

Magyar Kémiai Folyóirat

Megindította Than Károly 1895-ben

83. évfolyam, 1977. június

Polipeptidek koordinációs kémiai vizsgálata, III.*

Szintetikus α_H -Corticotropin-fragmensek protonálódási — deprotonálódási egyensúlyi vizsgálata.
Adatok a Corticotropin pH-függő konformációjához

BURGER KÁLMÁN, NOSZÁL BÉLA, GAIZER FERENC, PÉKLI MÁRTA és TAKÁCSI NAGY GÉZA

Bevezetés

A természetes humán adrenocorticotrop hormon az α_H -Corticotropin (a továbbiakban ACTH) 39 aminosavból álló polipeptid lánc. Aminosav szekvenciája ismert^{1, 2}, konformációját, szekunder és terciér szerkezetét illetően azonban ellentmondó nézetekkel találkozunk.

A hormon az emberi szervezet számára életfontosságú^{3, 4}. Biológiai hatásának értelmezéséhez a molekula konformációjának ismerete volna szükséges. Ezért többen is foglalkoztak először a természetes hormon, majd az ACTH első szintetikus előállítására óta⁵ a különböző ACTH fragmensek konformációjának vizsgálatával.

Vizes oldatokban végzett egyes ORD⁶ és CD⁷ vizsgálatok, valamint hidrogén-deutérium csere kísérletek^{8, 9} eredményeiből arra következtettek, hogy a polipeptid molekula vizes oldatban teljesen rendezetlen formában helyezkedik el.

Újabb cirkuláris dikroizmus vizsgálatok^{10, 11} korábbi megfontolásokkal¹¹ összhangban már vizes oldatban a molekula rendeződésére utaltak és trifluor—etanolos oldatban kimutatták az α -helix szerkezet fellépését. Az ACTH cirkuláris dikroizmus görbék pH-függése vizes oldatban¹² azt mu-

tatta, hogy a pH emelése hatására következik be valószínűleg a polipeptid oldalláncai által stabilizált rendeződés.

Az irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy a *Fernandjian* és munkatársai^{10, 12} által feltételezett rendezett konformáció intramolekuláris hidrogénhidak képződésére vezethető vissza. Mivel a hidrogénhid-képződés a hidban résztvevő és a híd kialakulásával egyéb módon befolyásolt protonok disszociációállandóit megváltoztatja, úgy véltük, hogy az ACTH különböző nagyságú fragmensei protonálódási, ill. savi disszociációs egyensúlyi állandóinak meghatározása a molekula konformációjára is tájékoztatást nyújthat. A protonálódási állandók ismerete a polifunkciós ligandumnak tekinthető ACTH-molekula fémkomplex-képződési reakcióinak vizsgálatához is alapvető segítséget ad.

Vizsgálatainkhoz modellrendszernek a Corticotropin első N-terminális 32, 28, 14 és 4 aminosavból álló szintetikus polipeptideket (a továbbiakban ACTH₁₋₃₂, ACTH₁₋₂₈, ACTH₁₋₁₄ és ACTH₁₋₄) használtuk.

A molekulák funkciós csoportjai közül a pH = 2–13 tartományban a következők protonálható, illetve deprotonálható: az argininek guanidincsoportja, a tirozinok fenolos hidroxilja, a lizinek primer aminocsoportja, a hisztidin egyik imidazol-nitrogénje, az aszparaginsav és glutaminsav karboxiljai és a terminális amino-, illetve karboxilcsoport.

A polipeptidmolekulák aminosav szekvenciájának ismeretében belátható, hogy az ACTH₁₋₄ molekula három, az ACTH₁₋₁₄ hat, az ACTH₁₋₂₈ tizenegy és az ACTH₁₋₃₂ tizenhárom protonálható, illetve deprotonálható funkciós csoporttal rendelkezik.

A megfelelő egyensúlyi állandók meghatározása a klasszikus egyensúlyi kémia elvei szerint precíziós pH-metriás mérésekből elvégezhető. Nehéz feladat viszont az állandóknak a funkciós csoportokhoz történő hozzárendelése.

Vizsgálataink célja a négy különböző nagyságú polipeptidfragmens protonálódási állandóinak meghatározásán túl az állandóknak a megfelelő funkciós csoportokhoz való hozzárendelése és így a polipeptid konformációját meghatározó hidrogénhidak helyének valószínűsítése volt. A

* II. közlemény: Magy. Kém. Folyóirat, 83, 253. 1977.

