

Egyetemi doktori (Ph.D) értekezés tézisei

**PEPTIDEK ÉS SZÁRMAZÉKAIK ÁTMENETIFÉM
KOMPLEXEINEK KOORDINÁCIÓS ÉS REDOXI SAJÁTSÁGAI**

Timári Sarolta

Témavezető: Dr. Várnagy Katalin egyetemi docens



Debreceni Egyetem
Kémiai Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2012.

I. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

Régóta ismert, hogy bizonyos fémionok létfontosságúak az élő szervezet számára. Szerepet játszanak a szerves molekulák szintézisében, szállításában, illetve biológiai rendszerek sav-bázis- és redoxi folyamatainak katalizálásában. Napjainkra az is egyértelművé vált, hogy az élő szervezetben előforduló ligandumok közül a fehérjék képesek legerősebben megkötni a fémionokat.

A különböző fémtartalmú enzimek, proteinek és egyéb peptidláncot tartalmazó vegyületek legegyszerűbben olyan rendszerekkel modellezhetők, melyek központi ionként valamilyen átmenetifémiont, ligandumként aminosavat, peptidet vagy azok származékát tartalmazzák. Az elmúlt években elvégzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a metalloproteinekben a fémionok megkötésére leggyakrabban a peptidlánc oldalláncbeli donorcsoportjai szolgálnak. Ezek között említhetjük meg a hisztidin imidazol oldalláncát, mely az egyik legfontosabb kötőhelynek tekinthető, ennek köszönhetően viselkedését már kiterjedten vizsgálták.

A fémion – hisztidin imidazolnitrogén kölcsönhatásra több példát is találunk a metalloenzimek körében. A szénsavanhidrázban például a cink(II)ion három imidazolgyűrűhöz, míg a karboxipeptidázban két imidazolgyűrűhöz és egy karboxilátcsoporthoz kapcsolódik. A fémion koordinációja szintén részben az imidazolnitrogénekén keresztül valósul meg a különböző típusú szuperoxid-diszmutáz enzimekben is. Erre példaként az eukarióták sejtjeiben működő Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzim aktív centrumát említem, amelyben a Cu(II)-ion négy imidazolnitrogénhez, míg a cink(II)ion három imidazolnitrogénhez és egy aszparaginsav karboxilátcsoportjához kapcsolódik. A Cu,Zn-SOD enzim egyike azon specifikus enzimeknek, amelyek a sejtekben a szabad gyökök elbontását végzik.

A Debreceni Egyetem Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjának egyik kutatási iránya ezen enzim modellezése. Mivel egy adott modellkomplex számos feltételnek kell, hogy eleget tegyen, a mai napig kihívást jelent a kutatók számára egy minden szempontból megfelelő modellvegyület megtalálása. Koordinációs szempontból az imidazolgyűrű meghatározó szereppel bír, munkánk során ezért olyan hisztidintartalmú ligandumokat vizsgáltunk, amelyek réz(II)komplexében a ligandum az imidazolnitrogén donoratomokon keresztül kötődik a fémionhoz makrokelátokat képezve. A tanulmányozott ligandumok másik csoportját a kelátképző helyzetben imidazolnitrogéneket tartalmazó bisz(imidazol-2-il) származékok képezték. Célunk volt *a kutatócsoportunkban korábban előállított lehetséges Cu,Zn-SOD modellvegyületek további jellemzése és a vizsgálatok kiegészítése.*

Három fő célt tűztünk ki. Mivel a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumának Cu(II)-kötőhelyét modellező peptidek komplexképző sajátosságainak tanulmányozását Cu(II)-ionokkal már korábban elvégezték, így Cu(II)-ionok jelenlétében néhány kiegészítő mérést végeztünk. *A továbbiakban kiterjesztettük a peptidláncban különböző helyen és számban hisztidint tartalmazó védett peptidek oldategyensúlyi jellemzését olyan fémionokra, amelyek az élő szervezetben nyomelemként fordulnak elő; választásunk a nikkel(II)- és a kobalt(II)ionokra esett.* A nikkel(II)ion több enzimben fordul elő változatos koordinációs környezetben; a kobalt szerepe a B₁₂-vitaminhoz köthető. A kobalt(II)ionot tartalmazó rendszerek vizsgálatának jelentősége egyrészt abban áll, hogy a kialakuló komplexek nagy geometriai változatosságot mutatnak. Másrészt a kobalt(II)komplexek viselkedése analógiát mutat a cink(II)ionot tartalmazó rendszerek viselkedésével, mely ion komplexei nehezen vizsgálhatók. Így a kobalt(II)komplexek minden szempontból jó modellnek minősülnek.

Ezen vizsgálatokat követően az említett ligandumok Cu(II)-komplexeinek kémiai kísérleti módszerekkel kivitelezhető hatásvizsgálatát végeztük el. *Munkánk második fázisában a peptidek és a bisz(imidazol-2-il) származékok Cu(II)-ionokkal való komplexképződésének ismeretében azon komplexek redoxi paramétereit határoztuk meg, amelyekben a fémion koordinációja az oldalláncban található imidazolnitrogénekén keresztül valósul meg.* Célunk a Cu(II)-komplexek redoxi sajátosságainak jellemzése volt egy szisztematikus ciklikus voltammetriás kísérletsorozaton keresztül. A mérések lehetőséget adtak annak eldöntésére, hogy redoxipotenciál értékeik alapján képesek lehetnek-e ezek a komplexek a szuperoxid gyökánion elbontására.

A munka harmadik szakaszában a szerkezeti és redoxi szempontból ígéretesnek bizonyuló Cu(II)-komplexeket vizsgáltuk tovább, a SOD-aktivitásukat határoztuk meg. Különböző pH-értékeken végeztünk méréseket a szakirodalomból ismert indirekt SOD-aktivitást mérő módszer felhasználásával, spektrofotometriás technika segítségével. A SOD-aktivitás mérések során azt is tanulmányoztuk, hogy megfigyelhető-e korreláció egy komplex stabilitása, redoxipotenciál értéke és SOD-aktivitása között.

II. ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg a ligandumok protonálódási állandóit és a réz(II)-, nikkel(II)- és kobalt(II)komplexek stabilitási állandóit. Valamennyi általunk vizsgált vegyület vízoldható, ezért vizes oldatokat tanulmányoztunk ($T = 298 \text{ K}$; $I = 0,20 \text{ mol/dm}^3$). A fémion/ligandum arányt 1:5 és 2:1 között változtattuk. A potenciometriás mérések kiértékelését számítógépes program segítségével végeztük el. A kísérleti adatokból a fémkomplexekre meghatározott stabilitási szorzatokat a PSEQUAD és SUPERQUAD számítógépes programokkal számítottuk ki. A kapott stabilitási állandó értékek alapján a rendszerre jellemző koncentrációeloszlási görbéket SED program segítségével szerkesztettük meg.

UV-látható spektrofotometriás vizsgálatokat végeztünk a réz(II)-, a nikkel(II)- és a kobalt(II)ionokat tartalmazó rendszereken. A spektrumokat Hewlett-Packard HP 8453 típusú egysugaras, diódasoros, valamint Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras fotométereken, $1,000 \text{ cm}$ -es küvettában vettük fel különböző pH-értékeken, különböző fémion/ligandum arányoknál. A kapott spektrumok elemzését egyrészt a gyártó cég által biztosított kezelő- és kiértékelő programmal végeztük, másrészt a PSEQUAD program segítségével az egyes komplexek spektrumát is meghatároztuk. A spektrumok elemzésével a képződött komplexek szerkezetére, geometriájára tudunk következtetni.

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia optikailag aktív, azaz diszimmetrikus fémkomplexek szerkezetének felderítésében széles körben használt módszer. Ezen módszert mi réz(II)- és nikkel(II)-peptidkomplexek tanulmányozására használtuk. A CD méréseket a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén egy JASCO J-810 spektrométeren végeztük. A spektrumokat szobahőmérsékletű vizes oldatokban vettük fel különböző pH-értékeknél illetve 1:1, 1:2 fémion-ligandum arányoknál. A kapott CD görbék elemzését egyrészt a gyártó cég által biztosított kezelő- és kiértékelő programmal végeztük, másrészt a PSEQUAD program segítségével az egyes komplexek spektrumát is meghatároztuk.

^1H NMR spektroszkópiás méréseket az általunk vizsgált komplexek közül egyes nikkel(II)komplexek esetében végeztünk. Valamennyi esetben a síknégyzetes $[\text{NiLH}_3]$ összetételű komplex spektrumát vizsgáltuk erősen lúgos oldatokban D_2O -ban készített mintákkal. A kapott spektrumokat a BRUKER AM360 NMR spektrométer saját szoftverjével, illetve az 1D WINNMR programmal értékeltük ki. A kémiai eltolódás értékének változása (a szabad ligandumhoz viszonyítva), a jelek

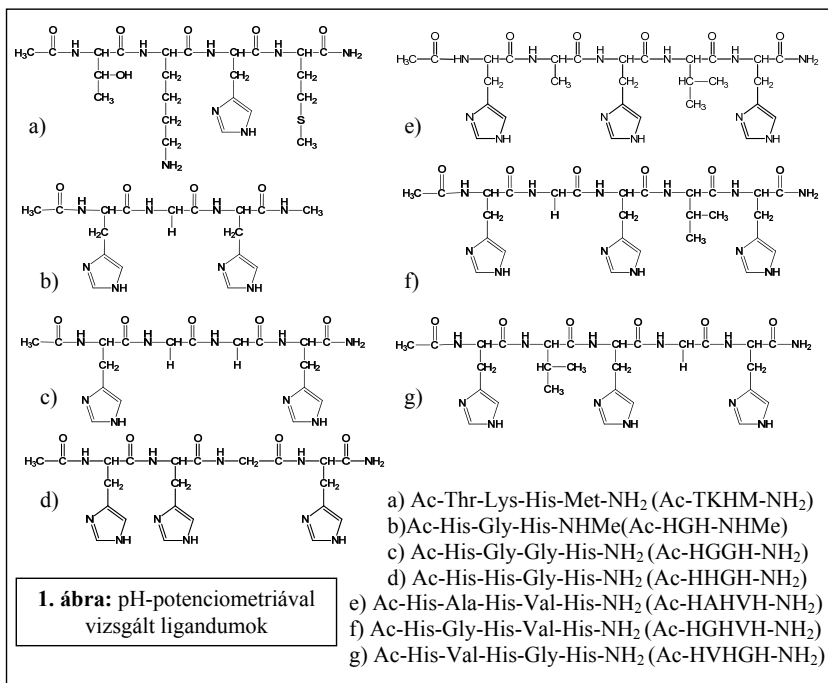
száma és felhasadása információt szolgáltatott a komplexek koordinációs módjáról, illetve az esetleges izomerekről.

