# LABORATORIUM 4

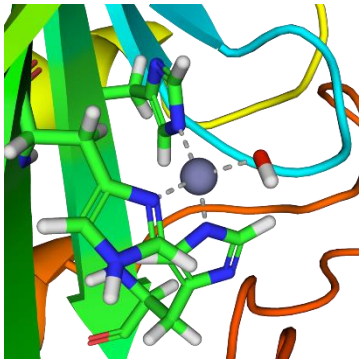
## SYNTEZA I CHARAKTERYSTYKA SPEKTRALNA AMINOKWASOWYCH KOMPLEKSÓW Z JONAMI $Zn^{2+}$ I $Co^{2+}$W ASPEKCIE METALOENZYMÓW ORAZ BIAŁKOWYCH DOMEN STRUKTURALNYCH

## WPROWADZENIE LITERATUROWE

Cynk odgrywa ważną rolę, jako kwas Lewisa, w wielu metaloenzymach. Jony $Zn^{2+}$ posiadają konfigurację d10 i dlatego nie ulegają wpływom pola ligandów, które mogłoby w innym przypadku determinować określoną liczbę koordynacyjną (LK) i geometrię kompleksu. Procesy wymiany ligandów przy jonach cynku są szybkie, co umożliwia szybkie wprowadzanie substratów i usuwanie produktów. Cynk (II) jest aktywny w wielu układach modelowych [1].

Jony cynku w układach biologicznych pełnią funkcje zarówno strukturalne (stabilizacja struktury białek) jak i katalityczne. Cynkoenzymy katalizują dwie grupy reakcji [2]:

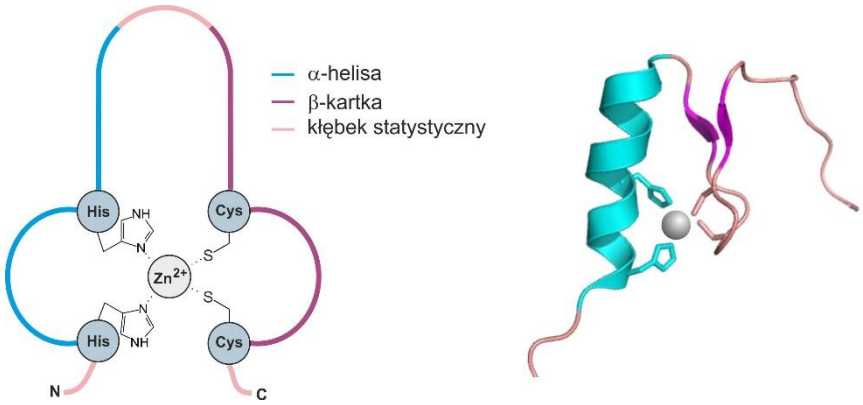
- reakcje hydrolizy (proteazy- rozpad wiązania peptydowego, fosfatazy - hydroliza mono-i diestrówfosforanowych),
- reakcje przeniesienia atomów i grup (np. anhydraza węglanowa, dehydrogenaza alkoholowa).



Przykładem cynkoenzymu w którym rolę układu donorowego pełni histydyna, jest w anhydraza węglanowa. Katalizuje ona odwracalną reakcję powstawania jonu wodorowęglanowego ($HCO_3^-$) z wody i dwutlenku węgla. W centrum aktywnym tego metaloenzymu kofaktor (jon $Zn^{2+}$) koordynowany jest przez trzy imidazolowe atomy azotu reszt histydynowych apoenzymu (białka) oraz cząsteczkę wody. Mechanizm procesu katalitycznego polega na jonizacji cząsteczki wody z utworzeniem układu Zn-$OH^-$, który nukleofilowo oddziałuje z atomem węgla $CO_2$, tworząc jon $HCO_3^-$.

**Rys. 1.** Centrum aktywne ludzkiej anhydrazy węglanowej. W środku jon $Zn^{2+}$ koorydowany przez histydyny i grupę $OH^-$.