¹ T. H. Lee, A. B. Lerner, V. Buetner-Janusch: J. Biol. Chem., 236, 2970. 1961.

² B. Riniker, P. Sieber, W. Rittel: Nature New Biol., 235. 1972.

³ J. Ramachandran: „Hormon Proteins and Peptides”, 2. kötet (Szerk.: C. H. Li). Academic Press, New York, 1973.

⁴ H. Yajima, H. Kawatani: „Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins”, 2. kötet (Szerk.: B. Weinstein). M. Dekker, New York, 1974.

⁵ Bajusz, S., Medzihradszky, K., Paulay, Z. és Láng, Zs.: Acta Chim. Hung., 52. 335. 1967.

⁶ L. C. Craig, J. D. Fisher, J. P. King: Biochemistry, 4. 311. 1965.

⁷ R. Schwyzer, P. Sieber: Helv. Chim. Acta, 49. 134. 1966.

⁸ H. Edelhoch, R. E. Lippoldt: J. Biol. Chem., 244. 3876. 1969.

⁹ K. Hofmann, H. Yajima: Recent Progress Horm. Res., 18. 41. 1962.

¹⁰ Löw, M., Kisfaludy, L., Fernandjian, S.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 10. 229. 1975.

¹¹ P. G. Squire, T. Bewley: Biochem. Biophys. Acta, 109. 234. 1965.

¹² D. Greff, F. Toma, S. Fernandjian, M. Löw, L. Kisfaludy: Biochim. Biophys. Acta, 439. 219. 1976.

hozzárendelésben a különböző fragmensek megfelelő adatainak összevetése, valamint a megfelelő szabad trifunkciós aminosavak azon funkciós csoportjai állandóival való összehasonlítása nyújtott segítséget, amelyek a peptidláncban szabadon helyezkednek el.

Kísérleti rész

A pH-metriás egyensúlyi vizsgálatokat kálium-nitráttal $0,3 \text{ mól dm}^{-3}$ állandó ionerősségre beállított $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ hőmérsékletre termosztált oldatokban végeztük. Mérőműszerünk Radiometer pH M4 precíziós pH-mérő volt. A titráló $0,01$ majd $0,1 \text{ mól dm}^{-3}$ karbonátmentes NaOH adagolására Radiometer ABU 12 automata bürettát használtunk. A mérőelektród Radiometer G 202 B üvegelektrod, a viszonyított elektród Wilhelm hídban¹⁵ $0,01 \text{ mól dm}^{-3}$ ezüst-nitráttal egyensúlyban levő Radiometer P 501 ezüstelektród volt.

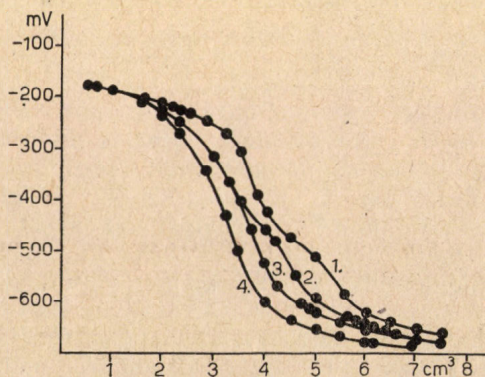
Az egyensúlyméréseket az ACTH_{1-32} és ACTH_{1-28} peptidek $6 \cdot 10^{-5}$ – $5 \cdot 10^{-4} \text{ mól dm}^{-3}$ közötti koncentrációjú oldataival, az ACTH_{1-14} $2 \cdot 10^{-4}$ – $2 \cdot 10^{-3} \text{ mól dm}^{-3}$ és az ACTH_{1-4} $3 \cdot 10^{-4}$ – $5 \cdot 10^{-3} \text{ mól dm}^{-3}$ közötti koncentrációjú oldataival végeztük.

Az állandó ionerősségre beállított vizsgálandó oldat peptidtartalmát ismert sav mennyiséggel protonáltuk, majd $0,01$, illetve $0,1 \text{ mól dm}^{-3}$ NaOH mérőoldattal történő titrálás közben mértük az oldatban a pH változása által okozott elektromotoros erő változást.

Az oldatok össz-peptidtartalmának, a bemért sav és fogyott lúg mérőoldat mennyiségének ismeretében a kísérleti mV értékekből (1. ábra) számítottuk ki a peptidek Bjerrum-féle protonálódási görbéit (2. ábra)

A 2. ábrán összefoglalt görbékkel látható, hogy a protonált ACTH_{1-4} molekula három, az ACTH_{1-14} hat, az ACTH_{1-28} kilenc és az ACTH_{1-32} tizenkét protont ad le a vizsgált pH-tartományban ($\text{pH} = 2$ – 12).

