,87	3,94	–	–
GLA	9,60	4,33	2,66	1,80
PNGLA	4,82	3,32	2,45	–
PGLA	4,68	2,38	–	–

A két karboxilcsoportot tartalmazó vegyületek mikroállandóinak ill.  $\alpha$ -pH függvényeinek kiszámítása a fenti összefüggésekkel analóg módon adható meg.

A képződő Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup> komplexek stabilitási állandóinak kiszámításához a ligandumoknak a komplexképző fémion jelenlétében kapott  $Z_H$  függvényeiből indultunk ki. Az alkalmazott modellfüggvény általános alakja

$$Z_H = \frac{\text{ligandumhoz kötött proton}}{\text{összes ligandum}} = \frac{\sum_{i=1}^N i \cdot \beta_i \cdot [H^+]^i + \sum_{i=1}^{N-1} i \cdot K_i^C k_i^M \cdot [H^+]^i \cdot [M^{2+}]}{\sum_{i=0}^N \beta_i \cdot [H^+]^i + \sum_{i=1}^{N-1} K_i^C k_i^M \cdot [H^+]^i \cdot [M^{2+}]} \quad (22)$$

ahol  $N$  a protonok száma,  $k_i^M$  az  $i$ -szeresen protonált részecskéhez tartozó megfelelő mikroállan-

dók szorzata,  $K_i^C$  pedig az  $i$ -szeresen protonált

\* A GLA esetében  $\beta_1 = K_2$ ,  $\beta_2 = K_2 K_3$ ,  $\beta_3 = K_2 K_3 K_4$  mivel  $K_1$  az  $\alpha$ -aminocsoport protonálódási ál-

landója, és a karboxilcsoportok protonálódási tartományában protonáltsági állapota nem változik.

részecske fémkomplexének stabilitási állandója. A  $K_i^C \cdot k_i^M$  szorzatokat számítógépes program segítségével, legkisebb négyzetes finomítással határoztuk meg. E számításokat az összes olyan ligandumokra elvégeztük, amelyek geminálisan két protonálódó csoportot tartalmaznak.

### Kísérleti eredmények ismertetése

#### Protonálódási folyamatok

A vizsgált vegyületek protonálódási makroállandóit a 2. táblázatban mutatjuk be. Az állandók bizonytalansága:

$$\log K > 3 : 0,05$$

$$2 < \log K < 3 : 0,1$$

$$2 > \log K : 0,2$$

A MA\* és PGLA protonálódási makroállandóinak ismeretében a  $\log E_{\gamma\gamma} = -1,68$ , a GA esetében  $\log E_{\alpha\gamma} = -0,11$ . Ezek az adatok jó egyezést mutatnak a GA és MA irodalmi adataival<sup>34</sup>.

3. táblázat

A vizsgált vegyületek karboxilátcsoportjaira vonatkozó protonálódási mikroállandók

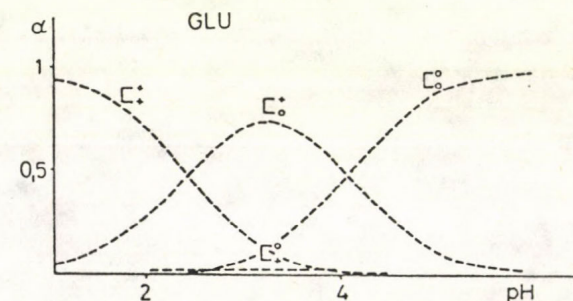
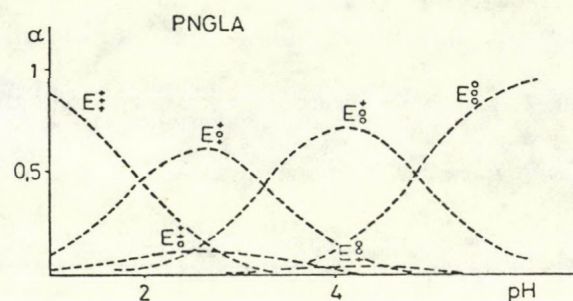
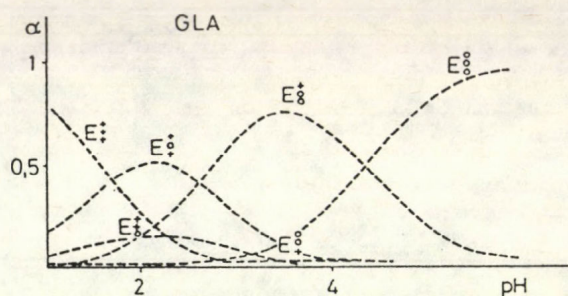
	$\log k_1^\gamma$	$\log k_2^\alpha$	$\log k_1^\gamma$	$\log k_2^\alpha$	$\log k_1^\gamma$	$\log k_2^\alpha$	$\log k_1^\gamma$	$\log k_2^\alpha$
MA	4,67	-	3,01	-	-	-	-	-
GA	4,52	-	-	4,41	-	-	-	-
GLU	4,06	2,51	-	2,40	3,95	-	-	-
PCGLU	3,94	-	-	-	3,94*	-	-	-
GLA	4,02	2,66	2,34	2,55	3,91	2,44	2,23	-
PNGLA	4,52	3,39	2,84	3,28	4,41	3,17	2,73	-
PGLA	4,38	-	2,68	-	4,38*	-	2,68*	-