Natomiast najbardziej znanym przykładem strukturalnej roli jonów cynku, koordynowanego przez aminokwasy cysteinę i histydynę są domeny palców cynkowych w białkach wiążących kwasy nukleinowe [2]. Najlepiej poznana jest grupa białek posiadająca model palców cynkowych C2H2, w której ligandami dla jonu cynku są dwie cysteiny i dwie histydyny. W skład motywu strukturalnego wchodzi α-helisa i dwie krótkie anty-równoległe β-kartki. Znajomość mechanizmu wiązania się palców cynkowych do DNA10 pozwala na projektowanie białek wiążących się do ściśle określonej sekwencji DNA.




**Rys. 2.** Schematyczna struktura palców cynkowych - domena C2H2.

W badaniach układów biologicznych zawierających cynk wykorzystuje się możliwość izomorficznego podstawienia jonów cynku jonami kobaltu. Nie obserwuje się przy tym zaniku aktywności. Wykorzystanie różnic we właściwościach spektroskopowych i magnetycznych tych dwóch jonów stwarza lepsze możliwości poznania budowy i funkcji metaloprotein [3].

## LABORATORIUM 4: CEL BADAWCZY

- Preparatyka koordynacyjnych związków tworzonych przez jony cynku i kobaltu (II).
- Przeprowadzenie analizy spektrofotometrycznej samodzielnie otrzymanych związków kompleksowych.
- Porównanie trwałości badanych kompleksów jonów cynku i kobaltu (II).

## DO SAMODZIELNEGO PRZYGOTOWANIA

**MATERIAŁ DO OPANOWANIA:** Właściwości fizykochemiczne cynku i kobaltu oraz tworzonych przez nie związków koordynacyjnych, biologiczna rola jonów cynku i kobaltu w organizmie, charakterystyka cynkoenzymów, budowa i rola palców cynkowych.

**PLAN PRACY W LABORATORIUM:** w oparciu o szczegółową instrukcję do **LABORATORIUM 4** przygotować w formie notatki (indywidualny dziennik/zeszyt Studenta) spis szkła laboratoryjnego oraz odczynników niezbędnych do przeprowadzenia tego doświadczenia.

**ZAPOZNANIE Z SUBSTANCJAMI:** narysować w dzienniku/zeszycie Studenta wzory strukturalne i/lub przestrzenne wszystkich związków, o których mowa w instrukcji do **LABORATORIUM 4**, za wyjątkiem wzorów substancji prostych (nieorganicznych tj. NaOH itp.).

**UWAGA:** wszystkie notatki z powyższej listy **POWINNY** być przedstawione (poddane sprawdzeniu) Prowadzącemu **PRZED** przystąpieniem do pisania kolokwium z materiału **LABORATORIUM 4**

# INSTRUKCJE DO LABORATORIUM 4

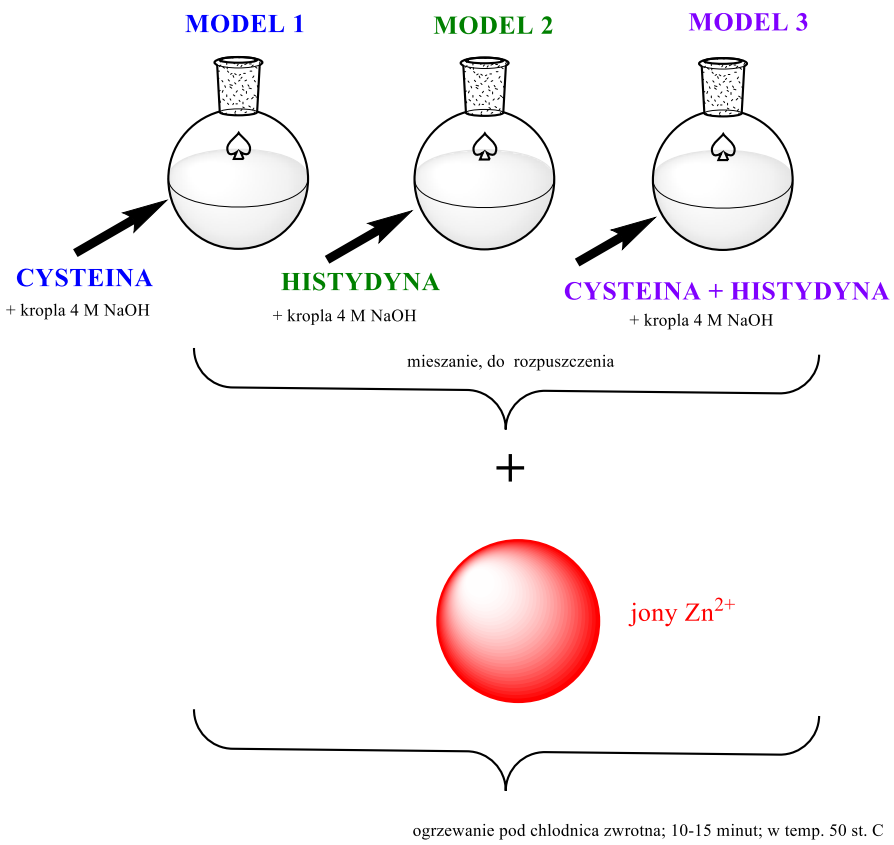
## SYNTEZA I CHARAKTERYSTYKA SPEKTRALNA AMINOKWASOWYCH KOMPLEKSÓW Z JONAMI $Zn^{2+}$ I $Co^{2+}$W ASPEKCIE METALOENZYMÓW ORAZ BIAŁKOWYCH DOMEN STRUKTURALNYCH