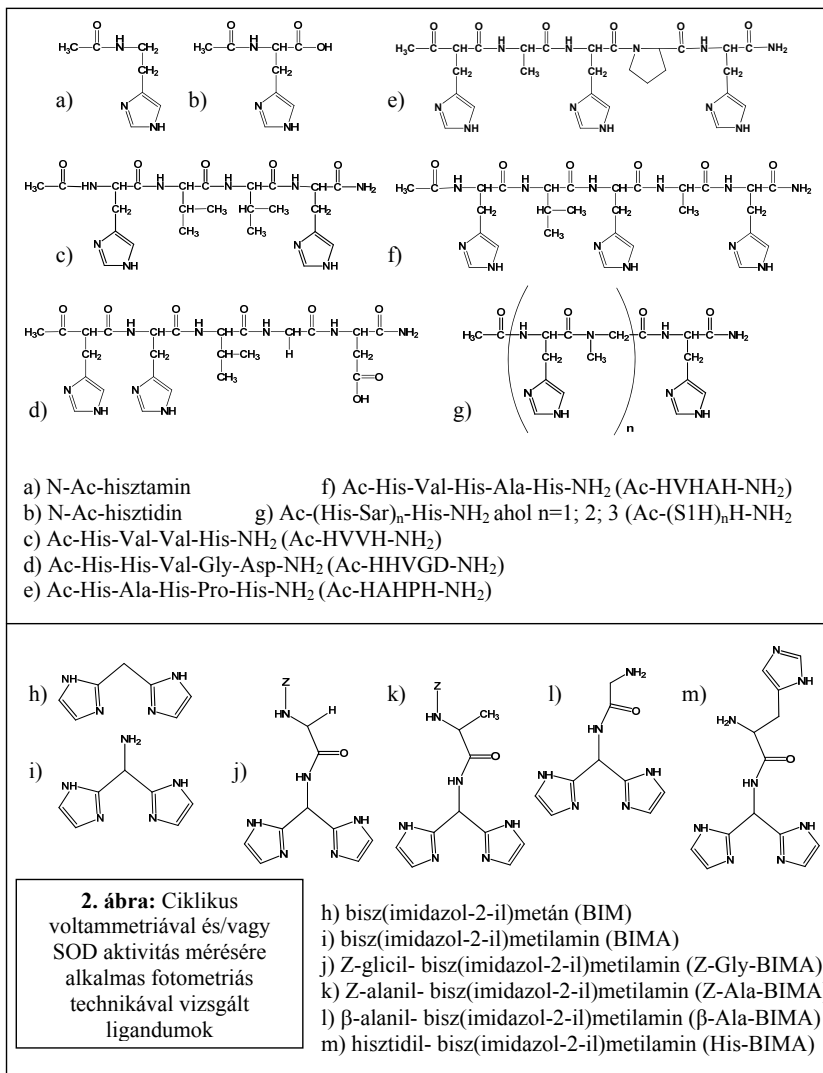
Ciklikus voltammetria segítségével a réz(II)komplexek redoxipotenciál értékeit határoztuk meg. Méréseinket egy Metrohm gyártmányú 746 VA Trace Analyzer készülékkel végeztük el, amelyhez egy 747 VA Stand csatlakozott. A minták méréséhez klasszikus háromelektrodos rendszert használtunk. A mérések vezérlését a gyártó cég által biztosított szoftverrel valósítottuk meg számítógép segítségével. A kapott voltammogramokat a CACYVO programmal értékeltük ki, és a leolvasott adatokból számoltuk ki a szükséges paramétereket (a féllépcsőpotenciál értéket, a csúcsszeperáció értékét és a csúcsáram értékek arányát). A számított értékek megadták a komplexek redoxipotenciál értékeit, és jelzés értékűek voltak a redoxi átalakulás reverzibilitása szempontjából.

Szuperoxid-diszmutáz aktivitást a közvetett technikák közül az egyik legelterjedtebb módszer, a xantin-xantin-oxidáz reakciójában *in situ* előállított szuperoxid gyökön és a nitroblue-tetrazólium-klorid (NBT) közötti reakció spektrofotometriás nyomon követésével mértünk. A SOD-aktivitás méréseket foszfátpufferes közegben végeztük el, összehasonlítás céljából a natív enzim és a Cu(II)-foszfát rendszer aktivitását is vizsgáltuk. Az abszorbanciaváltozást 560 nm-en követtük nyomon egy Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras fotométer segítségével, majd Excel programmal ábráztuk az eredményeket. A számolt adatsorokra Scientist programmal illesztettünk telítési görbét.

III. VIZSGÁLT LIGANDUMOK

A vizsgált ligandumok (1., 2. ábra) egy része kereskedelmi forgalomban kapható volt, ezeket különböző finomvegyszert forgalmazó cégektől szereztük be. Az N-Ac-hisztamint az Aldrich, az N-Ac-hisztidint a Sigma, az Ac-HGH-OH, Ac-HGH-NHMe, Ac-HHGH-OH ligandumokat a Bachem, az Ac-HGGH-NH₂, Ac-HVVH-NH₂ és az Ac-HHGH-NH₂ peptideket a Genscript cégektől vásároltuk. A bisz(imidazol-2-il)-származékokat az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportjában Süliné Dr. Vargha Helga és munkatársai állították elő. A Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumát modellező peptideket (Ac-HHVG-D-NH₂, Ac-HAHVH-NH₂, Ac-HAHPH-NH₂, Ac-HGHVH-NH₂, Ac-HVHAH-NH₂, Ac-HVHGH-NH₂, Ac-S1H2-NH₂, Ac-S2H3-NH₂, Ac-S3H4-NH₂) Dr. Kállay Csilla szintetizálta Görögországban, a Ioanninai Egyetemen (University of Ioannina), szilárdfázisú peptidszintézissel. Ugyanezen technika segítségével állítottam elő az Ac-TKHM-NH₂ tetrapeptidet a Catániai Egyetemen (Università degli Studi di Catania), Olaszországban a Liberty peptidszintetizáló berendezés segítségével.





IV. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. pH-potenciometriás eredmények

A) A vizsgált ligandumok réz(II)komplexei

Két, egy- illetve két hisztidint tartalmazó peptid (Ac-TKHM-NH₂, Ac-HGGH-NH₂) sav-bázis sajátosságait jellemeztük pH-metriás módszer segítségével, komplexképző sajátosságukat réz(II)ionok jelenlétében vizsgáltuk. A vizsgálatok során meghatároztuk a komplexek stabilitási állandóit, szerkezetüket pedig UV-látható spektrofotometriás és CD spektroszkópiás mérésekkel jellemeztük.

1.1. Az egy hisztidint tartalmazó tetrapeptid (Ac-TKHM-NH₂) esetében megállapítottuk, hogy a hisztidin oldallánc imidazolnitrogénje a fő fémion-kötőhely. Ez a kötémód lehetővé teszi a hisztidint megelőző két amidnitrogén deprotonálódását és koordinációját, és az [N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációval kialakuló részecske az uralkodó az 5,5-7,0-es pH-tartományban. Ezen részecske szabad koordinációs helyeinek köszönhetően a gyengén koordinálódó oldallánc is fémion-megkötőként lép fel.

1.2. A pH-potenciometriás és a spektroszkópiás adatok összevetése során megfigyeltük, hogy a treonin aminosav –OH-csoportjának stabilizáló hatása van. Ez a hatás akkor jelenik meg, ha az –OH-csoportot tartalmazó aminosav két hellyel előzi meg a hisztidint a peptidláncban. Ezen megállapítás összhangban van a korábbi irodalmi adatokkal is.

1.3. Megállapítottuk, hogy a két hisztidint tartalmazó Ac-HGGH-NH₂ peptid réz(II)ionok jelenlétében hasonlóan viselkedik, mint ahogy azt egyéb, több hisztidint tartalmazó védett peptidnél megfigyelték. A fiziológiás pH-tartományban az imidazolnitrogének koordinációjával [CuL]²⁺ komplex képződik, de ennek stabilitása kisebb, mint a HXH aminosav-szekvenciát tartalmazó peptidek esetében. A peptid kis méretének köszönhetően jelentős mennyiségű [CuL₂]²⁺ biszkomplex képződik.