(A MA karboxilcsoportjait a szerkezeti hasonlóság miatt  $\gamma$ -val jelöltük. A \*-gal jelölt mikroállandók becsült értékek, magyarázatot ld. a szövegben.)

A (11)–(13) egyenletek alapján kiszámított karboxilát mikroállandókat a 3. táblázatban tüntettük fel. A GLA és a PNGLA esetében a (11)–(13) egyenletek bal és jobb oldala közötti eltérés nem haladja meg a 0,02 log egységet\*\*, ez természetesen az illesztés és nem a mérés hibája. Ez a feltűnően jó egyezés megerősíti a GLA  $\log K_4 = 1,8$ -es értékét. Ez az érték éppen az elektroforézissel ( $\log K_4 = 1,6$ )<sup>17</sup> és a <sup>13</sup>C NMR-rel

\* A GLA  $\gamma$ -helyzetű karboxilcsoportjaihoz szerkezetileg hasonló MA karboxilcsoportokat  $\gamma$ -val jelöltük.

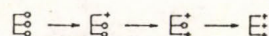
\*\* A (11)–(13) egyenletek logaritmus Taylor sorából az elsőrendű tag figyelembevételével  $\Delta \log \beta_i = \frac{k^\alpha}{\beta_i} \frac{\partial \beta_i}{\partial k^\alpha} \Delta \log k^\alpha + \frac{k^\gamma}{\beta_i} \frac{\partial \beta_i}{\partial k^\gamma} \Delta \log k^\gamma$ -ből ( $i=1, 2$ ) meghatározhatók a mikroállandók bizonytalansága is, ebből  $\Delta \log k^\gamma = 0,05$ ;  $\Delta \log k^\alpha = 0,20$  vagyis a mikroállandók bizonytalansága megegyezik a hozzájuk legközelebb eső makroállandó bizonytalanságával.



1. ábra  
A GLA, PNGLA és GLU mikrorészecskék eloszlási függvényei

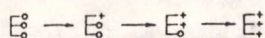
( $\log K_4 = 2,0$ )<sup>18</sup> korábban meghatározott makroállandók közé esik.

A mikroállandók ismeretében kiszámítottuk a GLA, PNGLA és GLU  $\alpha$ -pH eloszlásfüggvényeit, amelyeket az 1. ábrán mutatunk be. Kiszámítottuk a különböző egyszer, ill. kétszer protonált részecskék arányát az összes egyszer, ill. kétszer protonált részecskékhez képest. Ennek alapján az egyszer protonált GLA részecskék 98%-ban a  $\gamma$ -, 2%-ban az  $\alpha$ -karboxilcsoporton, míg a kétszer protonált részecskék 24%-ban a két  $\gamma$ -, 76%-ban az  $\alpha$ - és  $\gamma$ -karboxilcsoportokon protonáltak. (Ugyanezek az adatok a PNGLA-ra: 96%  $\gamma$ -, 4%  $\alpha$ - az egyszeresen, 84%  $\alpha, \gamma$  és 16%  $\gamma, \gamma$  a kétszeresen protonált részecskék megoszlása.) Ennek alapján a

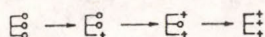


protonálódási útvonal valószínűsége 0,74 a GLA, 0,80 a PNGLA esetében, ez az útvonal tekinthető

a protonálódási folyamat „főútvonalának”. A



útvonal valószínűsége 0,24, a GLA 0,16 a PNGLA esetében, ez a protonálódási folyamat „mellékútvonala”. A