### 1. SYNTEZA KOMPLEKSÓW JONÓW CYNKU Z HISTYDYNĄ I CYSTEINĄ JAKO MODELOWYCH UKŁADÓW PALCÓW CYNKOWYCH

W naczynkach wagowych odważyć kolejno naważki:

- do modelu a) 0,2 mmol cysteiny,
- do modelu b) 0,2 mmol histydyny,
- do modelu c) 0,1 mmol cysteiny i 0,1 mmol histydyny

Ostrożnie, unikając strat przenieść aminokwas/y do kolby okrągłodennych o pojemności 50 ml, tak żeby przeanalizować kolejno każdy z modeli przedstawionych na poniższym schemacie. Do każdej z kolb dolać za pomocą cylindra miarowego 5 ml wody dejonizowanej (najlepiej za pomocą tych 5 ml wody przenieść ilościowo naważkę aminokwasu).



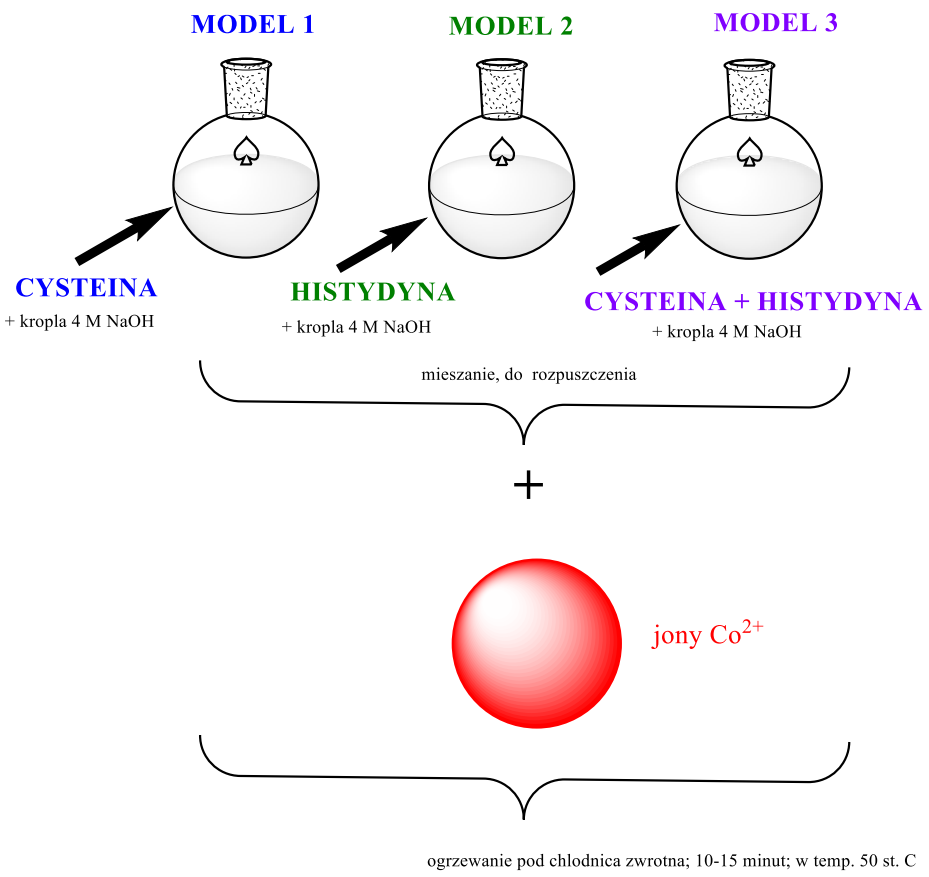

Pipetą plastikową dodać kroplę/dwie 3M roztworu NaOH. Delikatnie wymieszać do całkowitego rozpuszczenia aminokwasów. Do kolby dodać następnie 0,1 mmol chlorku cynku, rozpuszczonego w 5 ml wody destylowanej. W przygotowanym roztworze umieścić mieszadełko teflonowe i ustawić na mieszadle magnetycznym w łaźni wodnej. Mieszaniny reakcyjne ogrzewać przez 10-15 min w temperaturze 50°C, cały czas mieszając. Obserwować i zanotować zmiany zachodzące podczas prowadzenia reakcji.

## 2. SYNTEZA KOMPLEKSÓW CHLORKÓW KOBALTU(II) Z HISTYDYNĄ I CYSTEINĄ JAKO MODELOWEGO UKŁADU KOBALAMINY

W naczynkach wagowych odważyć kolejno naważki:

- do modelu a) 0,2 mmol cysteiny,
- do modelu b) 0,2 mmol histydyny,
- do modelu c) 0,1 mmol cysteiny i 0,1 mmol histydyny

Ostrożnie, unikając strat przenieść aminokwas/y do kolby okrągłodennych o pojemności 50 ml, tak żeby przeanalizować kolejno każdy z modeli przedstawionych na poniższym schemacie. Do każdej z kolb dolać za pomocą cylindra miarowego 5 ml wody dejonizowanej (najlepiej za pomocą tych 5 ml wody przenieść ilościowo naważkę aminokwasu).