1.4 Megfigyeltük, hogy a két imidazolnitrogén koordinációja nem tudja megakadályozni az amidnitrogének deprotonálódását; nagyobb pH-n végbemegy a két amidnitrogén deprotonálódása egy kooperatív folyamat során, amelyet az UV-látható spektrumban a kisebb hullámhosszak felé való eltolódás is jelez. A kialakuló [N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációban az N-terminális hisztidin nem vesz részt (ellentétben a HXH szekvenciát tartalmazó peptidek komplexképződésével). A harmadik amidnitrogén deprotonálódásával [CuLH₃]⁻ komplex képződik, melyben a deprotonálódást leíró kisebb pK-értékre egy lehetséges magyarázat az N-terminális hisztidin imidazolnitrogénjének gyenge axiális kölcsönhatása.

B) A vizsgált ligandumok nikkel(II)- és kobalt(II)komplexei

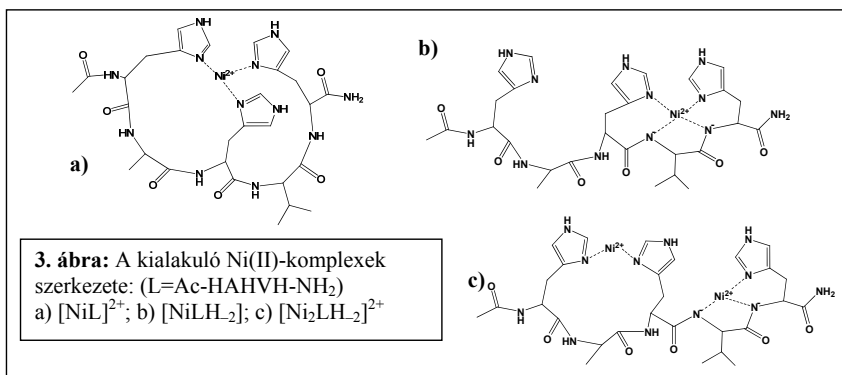
Néhány két- vagy három hisztidint tartalmazó peptid (Ac-HGH-NHMe, Ac-HGGH-NH₂, Ac-HHGH-NH₂, Ac-HAHVH-NH₂, Ac-HGHVH-NH₂, Ac-HVHGH-NH₂) esetében a nikkel(II)- és kobalt(II)komplexek vizsgálatát is elvégeztük.

1.5. Valamennyi ligandum esetében azt találtuk, hogy a két-, három- illetve négy imidazolnitrogén koordinációjával kialakuló ML komplexek (3.a) ábra) a domináns részecskék a fiziológiás pH-tartományban. Megállapítottuk, hogy alapvetően három tényező befolyásolja ezen komplexek stabilitását:

- Az aminosav-láncban helyet foglaló hisztidinek száma: minél nagyobb a koordinálódott imidazolnitrogének száma, annál nagyobb stabilitású komplexek keletkeznek.
- A hisztidinek egymáshoz viszonyított helyzete: megfigyeltük, hogy a legstabilisabb komplexek akkor keletkeznek, amikor a HXH szekvenciát tartalmazza az aminosav-lánc.
- A fémion minősége: a vizsgált nikkel(II)komplexek stabilitása nagyobb, mint a kobalt(II)komplexeiké, amely eredmény összhangban van az Irving-Williams sorral.

Amennyiben jelen van szabad karboxilátcsoport, úgy az is stabilizálja a kialakuló komplekszerkezetet. Ez különösen a kobalt(II)komplexek esetében jelentős.

1.6. A nikkel(II)ionokat tartalmazó rendszerekben a pH emelésével a két amidnitrogén deprotonálódása figyelhető meg, amely kooperatív módon megy végbe. A HXH szekvenciát tartalmazó peptidok esetében a kialakuló [NiLH₂] részecskében [N(Im), N⁻, N⁻, N(Im)] koordináció valósul meg (3.b) ábra). Nagy pH-n lejátszódik a harmadik amidnitrogén deprotonálódása is [NiLH₃]⁻ komplex képződését eredményezve [N⁻, N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációval. Amennyiben a hisztidinek távolabb (HXXXH szekvencia) helyezkednek el egymástól, a három amidnitrogén egy lépésben történő deprotonálódása figyelhető meg.



1.7. A három hisztidint tartalmazó pentapeptidek esetében izomer szerkezetek kialakulására is van lehetőség. A CD és a ^1H NMR vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy bár a fémion általában inkább a C-terminális részen kötődik, a másik izomer is megjelenik minden esetben. A ^1H NMR vizsgálatok segítségével az Ac-HGHVH-NH₂ ligandum esetében a $[\text{NiLH}_3]^-$ komplex két izomerjének arányát is megbecsültük, amely a C-terminális és az N-terminális részen kötődő fémiont tartalmazó komplexek esetében 83% és 17%-nak adódott.

1.8. A peptidek nikkell(II)komplexeinek vizsgálata során rögzített UV-látható spektrofotometriás és CD spektroszkópiás adatokból tudtunk számolni egyedi spektrumokat is a $[\text{NiLH}_2]$ és a $[\text{NiLH}_3]^-$ komplexek esetében. Megállapítottuk, hogy ha a ligandum C-terminális részének szekvenciája GXH, akkor mind a $[\text{NiLH}_2]$ mind a $[\text{NiLH}_3]^-$ komplex esetében a CD spektrumban ellentétes Cotton-effektus jelenik meg.

1.9. A pentapeptidek szerkezetükből adódóan képesek két nikkell(II)ion megkötésére is. Fémionfelesleget tartalmazó oldatokban $[\text{Ni}_2\text{LH}_2]^{2+}$, $[\text{Ni}_2\text{LH}_4]$ és $[\text{Ni}_2\text{LH}_5]^-$ összetételű komplexek keletkeznek. Ezekben a komplexekben a fémionok a hisztidin imidazolnitrogénjéhez és az amidnitrogénekhez koordinálnak.

1.10. Kobalt(II)ion jelenlétében a kialakuló ML komplexek nem elég stabilisak ahhoz, hogy megakadályozzák a fémion hidrolízisét, így a lúgos pH-tartományban a fémion hidrolizise és csapadékképződés volt megfigyelhető.

2. Ciklikus voltammetriás vizsgálatok eredményei

A pH-potenciometriás vizsgálatok alapján azt láttuk, hogy több ligandum esetében is kialakulnak olyan komplexek, amelyekben a fémion imidazolnitrogénekre keresztül koordinálódik. Ezen komplexek szerkezeti szempontból a Cu,Zn-SOD enzim Cu(II)-kötőhelyének megfelelő modelljei lehetnek. Ennek alapján a munka folytatásaként az imidazolnitrogénes koordinációjú komplexek redoxi paramétereinek vizsgálatát végeztük el. Az egyensúlyi vizsgálatok alapján három ligandumtípus Cu(II)-komplexeit tanulmányoztuk vizes oldatban ciklikus voltammetria segítségével:

- egyszerű hisztidinszármazékok;
- multihisztidin peptidek;
- bisz(imidazol-2-il) származékok.

A kapott redoxipotenciál értékek információt adhatnak a Cu(II)-komplexek SOD-aktivitásáról. Ahhoz, hogy egy komplex képes legyen a szuperoxid gyökanyon elbontására redoxipotenciál értéke $-0,16$ V és $+0,89$ V közé kell, hogy essen.

Vizsgálatainkhoz kifejlesztettünk egy mikrocellát, amelyben igen kis mintamennyiség alkalmazásával is végre tudtuk hajtani méréseinket. Megállapítottuk, hogy legalább öt- vagy tízszeres ligandumfelesleg mellett tudunk értékelhető voltammogramokat rögzíteni. Megfigyeltük, hogy a redoxi folyamatok során kvázireverzibilis, egyelektronos folyamatok játszódnak le.

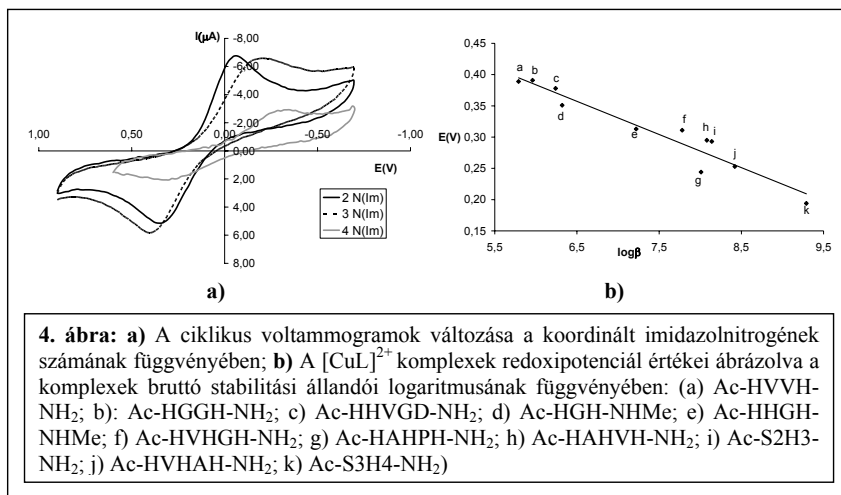
2.1. Szisztematikus kísérletsorozatunkban először a Cu(II)-hisztidin rendszert, illetve a különböző egyszerű hisztidinszármazékok (N-Ac-hisztidin, N-Ac-hisztamin) Cu(II)-komplexeit vizsgáltuk. Összehasonlításképpen néhány egyszerű aminosav Cu(II)-komplexének redoxipotenciál értékeit is meghatároztuk. Összevetve a nem koordinálódó oldalláncot, illetve oldalláncban gyengén koordinálódó donorcsoportot tartalmazó aminosavak Cu(II)-komplexeinek redoxipotenciál értékeit azt állapítottuk meg, hogy az oldallánc mérete a meghatározó, nagyobb méretű oldallánc csökkenti a redoxipotenciál értéket. Az erősen koordinálódó oldalláncot tartalmazó hisztidin esetében azonban már jóval jelentősebb redoxipotenciál csökkenés figyelhető meg.