útvonal valószínűsége a legkisebb 0,02 a GLA, és 0,04 a PNGLA esetében.

$$Z_H = \frac{\beta_1[\text{H}^+] + 2\beta_2[\text{H}^+]^2 + K_{MHA} \cdot k^\gamma \cdot 2[\text{M}^{2+}] \cdot [\text{H}^+]}{1 + \beta_1[\text{H}^+] + \beta_2[\text{H}^+]^2 + K_{MA}[\text{M}^{2+}] + K_{MHA} \cdot k^\gamma \cdot 2[\text{M}^{2+}] \cdot [\text{H}^+]} \quad (23)$$

függvénnyel kíséreltük meg; itt

$$K_{MA} = \frac{[\text{MA}]}{[\text{M}] \cdot [\text{A}]} \quad (24)$$

$$K_{MHA} = \frac{[\text{MHA}]}{[\text{M}] \cdot [\text{HA}]} \quad (25)$$

és  $[\text{M}^{2+}] = C_M$ , mert  $\frac{C_M}{C_A} \sim 120 - 140$ .

A legkisebb négyzetes finomítások során a  $K_{MHA} \cdot k^\gamma$  szorzat nullával vált egyenlővé, míg a  $K_{MA}$ -ra irodalmi adatokkal összhangban levő

$$Z_H = \frac{\sum_{i=1}^3 i \cdot \beta_i \cdot [\text{H}^+]^i + K_{MH\alpha A} \cdot k^\alpha \cdot [\text{M}^{2+}] \cdot [\text{H}^+]}{\sum_{i=0}^3 \beta_i \cdot [\text{H}^+]^i + K_{MA} \cdot [\text{M}^{2+}] + K_{MH\alpha A} \cdot k^\alpha \cdot [\text{M}^{2+}] \cdot [\text{H}^+]} \quad (26)$$

ahol

$$K_{MH\alpha A} = \frac{[\text{MH}\alpha\text{A}]}{[\text{M}^{2+}][\text{H}\alpha\text{A}]} \quad (27)$$

és  $\text{H}\alpha\text{A}$  jelenti az  $\alpha$ -karboxilcsoporton protonált részecskét. Az iteráció során ebben az esetben a  $k^\alpha \cdot K_{MH\alpha A}$  állandó vált nullává, míg a  $K_{MA}$ -ra ismét reális érték adódott. A GLA és a PNGLA esetében tehát olyan fémkomplex, amely  $\gamma$ -helyzetű karboxiljainál fogva fémhez kötött,  $\alpha$ -karboxilcsoportján pedig protonált, nem képződik mérhető mennyiségben. A kísérletileg kapott  $Z_H$  függvény e részecske föltételezése nélkül is jól leírható. Ez az eredmény nem meglepő, hiszen a  $\text{H}\alpha\text{A}$  részecske képződési valószínűsége mindkét vegyület esetében kicsi, az egyszer protonált részecskére vonatkozó relatív móltörtjük nem haladja meg a 0,02 ill. 0,04 értéket.

A GLA-n és a GLU-n az  $\alpha$ -aminocsoport deprotonálódásával egy új, potenciális koordinációs hely alakul ki. Az erre a helyre történő fém-bekötést a GLU esetében a

$$Z_H = \frac{K_1 \cdot [\text{H}^+]}{1 + K_1 \cdot [\text{H}^+] + K_{MA} \cdot [\text{M}^{2+}]} \quad (28)$$

$\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  komplexképzési folyamatok

A geminálisan két protonálódó csoportot tartalmazó vegyületek fémkomplexeinek stabilitási állandóit a 4. táblázatban mutatjuk be. A kapott állandókat a következőképpen nyertük. A MA és a PGLA komplexképző fémionok jelenlétében kapott pH-metriás titrálási görbéinek leírását a

adatokat kaptunk. Ennek nyilvánvaló kémiai tartalma, hogy az adott körülmények között egyszer protonált komplexek nem képződnek mérhető mennyiségben e rendszerben. Mivel GLA és a PNGLA  $\gamma$ -helyzetű donorcsoportjainak esetében analóg komplexképzési viselkedés várható, e vegyületek esetében a karboxiljain teljesen deprotonált ligandum mellett azt a részecskét vettük figyelembe, amely csak az  $\alpha$ -COOH csoporton protonált. Az ennek megfelelő modellfüggvény:

4. táblázat  
A vizsgált vegyületek kalcium- és magnéziumkomplexeinek stabilitási állandói

	Ligandum proto- náltóság	$\text{Ca}^{2+}$ -komplex $\log K_1$		$\text{Mg}^{2+}$ -komplex $\log K_1$	
		$\gamma$ -helyz.	$\alpha$ -helyz.	$\gamma$ -helyz.	$\alpha$ -helyz.
MA	$\text{A}^{2-}$	1,15	–	1,73	–
PGLA	$\text{A}^{2-}$	0,84	–	1,03	–
GLU	$\text{A}^{2-}$	–	0,60	–	1,33
PNGLA	$\text{H}\alpha\text{A}^-$	0,84*	–	1,03*	–
	$\text{A}^{3-}$	1,06	–	1,15	–
GLA	$\text{H}\alpha\text{A}^-$	0,40*	–	0,70*	–
	$\text{A}^{2-}$	0,60	–	0,92	–
	$\text{A}^{3-}$	–	0,64	–	1,42

$\text{H}\alpha\text{A}^-$  ill.  $\text{H}\alpha\text{A}^{2-}$  jelenti az  $\alpha$ -karboxil csoportján protonált GLA ill. PNGLA részecskéket. A \*-gal jelölt adatok becslést jelentenek, a megfelelő magyarázatot ld. a szövegben.

függvény jól modellezi. (Itt  $K_1$  az  $\alpha$ -aminocsoport protonálódási állandója). Ami igazán meglepő az az, hogy a GLA, fémionok jelenlétében kapott,  $Z_H$  függvényét is jól le tudtuk írni ezzel az egyszerű modellel. Még szembetűnőbb, hogy

adott fém esetében közel ugyanazt a  $K_{MA}$  állandót kaptuk a GLA-ra és a GLU-ra. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a GLA  $\alpha$ -helyzetű fém-megkötését nem befolyásolja lényegesen az, hogy a  $\gamma$ -helyzetű karboxilcsoportok fémhez kötöttek vagy nem.

A főtiek alapján megadható a fémiont  $\alpha$ - és  $\gamma$ -helyzetben is koordinált  $M_2GLA$  kétmagvú komplexek stabilitási állandója, amely az  $\alpha$ - és  $\gamma$ -helyzetű fémekötésre vonatkozó stabilitási állandók szorzata, ha a főtiek figyelembevétele mellett még azt is föltesszük, hogy az  $\alpha$ -aminocsoport deprotonálódása nem változtatja meg az aminocsoport elektronelszívó effektusát oly mértékben, hogy az lényegesen megváltoztatná a  $\gamma$ -karboxilátcsoportok bázicitását, s így a létrejövő fémekötés egyensúlyi állandóját. Ennek alapján:

$$\log \frac{[(Ca_2GLA)^+]}{[Ca^{2+}]^2 \cdot [GLA^{3-}]} = 1,24$$

$$\log \frac{[(Mg_2GLA)^+]}{[Mg^{2+}]^2 \cdot [GLA^{3-}]} = 2,34$$

### Az eredmények tárgyalása

Bázikus donoratomok közötti hidrogénhidak képződése a megfelelő donorcsoportok egyikének protonálódási állandóját növeli, míg a másikat ugyanannyival csökkenti<sup>35</sup>. Mivel a GLA és modellvegyületei esetében ilyen szokatlanul magas és alacsony protonálódási állandók együtt nem léptek fel, a vicinálisan elhelyezkedő két  $\gamma$  karboxilátcsoport között, reakciókörülményeink mellett (híg vizes oldat), H-híd képződését nem vetjük figyelembe.

A protonálódási mikroállandók összevetése számos érdekes következtetésre vezet:

A MA, GA és PNGLA  $\log k^{\gamma}$  mikroállandói közel azonosak, a PGLA-é már valamivel kisebb, a GLA-é, GLU-é és PCGLU-é a legkisebbek, de közel azonosak. Ez azzal magyarázható, hogy az utóbbi három vegyületben  $\alpha$ -helyzetben erős elektronelszívó hatást kifejtő protonált aminocsoport van. Ezzel szemben az acetilezett  $\alpha$ -aminocsoport kevésbé elektronelszívó. Ez az oka az első három vegyület  $\log k^{\gamma}$  értékei egybeesésének. Ugyanez a tendencia figyelhető meg a  $\log k^{\alpha}$  értékek esetében is.