A polipeptidok összetétele alapján várható volt és ezt az 1. és 2. ábrák viszonylag kis tagoltsága is alátámasztotta, hogy az egyes molekulákon bázikusság szempontjából egyenértékű funkciós csoportok vannak. Így feltételezhető volt hogy a deprotonálódási folyamatok kevesebb egyensúlyra, leírhatók, mint a folyamatokban résztvevő protonok száma.



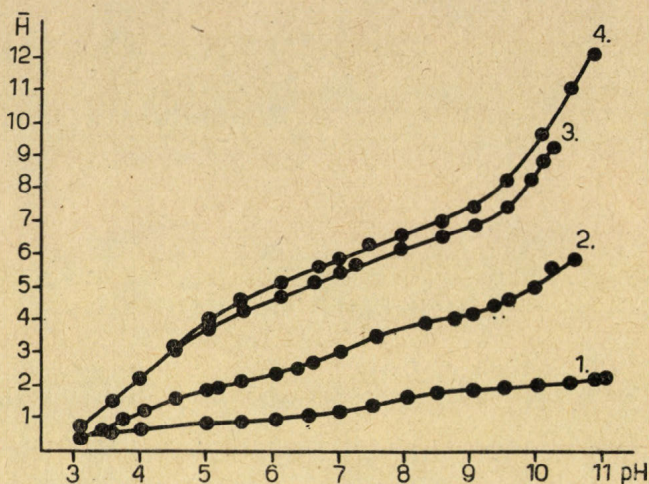
1. ábra

Az ACTH_{1-4} (1.), ACTH_{1-14} (2.), ACTH_{1-28} (3.) és ACTH_{1-32} (4.) polipeptid fragmensek titrálási görbéi. Koncentrációk: ACTH_{1-4} : $5 \cdot 10^{-3}$; ACTH_{1-14} : $2 \cdot 10^{-3}$; ACTH_{1-28} : $5 \cdot 10^{-4}$; ACTH_{1-32} : $5 \cdot 10^{-4} \text{ mól dm}^{-3}$. Ion-erősség: $0,3 \text{ mól dm}^{-3}$

¹³ W. Forsling, S. Hietanen, L. G. Sillén: Acta Chem. Scand., 6. 905. 1952.

¹⁴ Gaizer F.: A kémia újabb eredményei. Megjelenés alatt.

¹⁵ L. G. Sillén, A. E. Martell: Stability Constants of Metal Ion Complexes. Chemical Society, London, 1964.



2. ábra

Az egy peptid molekuláról ledisszociált protonok száma az oldat pH-ja függésében ábrázolva
(1.) ACTH_{1-4} ; (2.) ACTH_{1-14} ; (3.) ACTH_{1-28} ; (4.) ACTH_{1-32}

A rendszert leíró egyensúlyi reakciókat, illetve az azokban keletkező protonált részecskék összetételét és a protonálódási állandókat a kísérleti adatokból számítógépi értékeléssel¹⁴ nyertük. Ennek lényege, hogy a kísérleti mV–lg CH görbéket különböző összetételű protonkomplexek lépcsőzetes képződését feltételező modellek alapján szimuláltuk. A modellek összeállításánál a protonkomplexek minden ésszerű kombinációját figyelembe vettük és kiszámítottuk, hogy a különböző modellek milyen pontossággal írják le a kísérleti görbéket. Így megkaptuk azt a néhány kombinációt, amely a rendszert matematikai szempontból helyesen írta le.

A kísérleti értékpárokat a teljes koncentrációtartományban a kísérleti hibával megegyező pontossággal leíró néhány ilyen modell közül az alábbi kémiai megkötések minden rendszerre egyetlen modell kiválasztását tették lehetővé:

1. A pH növelésével egymást követő lépcsőzetes protonálódási állandók értéke mindig legalább a statisztikus esetnek megfelelő mértékben kisebb legyen a megelőző állandók értékénél.

2. Ha két proton egymást követő koordinációjának állandója között kisebb a különbség, mint a statisztikus modell alapján számított, a két protont egy lépésben koordinálódnak kell tekinteni.

3. A kísérleti görbét azonos hibával leíró modellek közül mindig azt fogadtuk el, amely kevesebb komplex képződésének feltételezésén alapul.