2.2. A multihisztidin peptidek $[\text{CuL}]^{2+}$ és $[\text{CuL}_2]^{2+}$ komplexeire meghatározott redoxipotenciál értékek alapján megállapítottuk, hogy a komplexek redukálhatósága az alábbi tényezőktől függ:

- A hisztidin aminosavak száma a peptidláncban: megfigyelhető, hogy a redoxipotenciál értéke csökken a koordinált imidazolnitrogének számának növekedése függvényében (4. a) ábra);
- A hisztidinek elhelyezkedése a peptidláncban: a hisztidinek távolságának növekedése növeli a redukálhatóságot.
- A komplex stabilitása: minél stabilisabbak a komplexek, annál nehezebb redukálni a fémcentrumot. Ezen korrelációt mutatja be a 4. b) ábra.

2.3. A további vizsgálatokban a csak imidazolnitrogénes koordinációt tartalmazó komplexek redoxipotenciál értékeit határoztuk meg. Mérési körülményeink között a különböző bisz(imidazol-2-il) származékok esetén a 4 imidazolnitrogén koordinációjú $[\text{CuL}_2]$ és $[\text{CuL}_2\text{H}_2]$ komplexekre jellemző redoxipotenciál értékeket határoztuk meg. Ezekben a komplexekben a kelátképző helyzetben lévő két imidazolgyűrű kapcsolódik a fémionhoz. A kapott redoxipotenciál értékek valamennyi esetben ~ 0 V-nak adódtak. Megfigyeltük, hogy a koordinálódó molekula mérete jelentősen nem befolyásolja a redoxipotenciál értékét.

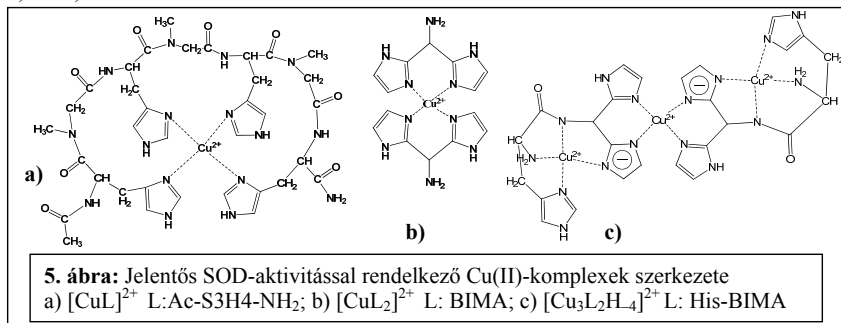
Valamennyi meghatározott redoxipotenciál érték a $-0,16$ - $+0,89$ V tartományba esik, így ezen komplexek képesek lehetnek a szuperoxid-gyökion elbontására.



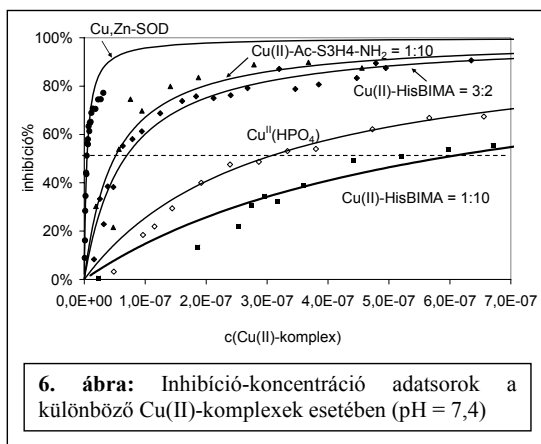
Az adatok alapján megállapíthatjuk, hogy redoxi szempontból a hisztidintartalmú peptidek makrokelát típusú koordinációt tartalmazó Cu(II)-komplexei jobb SOD-modellek, mint a kelát típusú koordinációt tartalmazó bisz(imidazol-2-il) származékok Cu(II)-komplexei.

3. Szuperoxid-diszmutáz aktivitás vizsgálatok

Elektrokémiai vizsgálatainkat követően a redoxi szempontból ígéretesnek tűnő imidazolnitrogén koordinációt tartalmazó Cu(II)-komplexek (bisz(imidazol-2-il) származékok és multihisztidin peptidek Cu(II)-komplexei, 5. a) és b) ábra) szuperoxid-diszmutáz aktivitását mértük meg. Kiegészítettük a tanulmányozott komplexek körét a Cu(II)-His-BIMA rendszerben képződő imidazolátohidas komplex vizsgálatával is (5. c) ábra).



3.1. A vizsgálati módszer paramétereinek beállítása során megállapítottuk, hogy a vizsgálati körülmények között ($\text{pH} = 6,8; 7,4$; nagy ($c = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$) HPO_4^{2-} és $\sim 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ Cu^{2+} -ion koncentráció) jelentős mértékben módosul a kialakuló komplexek mennyisége az oldategyensúlyi és elektrokémiai vizsgálatoknál alkalmazott körülmények között kiszámított részecskeeloszláshoz képest. A különböző pH -értékeken végzett saját méréseink egymással és az irodalmi adatokkal való összevetése csak akkor volt lehetséges, ha az adott körülmények között, a natív enzim SOD-aktivitásának ismeretében, az ún. relatív aktivitás értéket határoztuk meg.



3.2. Az 1. táblázatban összefoglalt SOD aktivitás adatok alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált komplexek között két esetben figyelhető meg jelentősebb mértékű aktivitásnövekedés:

- a négy imidazolkoordinációjú, HXH szekvenciát tartalmazó multihisztidin peptid $[\text{CuL}]^{2+}$ komplexénél (5. a) ábra),
- a Cu(II)-His-BIMA rendszerben képződő, hárommagvú imidazolátohidas $[\text{Cu}_3\text{L}_2\text{H}_4]^{2+}$ komplexnél (5. c) ábra, 6.).

1. táblázat: A vizsgált Cu(II)-komplexek SOD-aktivitás értékei kiegészítve a natív enzim és a Cu(HPO₄) rendszer aktivitásával

pH = 6,8	IC ₅₀ [μM]	Relatív aktivitás (%)	Részecskék	Koordinációs mód
Cu,Zn-SOD	0,0030	100	–	–
Cu ^{II} (HPO ₄)	0,25	1,20	–	–
Cu ^{II} -Ac-HGGH-NH ₂	0,27	1,11	[CuL] ²⁺	2 × N(Im)
Cu ^{II} -Ac-HVVH-NH ₂	0,20	1,50	[CuL] ²⁺	2 × N(Im)
Cu ^{II} -Ac-S1H2-NH ₂	0,21	1,43	[CuL] ²⁺ ; [CuLH ₁] ⁺	2 × N(Im); 2 × N(Im), N [–]
Cu ^{II} -Ac-HHGH-NH ₂	0,17	1,76	[CuL] ²⁺ ; [CuLH ₁] ⁺	3 × N(Im); 2 × N(Im), N [–]
Cu ^{II} -Ac-HAHPH-NH ₂	0,12	2,50	[CuL] ²⁺ ; [CuLH ₁] ⁺	3 × N(Im); N(Im), N [–]
Cu ^{II} -Ac-S2H3-NH ₂	0,24	1,25	[CuL] ²⁺ ; [CuLH ₁] ⁺	3 × N(Im)
Cu ^{II} -Ac-S3H4-NH ₂	0,11	2,73	[CuL] ²⁺	4 × N(Im)
Cu ^{II} -β-Ala-BIMA	0,15	2,00	[CuL ₂] ²⁺	4 × N(Im)
pH = 7,4				
Cu,Zn-SOD	0,0044	100	–	–
Cu ^{II} (HPO ₄)	0,34	1,29	–	–
Cu ^{II} -Ac-HGGH-NH ₂	0,38	1,16	[CuLH ₂] ([CuLH ₃] [–])	2 × N(Im), 2 × N [–] ; N(Im), 3 × N [–]
Cu ^{II} -Ac-HVVH-NH ₂	0,63	0,70	[CuL] ²⁺	2 × N(Im)
Cu ^{II} -His-BIMA (1:10)	0,64	0,69	[CuL ₂ H] ³⁺	3 × N(Im)
Cu ^{II} -Ac-S2H3-NH ₂	0,15	2,93	[CuLH ₁] ⁺ ; ([CuL] ²⁺)	3 × N(Im), N [–] ; 3 × N(Im)
Cu ^{II} -His-BIMA (3:2)	0,070	6,29	[Cu ₃ L ₂ H ₄] ²⁺	4 × N(Im) +imidazoláto híd
Cu ^{II} -Ac-S3H4-NH ₂	0,046	9,56	[CuL] ²⁺	4 × N(Im)

V. AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEI

Kutatómunkánk során több olyan hisztidintartalmú peptid és bisz(imidazol-2-il) származék vizsgálatát végeztük el, amelyek Cu(II)-ionokkal kialakuló komplexei szerkezeti szempontból a Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzim modelljei lehetnek. Méréseink azt is megmutatták, hogy más, a szervezetben nyomelemként előforduló fémion jelenlétében hogyan viselkednek ezek a ligandumok.