A  $\log k^{\alpha}$  ill. a  $\log k^{\gamma}$  értékek a GA > PNGLA > GLU  $\sim$  GLA sorban csökkennek. A GA  $\log k^{\gamma}$ -ja azért kiugró érték, mert nem hat rá a geminális aminocsoport elektronelszívó hatása.

A főtiekből az is kitűnik, hogy az acetilezett aminocsoport elektronelszívó hatása gyengébb, mint a protonált aminocsoporté. Ez magyarázza egyúttal a GLA és a PNGLA  $\log k^{\alpha\gamma}$ -i ill.  $\log k^{\alpha\gamma}$ -i közötti különbségeket is.

Szembeötlő a GLU  $\log k^{\alpha}$  és a PCGLU  $\log k^{\gamma}$ -ja közötti egyezés. Hasonlóképpen a mérési hibahatáron belül egyezik a PNGLA  $\log k^{\alpha}$  ill.  $\log k^{\alpha\gamma}$ -értéke a PGLA  $\log k^{\gamma}$  ill.  $\log k^{\gamma}$ -értékével. Ez arra utal, hogy a savamidcsoport elektronelszívó hatás szempontjából ekvivalens a protonált karboxicssoporttal. Ezt a korábbi megfigyelést<sup>36</sup> újabban NMR mérésekkel igazolták<sup>37</sup>.

A főtiek figyelembevételével a PCGLU  $\log K_1=7,87$ -es makroállandója tekinthető a GLU ill. GLA  $\log k^{\alpha\text{-amino}}$  mikroállandójának, jöllehet, ez a részecske nem képződik a rendszerben mérhető mennyiségben.

A komplexképző fémionok jelenlétében kapott  $Z_H$  függvények értékelése során egyszer protonált  $MH_{\alpha}A$  komplexeket a GLA és a PNGLA esetében nem tudtunk kimutatni. A protonált karboxil- és savamidcsoportok elektronelszívó hatás szempontjából kimutatott ekvivalenciája alapján azonban e részecskék egyensúlyi adatai is megbecsülhetők voltak. Eszerint a PGLA kalcium- ill. magnéziumkomplexének stabilitási állandója tekinthető az  $\alpha$ -helyzetben protonált PNGLA megfelelő komplexei stabilitási állandóinak. Nem meglepő, hogy az utóbbi állandók kisebbek mint a teljesen deprotonált PNGLA-ra vonatkozó állandók, hiszen az  $\alpha$ -karboxilcsoport protonálódásával a  $\gamma$ -helyzetű karboxilcsoportok bázicitásának, s ezzel a képződő komplex stabilitásának csökkennie kell.

A főtiek alapján várható, hogy a GLA  $\alpha$ -karboxilon protonált megfelelő komplexeinek stabilitása is kb. ugyanannyival kisebb, mint a PNGLA esetében, vagyis 0,1–0,2 log egységgel alacsonyabb, mint a karboxiljain teljesen deprotonált GLA komplexé. Az e föltételezés alapján becsült  $MH_{\alpha}GLA$  komplexek stabilitási állandóit a 4. táblázatban \*-gal jelöltük meg.

Összevetve a szabad GLA és a fehérjelánca beépült GLA modelljeül szolgáló PGLA azon fémkomplexeinek stabilitási állandóit, amelyek a vér pH-ján képződhetnek (pH = 7,3–7,5), megállapítható, hogy a PGLA stabilabb komplexet képez a  $Ca^{2+}$ -mal és a  $Mg^{2+}$ -mal, mint a GLA. Ez a kis stabilitásnövekedés két hatás eredőjeként adódik: az acetilezett aminocsoport kevésbé elektronelszívó mint a protonált aminocsoport, míg a protonált karboxilcsoporttal ekvivalens savamidcsoport erősebben elektronelszívó mint a proto-