Az eredmények és értékelésük

A négy polipeptid molekula a fentiek szerint meghatározott protonálódási állandóit és a megfelelő funkciós csoportok szabad aminosavakban mért protonálódási állandóit¹⁵ az 1. táblázatban foglaltuk össze.

A szabad aminosavak adatai alapján, figyelembe véve azok nagyságát és sorrendjét, az egyes peptidekben mért állandókat eléggé nagy valószínűséggel a megfelelő funkciós csoportokhoz tudtuk rendelni. Bizonytalannak csupán a tirozinok fenolos oxigénjének a lizinek primer aminos csoportjától való megkülönböztetése tekinthető. E két donor közel azonos bázikussága miatt nem zárható ki a két protonálódási folyamat átfedése és az ezáltal okozott hiba.

1. táblázat

A Corticotropin (ACTH) fragmensek és egyes aminosavak protonálódási állandóinak logaritmusai

Funkciós csoport	ACTH ₁₋₄	ACTH ₁₋₁₄	ACTH ₁₋₂₈	ACTH ₁₋₃₂	Aminosav
Tirozin — OH	K ₁ 10,7	K ₁ 9,65		K ₁ K ₂ K ₃ 29,31	10,43
Lizin — NH ₂		K ₂ 9,45	K ₁ K ₂ 19,89 K ₃ K ₄ 17,92	K ₄ 8,87 K ₅ 8,61	10,47
term. — NH ₂	K ₂ 7,17	K ₃ 7,10	K ₅ 6,97	K ₆ K ₇ 12,80	9,12
Hisztidin Imidazol-N		K ₄ 6,35	K ₆ 6,53		6,12
Glutaminsav + Aszparaginsav — COOH		K ₅ 4,24	K ₇ 4,95 K ₈ 4,59	K ₈ 4,64 K ₉ K ₁₀ 8,74	4,18 3,71
term. — COOH	K ₃ 3,20	K ₆ 3,71	K ₉ 3,73	K ₁₁ K ₁₂ 5,38	2,39

A fenolos oxigén és a primer aminosoprot nitrogénje protonálódási folyamatainak egymástól elválasztott független vizsgálatára kétféle lehetőség kínálkozott:

1. A fenolos hidroxilcsoport deprotonálódásának UV spektrofotometriás egyensúlyméréssel történő követése. A protonált primer aminosoprot deprotonálása ui. a fenolát képzését tükröző jellemző spektrumtartományban nem okoz extinkcióváltozást.

2. A primer-aminocsoport formaldehiddel történő blokkolása és a keletkező Schiff-bázis mellett a fenolos hidroxil deprotonálásának pH-metriás követése.

Sajnos, a makromolekulájú polipeptid fenilalanin, triptofán és hisztidin-részét képező több aromás gyűrűje a két tirozin fenolos hidroxil deprotonálódásából származó spektrumváltozás kvantitatív értékelését bizonytalanná teszi. A primer aminosoprotok formaldehiddel történő blokkolása pedig egyrészt sztérikus gátlás kialakításával, másrészt az éppen vizsgálni kívánt lehetséges hidrogénhidak kialakulásának megakadályozásával megváltoztathatja a fenolos hidroxilok deprotonálódási egyensúlyait.

A kétféle vizsgálat kvalitatív értékeléséből annyi mégis kitűnik, hogy a fenolos hidroxil oxigénje az ACTH₁₋₂₈ és ACTH₁₋₃₂ molekulákban bázikusabb, mint a szabad tirozin adata alapján várható volna, míg a lizinek ε-NH₂ csoportjainak nitrogénjei savanyúbbak a szabad lizin protonálódási állandója alapján vártnál. E megfontolások alapján úgy véljük, hogy az állandóknak az 1. táblázatban összefoglalt hozzárendelése a funkciós csoportokhoz alapszabályban helyes.

Az aminosavak funkciós csoportjai protonálódási állandóinak (azaz a donatoratomok bázikuságának) megváltozása a polipeptid képződésének hatására többféle okra vezethető vissza. Két aminosav közötti peptidkötés kialakulása pl. egyrészt a karboxilcsoportot elválasztja a peptidkötésnél erősebben elektronszívó protonált aminosoprottól, ami a karboxil oxigénjén az elektronsűrűség növekedését és ezzel a protonálódási állandó növekedését okozza. Másrészt a karboxilát csoportnál erősebben elektronszívó peptidcsoport

a primer aminosoprot nitrogénjén csökkenti az elektronsűrűséget, ami a protonálódási állandó csökkenésében jelentkezik. Jól látható e kettős hatás, ha az ACTH₁₋₄ egyensúlyi állandóit összevetjük a szabad aminosavak megfelelő adataival.