Vizsgálataink során megbizonyosodtunk arról, hogy az imidazolnitrogén koordinációt tartalmazó makrokelátos komplexek és a kelátképző helyzetben imidazolnitrogéneket tartalmazó Cu(II)-bisz(imidazol-2-il) komplexek redoxi szempontból ígéretes modellek. Az elvégzett SOD aktivitás vizsgálatok azt mutatták, hogy a négy hisztidint tartalmazó heptapeptid $[\text{CuL}]^{2+}$ komplexe és a His-BIMA imidazolátóhidas komplexe jelentős SOD aktivitást mutat. Bár ezek az értékek még mindig elmaradnak a natív enzim aktivitásától, a korábbi irodalmi adatokhoz képest ígéretesek. Így megállapíthatjuk, hogy ezek a ligandumok megfelelő kiindulópontot jelenthetnek olyan molekulák tervezésében, amelyek Cu(II)-komplexei a SOD enzim nagyon jó szerkezeti és funkcionális modelljei lehetnek.

Propositions of PhD theses

**COORDINATION AND REDOX PROPERTIES OF TRANSITION
METAL COMPLEXES OF PEPTIDES AND PEPTIDE
DERIVATIVES**

Sarolta Timári

Supervisor: Dr. Katalin Várnagy associate professor



University of Debrecen
PhD Program in Chemistry
Debrecen, 2012.

I. INTRODUCTION AND THE AIM OF THE WORK

It is well-known that some metal ions are essential for living organisms. They play important roles in the synthesis and transport of organic molecules and in catalyzing acid-base and redox processes of biological systems. It is also obvious that among the organic compounds proteins play the most important role in the metal ion binding.

The various metalloenzymes, proteins and other compounds containing peptide chains can be modelled by such systems that contain some kind of transition metal ion as a central ion and amino acids, peptides or peptide derivatives as ligands. Studies that have been carried out recently have demonstrated that the most frequent binding sites in proteins are the side-chain donor groups of the protein framework. One of the primary binding sites for metal ions is the imidazole side-chain of the histidine that is why the role of histidine has been thoroughly studied in the past decades.

Several examples can be found among the metalloenzymes for the metal ion – histidine interaction. In the case of carbonic anhydrase, three binding sites of zinc(II) ion are occupied by imidazole nitrogens while a water molecule occupies the fourth one. The zinc(II) ion is bound by two imidazole rings and a carboxylate group in the carboxy peptidase. In the group of superoxide-dismutase enzymes there are several examples for the same way of coordination. Taking Cu,Zn superoxide dismutase enzyme as an example, in the active centre the Cu(II) ion is bound through four imidazole nitrogens while the zinc(II) ion is coordinated through three imidazole nitrogens and the carboxylate group of an aspartic acid. Cu,Zn-SOD is one of those specific enzymes that catalyze the disproportionation of superoxide to hydrogen peroxide and dioxygen in the cells.

One of the research fields of the Bioinorganic Research Group at the University of Debrecen is the mimicking of this enzyme. As a model complex should fulfil several criteria, it is still a challenge for the researchers to find a model compound that satisfies all the requirements. From a coordination point of view the imidazole ring has a major role thus during our research work we studied such histidine containing ligands in which the ligand is coordinated to the metal ion through the imidazole nitrogen donor atoms forming a macrochelate ring. The other group of the studied ligands includes derivatives of bis(imidazol-2-yl)methane that contain imidazole nitrogen atoms in chelatable position. Our aim was the further characterization of model compounds that were previously synthesized in our research group for mimicking the Cu,Zn-SOD enzyme.

We set three major aims. As the complex formation properties of peptides modelling the Cu(II) binding site in the active centre of Cu,Zn-SOD enzyme have been characterized earlier, we carried out a few additional measurements in the Cu(II) ion – ligand systems. *We expanded the study of the complex formation processes of protected peptides containing histidine in different location and number in the peptide. We chose such metal ions that appear in the living organisms as trace elements, namely nickel(II) and cobalt(II).* Nickel(II) ion appears in several enzymes in varying coordination environments while the role of cobalt(II) ion can be related to vitamin B₁₂. The reason why it is worth studying cobalt(II) containing systems is that complexes formed in these systems show great geometrical diversity. On the other hand, cobalt(II) complexes behave similarly to zinc(II) complexes that can be investigated with great difficulty. Thus cobalt(II) complexes can be good models from every point of view.

After the solution equilibrium studies we investigated the activity of the Cu(II) complexes of the above mentioned ligands. *In the second phase of our work we determined the redox parameters of those Cu(II) complexes in which the metal ion is bound to the peptide through side-chain imidazole nitrogens. Our aim was the characterization of the redox properties of copper(II) complexes in a systematic cyclic voltammetric test series.* The measurements helped us to decide whether these complexes – based on their redox potential values – can be capable of decomposing superoxide anion or not.

In the third phase of our work we measured the SOD activity of those complexes that were promising models both from a structural and a redox point of view. We carried out measurements at different pH values by applying the indirect SOD activity assay by means of spectrophotometric technique. During these studies we were also interested to see if there is any correlation between the stability, redox potential value and SOD activity of a complex.

II. EXPERIMENTAL METHODS

Protonation constants of the ligands and the stability constants of the copper(II), nickel(II) and cobalt(II) complexes were determined by **potentiometric titration**. All the studied compounds are water soluble so the measurements were carried out in aqueous solutions ($T = 298\text{ K}$; $I = 0.20\text{ mol/dm}^3$). The metal ion/ligand ratio was ranging between 1:5 and 2:1. The evaluation of the potentiometric measurements was done with the help of computational programs. The protonation constants of the ligands and the overall stability constants of the complexes were calculated by means of the general computational programs, PSEQUAD and SUPERQUAD. Based on the calculated stability constants the concentration distribution curves for the metal/ligand systems were constructed by SED program.

UV-Vis spectrophotometric measurements were carried out in the copper(II), nickel(II)- and cobalt(II)-ligand systems. The spectra were recorded on Hewlett Packard HP 8453 diode array and Perkin-Elmer Lambda 25 double beam spectrophotometers in 1.000 cm cuvettes at varying pH values and metal ion/ligand ratios. For the analysis of the obtained spectra partly the program – provided by the distributor of the instrument – was used, while the spectra of the individual species was determined by the PSEQUAD program. The character of the spectra provided useful information about the structure and the geometry of the complexes.

Circular dichroism (CD) spectroscopy is a widely-used technique for exploring the structure of optically active (dissymmetric) metal complexes. We used this method for investigating copper(II) and nickel(II) peptide complexes. The CD measurements were carried out at the Department of Organic Chemistry at the University of Debrecen. The spectra were recorded on a JASCO J-810 spectropolarimeter in aqueous solutions at different pH-values and at 1:1, 1:2 metal ion/ligand ratios. The CD spectra were evaluated by the computational program of the producer of the instrument and the spectra of the individual species was determined by the same general PSEQUAD program.

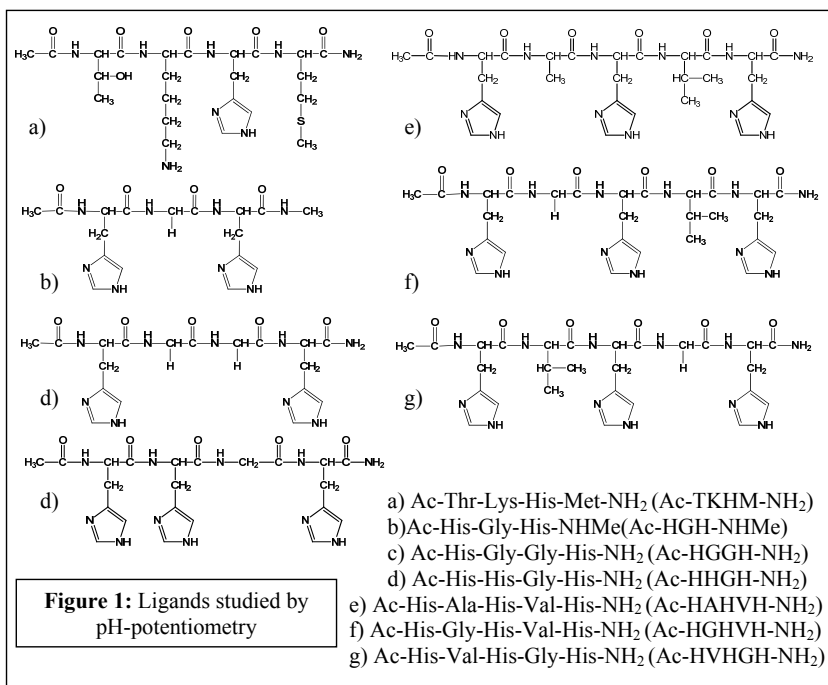
^1H NMR spectroscopic measurements were carried in the case of certain nickel(II) complexes. In all cases the square planar $[\text{NiLH}_3]^-$ complex was studied under highly basic conditions with samples that were prepared in D_2O . The obtained spectra were analyzed by the software of BRUKER AM360 NMR spectrometer and by 1D WINNMR program. The changes in the chemical shift (compared to the free ligand), the number and the splitting of signs provided information about the coordination modes of the complexes and the existence of isomers.