Pipetą plastikową dodać kroplę/dwie 3M roztworu NaOH. Delikatnie wymieszać do całkowitego rozpuszczenia aminokwasów. Do kolby dodać następnie 0,1 mmol chlorku kobaltu(II), rozpuszczonego w 5 ml wody destylowanej. W przygotowanym roztworze umieścić mieszadełko teflonowe i ustawić na mieszadle magnetycznym w łaźni wodnej. Mieszaniny reakcyjne ogrzewać przez 10-15 min w temperaturze 50°C, cały czas mieszając. Obserwować i zanotować zmiany zachodzące podczas prowadzenia reakcji.

## 3 ANALIZA SPEKTROFOTOMETRYCZNA WYJŚCIOWYCH LIGANDÓW ORAZ OTRZYMANYCH KOMPLEKSÓW.

Przeanalizuj widma zarejestrowane dla badanych układów z jonami cynku i kobaltu.

# RAPORT Z LABORATORIUM 4

1. Wyjaśnij pojęcie palca cynkowego i jego rolę biologiczną. Opisz budowę domeny palca cynkowego klasy $C_2H_2$.
2. Wymień i opisz znane Ci cynkoenzymy, uwzględniając ich podział na funkcje.
3. Zapisz obserwacje zmian zachodzących podczas prowadzenia reakcji aminokwasów z chlorkiem cynku i chlorkiem kobaltu(II). Jakie możliwości daje zastąpienie jonów $Zn^{2+}$ jonami $Co^{2+}$?
4. Uzupełnij tabelę, określając położenie maksimów absorpcji badanych ligandów i kompleksów z Ćwiczenia 2

| Badany układ | Długość fali ($\lambda_{max}$) [nm] |
|---|---|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

## LITERATURA


[1] R. W Hay *Chemia bionieorganiczna*, PWN, Warszawa, 1990.

[2] S. J. Lippard, J. M. Berg, *Podstawy chemii bionieorganicznej*, PWN, Warszawa, 1998.

[3] R. Jastrząb, M. T. Kaczmarek, M. Nowak, I. Pospieszna-Markiewicz, M. Skrobańska, M. Zabiszak „Ćwiczenia laboratoryjne z chemii bionieorganicznej", Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych Oddział Wielkopolski **na zlecenie Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu** Copyright by PZITS and UAM, Poznań 2015