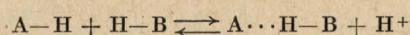
Nem értelmezhetők egyszerűen a peptidkötés kialakulásával járó elektroneltolódásokkal azok a változások, amelyek a makromolekulájú polipeptid oldalláncainak funkciós csoportjain jelentkeznek.

Az 1. táblázat adataiból látható, hogy a peptid nagyságának növekedésével egyes ε-aminocsoportjaik bázikusága csökken (lásd az ACTH₁₋₁₄ K₂, ACTH₁₋₂₈ K₃K₄ és ACTH₁₋₃₂ K₄ és K₅ értékeit). Ugyancsak a fenti sorrendben csökken a terminális aminosoprotok bázikusága. A hisztidin imidazol nitrogénjének bázikusága viszont a peptidlánc hosszának növekedésével nő (lásd az ACTH₁₋₁₄ K₄, ACTH₁₋₂₈ K₆ és ACTH₁₋₃₂ K₆K₇ értékeit). A terminális aminosoprot és a hisztidin-nitrogén bázikuság változása ellenkező irányú menetének eredményeként a két protonálódási folyamat az ACTH₁₋₃₂ molekulában, a legnagyobb peptidben, összeolvad.

Megjegyzendő, hogy miután az állandók hibája ±0,1 lg egység, a terminális aminosoprot és a hisztidin-nitrogén vázolt bázikuság-változása csak a legnagyobb peptidben, az ACTH₁₋₃₂ ben, tekinthető bizonyítottnak. Az ε-aminocsoportok bázikuság-változása már a kisebb peptidekben is szignifikáns.

A polipeptidek oldalláncain elhelyezkedő funkciós csoportok protonálódási állandóinak fenti változásai intramolekuláris hidrogénhidak képződésével magyarázhatók.

Ha két protonált donoratom (pl. A és B) a makromolekulán úgy helyezkedik el, hogy a kevésbé bázikus (A) protonjának ledisszociálása után a két donoratom az eredetileg bázikusabb (B) donoratom protonján keresztül kapcsolódik, e hidrogénhid kialakulása mindkét proton disszociációs állandóját megváltoztatja.



folyamat során az A—H csoport disszociációja kedvezményezett, tehát (A) protonálódási állan-

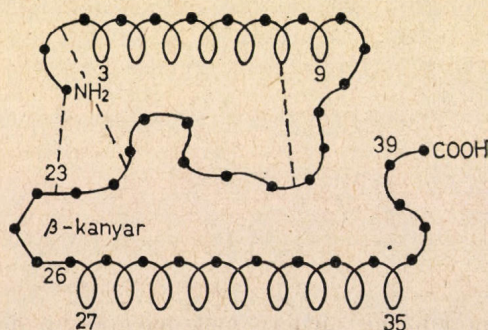
dója kisebb, mint magában (B—H jelenléte nélkül) volna; a B—H disszociációja viszont akadályozott, tehát (B) protonálódási állandója nagyobb, mint magában (A—H jelenléte nélkül) volna.

A fenti megfontolások alapján megállapítható, hogy az ACTH₁₋₂₈ két ε-aminocsoportjának és az ACTH₁₋₃₂ terminális aminocsoportjának és két ε-aminocsoportjának deprotonálódását a nagyobb bázicitású protonált donoratomokkal való hidrogénhidak képződése segíti. Ez az oka a kisebb protonálódási állandóknak. E hidrogénhidak másik pillératomjaként csak a tirozinok fenolos oxigénje, vagy az argininok guanidino-nitrogénje szerepelhet.

Az ACTH₁₋₃₂ hisztidin imidazol-nitrogénje deprotonálódását viszont egy kisebb bázicitású donoratommal — ami csak karboxilát-oxigén lehet — való hidrogénhid kialakulása gátolja, ami a protonálódási állandó növekedésében jelentkezik.

A hidrogénhidak természetesen csak a kevésbé bázikus donoratom protonjának disszociációját biztosító pH-nál képződnek és a bázikusabb donor protonjának disszociációját biztosító kémhatásnál felhasadnak. Az 1. táblázat adataiból így kitűnik, hogy a primer aminocsoportokat tartalmazó hidrogénhidak pH > 9 kémhatású oldatban alakulnak ki, míg a hisztidin nitrogénjéhez kapcsolódó H-híd pH 6 és 3 közötti kémhatásnál. Ennek megfelelően kell változnia e hidrogénhidak által stabilizált konformációnak.