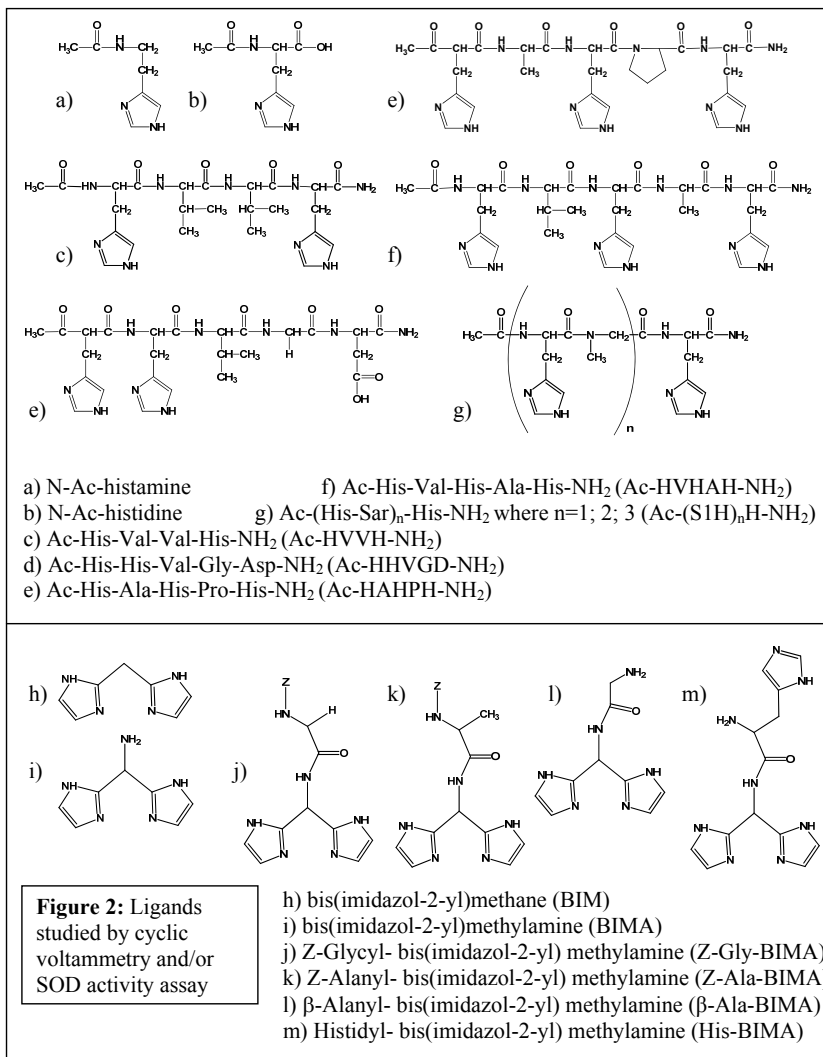
The redox potential values of the copper(II) complexes were determined by **cyclic voltammetry**. The cyclic voltammograms of the copper(II) complexes were obtained by means of a Metrohm VA 746 Trace Analyzer equipped with 747 VA Stand driven by a common PC. The measurements were carried out at 25°C with a three electrode assembly. For the evaluation of the voltammograms we used the CACYVO program that was provided by the distributor of the instrument. The necessary parameters were calculated from the evaluated data (redox potential, peak separation, ratio of the cathodic and anodic peak currents). The calculated values gave us the redox potential values of the complexes and provided information about the reversibility of the redox process.

The **superoxide dismutase activity** of the complexes was determined by the indirect method of NBT reduction. The superoxide anion was generated *in situ* by the xanthine/xanthine oxidase reaction and detected spectrophotometrically by monitoring the reduction of NBT. The tests were carried out in phosphate buffer (5×10^{-2} mol/dm³) at different pH values. For comparison the activity of Cu,Zn-SOD enzyme and the Cu(HPO₄) was also measured in control experiments. The changes in the absorbance were registered by a Perkin Elmer Lambda 25 double beam spectrophotometer at 560 nm. The results were plotted in Excel and the data were fitted by the Scientist program.

III. STUDIED LIGANDS

Some of the ligands (Fig. 1 and Fig. 2) were commercially available. The derivative N-Ac-histamine was purchased from Aldrich while N-Ac-histidine from Sigma. The peptides Ac-HGH-OH, Ac-HGH-NHMe and Ac-HHGH-OH were purchased from Bachem while the tetrapeptides Ac-HGGH-NH₂, Ac-HVVH-NH₂ and Ac-HHGH-NH₂ from Genscript. The bis(imidazol-2-yl) derivatives were prepared by Helga Süli-Vargha and her colleagues in the Research Group of Peptide Chemistry of MTA-ELTE. The ligands modelling the active centre of Cu,Zn-SOD enzyme (Ac-HHVG-D-NH₂, Ac-HAHVH-NH₂, Ac-HAHPH-NH₂, Ac-HGHVH-NH₂, Ac-HVHAH-NH₂, Ac-HVHGH-NH₂, Ac-S1H2-NH₂, Ac-S2H3-NH₂, Ac-S3H4-NH₂) were synthesized in the solid state by Csilla Kállay at the University of Ioannina in Greece. I prepared the tetrapeptide Ac-TKHM-NH₂ with the same technique at the University of Catania (Università degli Studi di Catania), in Italy with the help of a microwave-assisted Liberty Peptide Synthesizer apparatus.





IV. NEW SCIENTIFIC ACHIEVEMENTS

1. Results of the pH-potentiometric studies

A) Copper(II) complexes of the studied ligands

We characterized the acid-base properties of two peptides containing one or two histidine residues (Ac-TKHM-NH₂, Ac-HGGH-NH₂) and their complex formation processes in the presence of copper(II) ions by pH-potentiometry. During the research, we determined the stability constants of the complexes formed and confirmed their structures by UV-Vis spectrophotometry and CD spectroscopy.

1.1. In the case of the one histidine containing peptide (Ac-TKHM-NH₂) it was stated that the major binding site is the imidazole nitrogen in the histidyl residue. This binding mode makes possible the deprotonation and coordination of the two amide nitrogens preceding the histidine, the dominant complex in the 5.5-7.0 pH-range is the species with [N⁻, N⁻, N(Im)] coordination. Due to the free coordination sites of this species the weakly coordinating side chain takes part in the metal binding as well.

1.2. The comparison of the potentiometric and spectroscopic results revealed the stabilizing role of the -OH group of threonine. This effect appears when the amino acid containing the oxygen donor group precedes the histidine in the peptide chain by two positions. This statement is in agreement with the previously published data.

1.3. It was stated that the two histidine containing tetrapeptide, Ac-HGGH-NH₂ behaves similarly to other protected peptides containing several histidyl residues in the presence of copper(II) ions. With the coordination of imidazole nitrogens [CuL]²⁺ complex is formed in the physiological pH range however, its thermodynamic stability is smaller in the case of this tetrapeptide than for the peptides with the HXH sequence. The amount of the [CuL₂]²⁺ complex is significant, which can be explained by the size of peptide.

1.4 The coordination of the two imidazole nitrogens cannot prevent the deprotonation of peptide nitrogens. At higher pH values the deprotonation of the two amide nitrogens takes place in a cooperative process that is accompanied by a significant shift in the UV-Vis spectra to the lower wavelength values and an increase in the intensity of absorption maxima. The N-terminal histidyl residue does not take part in the coordination with [N⁻, N⁻, N(Im)] donor atoms contrary to the peptides containing the HXH sequence. The deprotonation of the third amide nitrogen results in the formation of [CuLH₃]⁻ complex. The pK value characterizing this process is smaller than the corresponding pK value for the peptides with the HXH sequence. It can be explained by the weak axial coordination of the imidazole nitrogen of the N-terminal histidine.

B) Nickel(II) and cobalt(II) complexes of the studied ligands

In the case of some two or three histidine containing peptides (Ac-HGH-NHMe, Ac-HGGH-NH₂, Ac-HHGH-NH₂, Ac-HAHVH-NH₂, Ac-HGHVH-NH₂, Ac-HVHGH-NH₂) we studied the nickel(II) and cobalt(II) complexes.

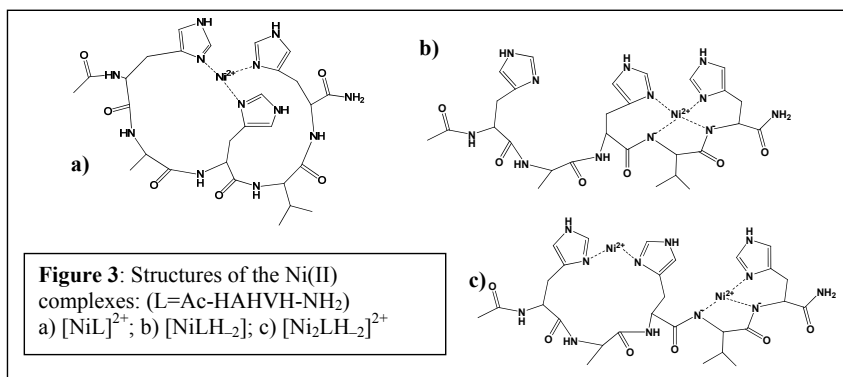
1.5. In all cases ML (Fig. 3.a) complexes – formed with the coordination of two, three or four imidazole nitrogens – are the main species in the physiological pH range. Based on the experimental results we can say that three factors affect the stability of the complexes:

- the number of histidyl residues in the amino acid sequence: the increasing number of histidyl residues is accompanied with the increase of the thermodynamic stability of complexes.
- the positions of histidyl residues in the peptide chain: the highest stability constants were obtained when the histidyl residues are separated only by one amino acid moiety (e.g.: HXH sequence).
- the quality of the metal ion: the studied nickel(II) complexes have higher stability than the cobalt(II) complexes; this result is in agreement with the Irving-Williams series.

The presence of free carboxylate functions contributes to the increase of the stability of the complexes as well. This effect is especially important for the cobalt(II) complexes.