nálatlan karboxilcsoport. E két ellentétes hatás eredményeként a PGLA  $\gamma$ -karboxilátjainak bázicitása, és ezzel komplexjeinek stabilitása is kismértékben megnő. A PGLA kalciumkomplexének stabilitási állandója azonban még így is messze elmarad a GLA-tartalmú véralvadási faktorok kalciumkomplexjeinek az irodalomban közölt stabilitási állandóitól. (Pl. protrombin:  $\log K = 3,5^{16}$  Faktor IX:  $\log K = 4,0^{13}$ ). A fehérjeláncba beépült magányos GLA oldallánc tehát ugyanúgy nem képes stabil kalciumkomplex képzésére, mint a szabad aminosav, a nagy stabilitású kötőhelyek kialakulásához tehát más extrastabilizáló hatásoknak is fel kell lépniük: itt első sorban a fehérjemolekula szekunder struktúrájának megváltozására ill. vegyesligandumú komplexek képződésére lehet gondolni.

A szerzők ezúton mondanak köszönetet Juhász A.-nak, amiért a GLA és származékainak szintéziséhez N-benzoiloxikarbonil-DL- $\gamma$ -karboxi-glutaminsav- $\gamma$ ,  $\gamma$ -di-t-butilésztert bocsátott rendelkezésünkre.

### Összefoglalás

Munkánk során a  $\gamma$ -karboxil-glutaminsav (GLA) és néhány rokonvegyületének protonálódási ill. kalcium- és magnézium-komplexképződési mikroegyensúlyait tanulmányoztuk pH-metriás módszerrel. Az eredmények alapján jellemeztük a különféleképpen védett illetve a különböző protonáltsági állapotú donorcsoportok induktív effektusait, és megadtuk az egyes protonálódási izomerek mikroeloszlásfüggvényeit, valamint a különböző protonálódási útvonalak valószínűségeit. Emellett megadjuk a különféleképpen protonált fémkomplexek stabilitási állandóit is. A polipeptidlánc GLA oldalcsoportját funkcionálisan modellező N-acetil- $\gamma$ -karboxi-glutaminsav- $\alpha$ -metilamid kalciumkomplexének stabilitási állandóját a GLA-énál nagyobbak, de természetesen GLA-tartalmú polipeptidekénél sokkal kisebbnek találtuk.

**Formation microequilibria of the proton, calcium and magnesium complexes of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid and related compounds.** K. Burger, P. Sipos, M. Véber, I. Horváth, B. Noszál and M. Lőw

The formation microequilibria of the proton, calcium and magnesium complexes of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid (GLA) and some related compounds were studied via pH-metric titration. The inductive effects of differently pro-

tonated or protected donor groups are discussed. The distribution curves of the differently protonated microspecies and the probabilities of the different protonation pathways are presented. The formation constants of differently protonated metal complexes are given. The calcium ion binding constant for N-acetyl- $\gamma$ -carboxyglutamic acid  $\alpha$ -methyl-amide (which functionally models a single GLA residue in polypeptide chains) was found to be greater than that for GLA, but much smaller than that for the natural GLA-containing polypeptides.