A fenti megállapításokat összevetve Lőw és munkatársai¹⁰ az ACTH konformációjára felrajzolt sémájával (3. ábra) a hidrogénhidak helye is feltételezhető.



3. ábra

Az ACTH₁₋₃₉ feltételezett szekunder szerkezetét Lőw szerint¹⁰ bemutató diagram

Lúgos oldatban (pH > 7) a molekula terminális aminocsoportja a 23-as helyzetű tirozin fenolos hidroxiljával képezhet hidrogénhidat. A pH > 9 kémhatású oldatban a 2-es helyzetű tirozin fenolos hidroxilja a 21-es helyzetű lizin primer aminocsoportjához kapcsolódhat és a 8-as helyzetű arginin guanidincsoportjának protonált nitrogénje a 15-ös helyzetű lizin primer aminocsoportjához. Ez a három hidrogénhid már vizes oldatban olyan konformációban tarthatja a peptid molekulát, amely kisebb víztartalmú rendszerben — trifluoretanol-tartalmú oldatban — a hélix képződésnek kedvez.

A pH 3—6 közötti kémhatású rendszerben e három hidrogénhid képződésére nincs lehetőség. Itt a hisztidin protonált imidazol-nitrogénje kapcsolódik a molekula valamelyik karboxilát oxigénjéhez. Miután az ezt indikáló változások egyértelműen csak az ACTH₁₋₃₂ molekulában jelentkeznek, a hidrogénhid oxigén pillératomját feltehetőleg a 29-es helyzetű aszparaginsav karboxilátja adja. Ez magyarázhatja, hogy az ACTH₁₋₃₂ molekulában két egyenértékű, a többinél erősebben savas karboxilcsoport van. Az egyik a terminális karboxil, a másik a hisztidin nitrogénnel H-hídban levő aszparaginsavé.

A fentiek alapján valószínűnek látszik, hogy míg lúgos kémhatású vizes oldatban az ACTH molekula a 3. ábrán láthatóhoz hasonló konformációban van, addig savanyú oldatban (pH = 3—6) egyetlen ívet leíró alakban helyezkedik el.

A Lőw-féle konformáció¹⁰ és e deprotonálódási vizsgálatok összhangjának bemutatására az általunk feltételezett H-hidakat a 3. ábrán látható sémába bejelöltük.

A szerzők köszönettel tartoznak Medzihradzsky Kálmánnak (ELTE Szerves Kémiai Tanszék) és Lőw Miklósnak (Kőbányai Gyógyszerárúgyar) a polipeptidek előállításáért.

Összefoglalás

A szerzők potenciometriás egyensúlyméréssel és a mérési adatok számítógépes értékelésével meghatározták a Corticotropin négy fragmense — az ACTH₁₋₃₂, ACTH₁₋₂₈, ACTH₁₋₁₄ és ACTH₁₋₄ — protonálódási egyensúlyi állandóit és hozzárendelték azokat a megfelelő funkciós csoportokhoz.

A protonálódási állandók értékéből és azoknak a peptidlánc hosszától való függése alapján a szerzők megállapították, hogy mely funkciós csoportok vesznek részt intramolekuláris hidrogénhidak képződésében a különböző kémhatású vizes oldatokban. Ezek az eredmények a molekula pH-függő konformációjára utaltak.

Coordination chemical studies on polypeptides III. Protonation-deprotonation equilibrium studies on synthetic α_H-Corticotropine fragments. Data on the pH-dependent conformation of Corticotropine. K. Burger, B. Noszál, F. Gaizer, M. Pékli and G. Takácsi Nagy

The protonation constants of the ACTH₁₋₃₂, ACTH₁₋₂₈, ACTH₁₋₁₄ and ACTH₁₋₄ fragments have been determined on the basis of pH-metric equilibrium measurements evaluated by the computer analysis of the data. The constants were assigned to the functional groups of the molecules.

The functional groups taking part in intramolecular H-bridge formation were determined on the basis of the protonation constants and from their dependence on the length of the peptide chain. The results indicated the pH-dependent conformation of the molecule in aqueous solution.

Budapest, Eötvös Loránd Tudományegyetem Szervet-
len és Analitikai Kémiai Tanszéke és

Hódmezővásárhely, Élelmiszeripari Főiskola Kémiai
Tanszéke.

Érkezett: 1976. IX. 10.