1.6. In the nickel(II) ion containing systems the deprotonation of two amide nitrogens takes place in a cooperative process by increasing the pH. In the case of the peptides containing the HXH sequence, the coordination of the [N(Im), N⁻, N⁻, N(Im)] donor set can be supposed for the [NiLH₂] complex (Fig. 3. b). At even higher pH values a new amide deprotonation process occurs leading to the formation of [NiLH₃]⁻ complex with [N⁻, N⁻, N⁻, N(Im)] coordination (Fig. 3. c). If the histidyl residues are separated by two non-coordinating amino acids (HXXH sequence), the deprotonation of the three amide nitrogens appears in a one-step process.

1.7. In the case of the pentapeptides containing three histidyl residues isomeric structures of [NiLH₂] and [NiLH₃]⁻ complexes can be formed. The isomeric complexes, in which the metal ion binds on the C-termini, are preferred in all cases, but the presence of other isomers is unambiguously proved by CD and ¹H NMR spectroscopic techniques. The ¹H NMR measurements made it possible to estimate the ratio of isomeric structures of [NiLH₃]⁻ complex of Ac-HGHVH-NH₂ peptide: C-terminal coordinated complex : N-terminal coordinated complex = 83% : 17%.



1.8. UV-Vis and CD spectra were registered for the nickel(II) complexes of the peptides. It was possible to calculate the individual spectra in the case of [NiLH₂] and [NiLH₃]⁻ complexes. We observed that both for [NiLH₂] and [NiLH₃]⁻ complexes the CD extrema are the mirror images of the previously obtained values if the amino acid sequence at the C-terminus of the peptide is GXH.

1.9. Due to their structure, the pentapeptides are able to bind more than one nickel(II) ion. In the presence of excess metal ion, [Ni₂LH₂]²⁺, [Ni₂LH₄] and [Ni₂LH₅]⁻ complexes are formed in the systems. In these complexes the metal ions are bound by the imidazole nitrogens of histidyl residues and amide nitrogens.

1.10. In the case of cobalt(II) containing systems the overall thermodynamic stabilities of the ML complexes are not high enough to prevent the hydrolysis of the metal ion. Thus in the basic pH range the hydrolysis of the metal ion and precipitation was observed.

2. Results of the cyclic voltammetric measurements

According to the results of the potentiometric studies, in the case of several ligands such complexes are formed in which the metal ion is coordinated through imidazole nitrogen atoms. From a structural point of view these complexes are considered to be adequate models of the copper(II) binding site of the Cu,Zn-SOD enzyme. Thus our further investigations included the determination of the redox parameters of the imidazole nitrogen coordinated complexes. Based on the equilibrium measurements we studied the Cu(II) complexes of three types of ligands with the help of cyclic voltammetry:

- simple histidine derivatives;
- multihistidine peptides;
- bis(imidazol-2-yl) derivatives.

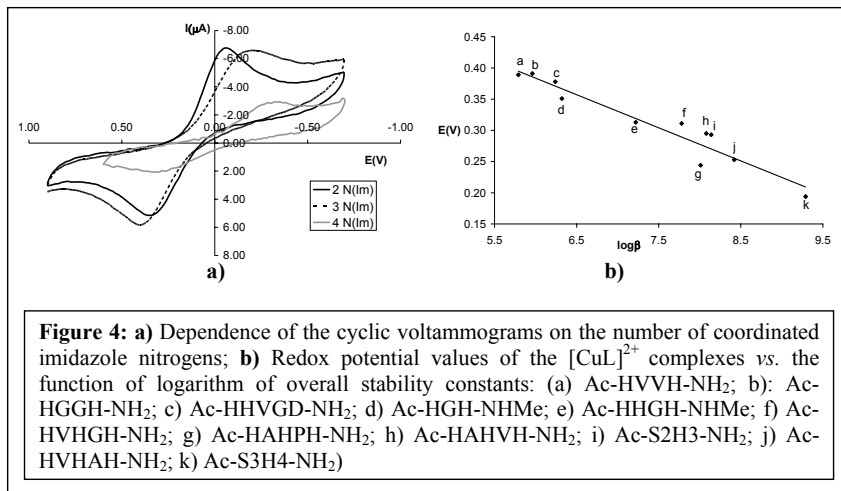
The obtained redox potential values can give information about the SOD activity of the Cu(II) complexes. Those complexes can be good functional models of the enzyme that can decompose superoxide similarly to the native enzyme, which means that the redox potential of the complex falls between -0.16 V and +0.89 V.

For the measurements we developed a microcell, in which we could carry out measurements with using very small amounts of substances. The voltammograms could only be registered if at least a five- or tenfold ligand excess was applied. We observed that for all studied Cu(II) complexes the characteristic redox reactions are quasi-reversible one electron reduction processes.

2.1. In our systematic test series we studied the Cu(II)-histidine system and the Cu(II) complexes of various simple histidine derivatives (N-Ac-histidine, N-Ac-histamine). For comparison we determined the redox potential values of the Cu(II) complexes of some simple amino acids. On comparing the redox potential values of the Cu(II) complexes of amino acids containing non-coordinating or weakly coordinating side chains it can be said that the size of the side chain is the dominant factor: the greater the size of the side chain is, the smaller redox potential value can be measured. In the case of histidine that contains a strongly coordinating side chain, a more significant decrease in the redox potential values can be observed.

2.2. Based on the redox potential values of the $[\text{CuL}]^{2+}$ and $[\text{CuL}_2]^{2+}$ complexes of multihistidine peptides, three major factors can be listed that influence the reducibility of the complexes:

- the number of the histidine amino acids in the molecule: it seems that the reduction potential of the complexes changes with the increase in the number of coordinated imidazole nitrogen atoms (Fig. 4. a).
- the positions of histidyl residues in the peptide chain: if the distance between the histidyl residues is increasing, the reducibility is increasing as well.
- the stability of the complexes: the greater the stability of the complex is, the more difficult it is to reduce the metal centre. This correlation is represented on Fig. 4. b).



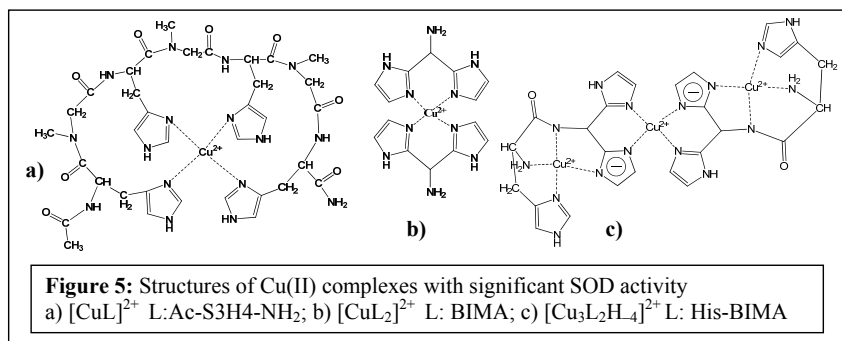
2.3. During our further studies we determined the redox potential values of various copper(II) complexes coordinated exclusively through imidazole nitrogen donor atoms. In the case of the various bis(imidazol-2-yl) derivatives the four imidazole nitrogen coordinated $[\text{CuL}_2]$ and $[\text{CuL}_2\text{H}_2]$ were studied electrochemically under the applied conditions. In these complexes the metal ion is bound by the two imidazole rings in chelatable positions. The obtained redox potential values are around 0 V. It was observed that the size of the coordinated molecule does not influence significantly the reducibility of the complex.

All the determined redox potential values fall into the positive redox potential range so these complexes can be capable of decomposing the superoxide anion. Based on these data it can be stated that the Cu(II) complexes of the histidine containing peptides with macrochelate-type coordination are better SOD-models than the Cu(II) complexes of bis(imidazol-2-yl) derivatives with chelate-type coordination.

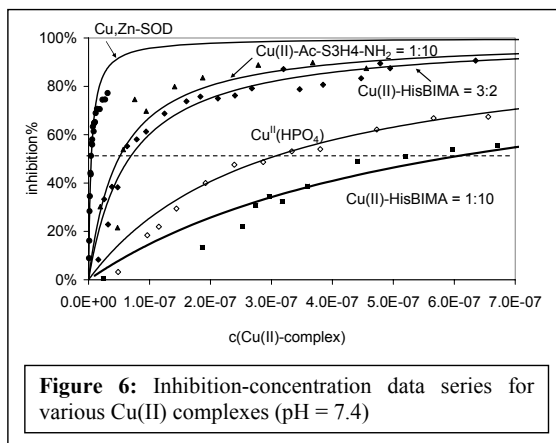
3. Results of the superoxide dismutase assay

As a continuation of our electrochemical experiments, we measured the SOD activity of the complexes that seemed to be promising SOD models from a redox point of view. Those Cu(II) complexes of bis(imidazol-2-yl) derivatives and multihistidine peptides (Fig. 5. a) and b)) were investigated in which the metal ion is coordinated through imidazole nitrogen atoms. The SOD activity assay was also completed with

the study of the imidazolato bridged complex (Fig. 5. c)) that is formed in the Cu(II)-His-BIMA system.



3.1. On adjusting the parameters of the SOD activity assay we observed that under these experimental conditions (pH = 6.8; 7.4; great ($c = 5 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$) HPO_4^{2-} and small $\sim 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ Cu^{2+} -ion concentration) the concentration distribution curves are significantly different from the ones under the conditions of the potentiometric and the electrochemical measurements. The comparison of our data (measured at different pH values) with the literature values was only possible if we calculated a so-called relative activity value under the given conditions. The calculation of the relative activity is only possible if the activity of the native enzyme is known under the same conditions.