### IRODALOM

- 1 E.V. Davie, D.J. Hanahan: *The Plasma Proteins* (Putnam, F.W., ed.), 3. 421. 1977.
- 2 C.M. Jackson, Y. Nemerson: *Ann. Rev. Biochem.*, 49. 765. 1980.
- 3 Y. Nemerson, B. Furie: *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 9. 45. 1980.
- 4 J.W. Suttie: *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 8. 191. 1980.
- 5 J.W. Suttie, C.M. Jackson: *Physiol. Rev.*, 57. 1. 1977.
- 6 J. Stenflo, J.W. Suttie: *Ann. Rev. Biochem.*, 46. 157. 1977.
- 7 J.P. Burnier, M. Borowski, B.C. Furie, B. Furie: *Mol. Cell. Biochem.*, 39. 191. 1981.
- 8 J. Stenflo, P. Fernlund, W. Egan, P. Roepstorff: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 71. 2730. 1974.
- 9 M. Borowski, B.C. Furie, G.H. Goldsmith, B. Furie: *J. Biol. Chem.*, 260. 9258. 1985.
- 10 G.B. Sherill, D.L. Straight, R.G. Hiskey, H.R. Roberts, M.J. Griffith: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 124. 256. 1984.
- 11 D.L. Straight, G.B. Sherill, C.M. Noyes, H.G. Trapp, S.F. Wright, H.R. Roberts, R.G. Hiskey, M.J. Griffith: *J. Biol. Chem.*, 260. 2890. 1985.
- 12a H.C. Marsh, M.M. Sarasua, D.A. Madar, R.G. Hiskey, K.A. Koehler: *J. Biol. Chem.*, 256. 7863. 1981.
- 12b H.M. Sarasua, M.E. Scott, J.A. Helporn, P.B.W. Ten Kortenaar, N.T. Boggs, III., L.G. Pedersen, K.A. Koehler, R.G. Hiskey: *J. Am. Chem. Soc.*, 102. 3404. 1980.
- 13 G.W. Amphlett, R. Byrne, F.J. Castellino: *J. Biol. Chem.*, 253. 6774. 1978.
- 14 T.K. Lim, V.A. Bloomfield, G.L. Nelsestuen: *Biochemistry*, 16. 4177. 1977.
- 15 G.L. Nelsestuen: *J. Biol. Chem.*, 251. 5648. 1976.
- 16 S.P. Bajaj, R.J. Butkowski, K.G. Mann: *J. Biol. Chem.*, 250. 2150. 1975.
- 17 W. Märki, M. Oppliger, R. Schwyzer: *Helv. Chim. Acta*, 60. 807. 1977.
- 18 R. Sperling, B.C. Furie, M. Blumenstein, B. Keyt, B. Furie: *J. Biol. Chem.*, 253. 3898. 1978.
- 19 P. Robertson, K.A. Koehler, R.G. Hiskey: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 86. 265. 1979.
- 20 P. Robertson, R.G. Hiskey, K.A. Koehler: *J. Biol. Chem.*, 253. 5880. 1978.
- 21 B.C. Furie, M. Blumenstein, B. Furie: *J. Biol. Chem.*, 254. 12521. 1979.
- 22 A. Zell, H. Einspahr, C.E. Bugg: *Biochemistry*, 24. 533. 1985.
- 23 G.A. Long, R.G. Hiskey, L.G. Pedersen, K.A. Koehler: *J. Mol. Struct., TEOCHEM.* 108. 173. 1984.

- <sup>24</sup> A. Juhász, S. Bajusz: *Int. J. Peptide Protein Res.*, 15. 154. 1980.
- <sup>25</sup> W. Märki, R. Schwyzer: *Helv. Chim. Acta*, 58. 1471. 1975.
- <sup>26</sup> W. Märki, M. Oppliger, R. Schwyzer: *Helv. Chim. Acta*, 59. 901. 1976.
- <sup>27</sup> M. Löw, A. Rüll, L. Kisfaludy: *Peptides 1984. Proc. 18th Eur. Pept. Symp.* (Ed. Ragnarsson, U.) 267-2710 Almquist and Wiksell, Stockholm
- <sup>28</sup> K. Trogmayer-Málik, I. Horváth, K. Burger, G. Gőndős, I. Gera, M. Bartók: *Inorg. Chim. Acta*, 138. 155. 1987.
- <sup>29</sup> K. Burger, M. Véber, P. Sipos, Z. Galbács, I. Horváth, G. Szepesi, G. Takácsi Nagy, J. Siemroth: *Inorg. Chim. Acta*, 124. 175. 1986.
- <sup>30</sup> R.B. Martin: *J. Phys. Chem.*, 75. 2657. 1971.
- <sup>31</sup> D.L. Rabenstein, T.L. Sayer: *Anal. Chem.*, 48. 1141. 1976.
- <sup>32</sup> C.A. Evans, R. Guevremont, D.L. Rabenstein: "Complexes of Aspartic Acid and Glutamic Acid", *Metal Ions in Biological Systems* (Sigel, H., ed.) Vol. 9. p. 48. M. Dekker, New York, Basel, 1979.
- <sup>33</sup> R.B. Martin: "Antibiotics and their Complexes", *Metal Ions in Biological Systems* (Sigel, H., ed.) Vol. 19. 1985. p. 19., Marcel Dekker, New York, Basel
- <sup>34</sup> *Critical Stability Constants*; A.E. Martell, R.M. Smith, Ed., Plenum: New York, 1977.
- <sup>35</sup> B. Noszál: *J. Phys. Chem.*, 90. 4104. 1986.
- <sup>36</sup> L. Ebert: *Z. Phys. Chem.*, 121. 385. 1926.
- <sup>37</sup> B. Noszál, P. Sándor: előkészületben

Szeged, JATE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék  
Érkezett: 1988. XII. 2.

Közlésre elfogadtuk: 1988. XII. 9.