3.2. Based on the SOD activity data that is summarized in Table 1 it can be stated that two of the studied Cu(II) complexes exhibit significant SOD activity:

- the four imidazole nitrogen coordinated $[\text{CuL}]^{2+}$ complex of the multihistidine peptide containing the HXH sequence (Fig. 5. a)) and
- the imidazolato bridged $[\text{Cu}_3\text{L}_2\text{H}_4]^{2+}$ complex that is formed in the Cu(II)-His-BIMA system (Fig. 5. c), 6.).

Table 1: SOD activity values of the investigated Cu(II) complexes completed with the activity of the native enzyme and $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{HPO}_4)$ system

pH = 6.8	IC ₅₀ [μM]	Relative activity (%)	Species	Coordination mode
Cu,Zn-SOD	0.0030	100	–	–
$\text{Cu}^{\text{II}}(\text{HPO}_4)$	0.25	1.20	–	–
$\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Ac-HGGH-NH}_2$	0.27	1.11	$[\text{CuL}]^{2+}$	$2 \times \text{N(Im)}$
$\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Ac-HVVH-NH}_2$	0.20	1.50	$[\text{CuL}]^{2+}$	$2 \times \text{N(Im)}$
$\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Ac-S1H2-NH}_2$	0.21	1.43	$[\text{CuL}]^{2+}$; $[\text{CuLH}_1]^+$	$2 \times \text{N(Im)}$; $2 \times \text{N(Im)}, \text{N}^-$
$\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Ac-HHGH-NH}_2$	0.17	1.76	$[\text{CuL}]^{2+}$; $[\text{CuLH}_1]^+$	$3 \times \text{N(Im)}$; $2 \times \text{N(Im)}, \text{N}^-$
$\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Ac-HAHPH-NH}_2$	0.12	2.50	$[\text{CuL}]^{2+}$; $[\text{CuLH}_1]^+$	$3 \times \text{N(Im)}$; $\text{N(Im)}, \text{N}^-$
$\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Ac-S2H3-NH}_2$	0.24	1.25	$[\text{CuL}]^{2+}$; $[\text{CuLH}_1]^+$	$3 \times \text{N(Im)}$
$\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Ac-S3H4-NH}_2$	0.11	2.73	$[\text{CuL}]^{2+}$	$4 \times \text{N(Im)}$
$\text{Cu}^{\text{II}}\text{-}\beta\text{-Ala-BIMA}$	0.15	2.00	$[\text{CuL}_2]^{2+}$	$4 \times \text{N(Im)}$
pH = 7.4				
Cu,Zn-SOD	0.0044	100	–	–
$\text{Cu}^{\text{II}}(\text{HPO}_4)$	0.34	1.29	–	–
$\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Ac-HGGH-NH}_2$	0.38	1.16	$[\text{CuLH}_2]$ $([\text{CuLH}_3]^-)$	$2 \times \text{N(Im)}, 2 \times \text{N}^-$; $\text{N(Im)}, 3 \times \text{N}^-$
$\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Ac-HVVH-NH}_2$	0.63	0.70	$[\text{CuL}]^{2+}$	$2 \times \text{N(Im)}$
$\text{Cu}^{\text{II}}\text{-His-BIMA (1:10)}$	0.64	0.69	$[\text{CuL}_2\text{H}]^{3+}$	$3 \times \text{N(Im)}$
$\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Ac-S2H3-NH}_2$	0.15	2.93	$[\text{CuLH}_1]^+$; $([\text{CuL}]^{2+})$	$3 \times \text{N(Im)}, \text{N}^-$; $3 \times \text{N(Im)}$
$\text{Cu}^{\text{II}}\text{-His-BIMA (3:2)}$	0.070	6.29	$[\text{Cu}_3\text{L}_2\text{H}_4]^{2+}$	$4 \times \text{N(Im)}$ +imidazolato bridge
$\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Ac-S3H4-NH}_2$	0.046	9.56	$[\text{CuL}]^{2+}$	$4 \times \text{N(Im)}$

V. POSSIBLE APPLICATION OF THE RESULTS

During our research work we studied the Cu(II) complexes of such histidine containing ligands and bis(imidazol-2-yl) derivatives that can be good models of the Cu,Zn superoxide dismutase enzyme. Our measurements gave information about the behaviour of these ligands in the presence of other trace elements that occur in the living organisms.

The electrochemical measurements revealed that the Cu(II) complexes of the histidine containing peptides with macrochelate-type coordination and the Cu(II) complexes of bis(imidazol-2-yl) derivatives with chelate-type coordination are promising model compounds from a redox point of view. The SOD activity assay showed that the $[\text{CuL}]^{2+}$ complex of the heptapeptide containing four histidyl residues and the imidazolato bridged complex of His-BIMA exhibit significant SOD activity. Although these activity values are still lower than that of the native enzyme, the complexes are among the most active compounds published so far. Thus it can be stated that these ligands are good starting points for the planning of such molecules the Cu(II) complexes of which can be good structural and functional models of the SOD enzyme.

VI. TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK (PUBLICATIONS)

Az értekezés alapját képező közlemények (Articles connected to the thesis)

1. S. Timári, Cs. Kállay, K. Ősz, I. Sóvágó, K. Várnagy
Transition metal complexes of short multihistidine peptides
Dalton Trans., (2009), 1962-1971. Impakt faktor: 3,647
2. S. Timári, C. Riccardo, K. Várnagy
Characterization of CuZnSOD model complexes from a redox point of view: redox properties of copper(II) complexes of imidazole containing ligands
Journal of Inorganic Biochemistry, (2011) 105: 1009-1017. Impakt faktor: 3,317
3. C. Kállay, I. Turi, S. Timári, Z. Nagy, D. Sanna, G. Pappalardo, P. de Bona, E. Rizzarelli, I. Sóvágó
The effect of point mutations on copper(II) complexes with peptide fragments encompassing the 106-114 region of human prion protein
Monatsh. Chem., (2011), 142: 411-419. Impakt faktor: 1,356
4. Sarolta Timári, Katalin Várnagy
Structural and redox properties of copper(II) complexes of ligands containing side chain imidazole rings
Spring Wind 2010, Konferenciakötet, Pécs, DOSZ-2010, 546-551.

Az értekezésben nem tárgyalt közlemények (Articles not detailed in the thesis)

5. D. Sanna, K. Várnagy, S. Timári, G. Micera, E. Garribba
VO²⁺ Complexation of bioligands showing keto-enol tautomerism: potentiometric, spectroscopic and computational study
Inorganic Chemistry, (2011), 50: 10328-10341. Impakt faktor: 4,325
6. C. Kállay, Á. Dávid, S. Timári, E. M. Nagy, D. Sanna, E. Garribba, G. Micera, P. de Bona, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, I. Sóvágó
Copper(II) complexes of rat amylin fragments
Dalton Trans., (2011), 40: 9711-9721. Impakt faktor: 3,647

Előadások (Lectures)

1. Timári Sarolta
Több hisztidint tartalmazó pentapeptidek nikkel(II)- és kobalt(II)komplexei
XXVIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, 2007. április 2-4, Szeged, Magyarország (163. oldal)
2. Timári Sarolta, Kállay Csilla, Várnagy Katalin
Több hisztidint tartalmazó pentapeptidek nikkel(II)- és kobalt(II)komplexei
XLII. Komplexkémiái Kollokvium, 2007. május 23-25, Mátrafüred, Magyarország (23. oldal)
3. Sarolta Timári, Csilla Kállay, Imre Sóvágó, Katalin Várnagy
Transition metal complexes of small multihistidine peptides
4th Central European Conference Chemistry towards Biology, 2008. szeptember 8-11, Dobogókő, Magyarország (angol nyelven) (55. oldal)

4. Timári Sarolta, Kállay Csilla, Várnagy Katalin, Sóvágó Imre

Több hisztidint tartalmazó peptidok átmenetifém komplexei

XXXI. Kémiai Előadói Napok, 2008. október 27-29, Szeged, Magyarország (120-123. oldal)

5. Timári Sarolta, Várnagy Katalin

Structural and redox properties of copper(II) complexes of ligands containing side chain imidazole rings

Spring Wind 2010, 2010. március 25-27, Pécs, Magyarország (angol nyelven) (546-551. oldal)

6. Timári Sarolta, Cerea Riccardo, Várnagy Katalin

Oldalláncban imidazol gyűrűket tartalmazó ligandumok réz(II) komplexekinek szerkezeti és redoxi sajátosságai

XLV. Komplexkémiai Kollokvium, 2010. május 26-28, Mátraháza, Magyarország (13. oldal)

7. Sarolta Timári, Cerea Riccardo, Katalin Várnagy

Structural and redox properties of copper(II) complexes of ligands containing side chain imidazole rings

XI International Symposium on Inorganic Biochemistry, 2010. szeptember 4-8, Kudowa Zdrój, Lengyelország (angol nyelven) (39. oldal)

8. Timári Sarolta, Várnagy Katalin: **Oldalláncban imidazolgyűrűket tartalmazó ligandumok Cu(II)-komplexekinek szerkezeti és redoxi sajátosságai**

MKE 1. Nemzeti Konferencia, 2011. május 22-25, Sopron, Magyarország (161. oldal)

Poszterek (Posters)

1. K. Várnagy, S. Timári, A. Dávid, Cs. Kállay, K. Ősz, I. Sóvágó

Transition metal complexes of small multihistidine peptides

2nd European Conference on Chemistry for Life Sciences, 2007. szeptember 4-8, Wrocław, Lengyelország (317. oldal)

2. Sarolta Timári, Gábor Balogh, Katalin Várnagy

Structural and redox properties of copper(II) complexes of short multihistidine peptides

10th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 2009. szeptember 25-28., Debrecen, Magyarország (117. oldal)

3. Sarolta Timári, Katalin Várnagy

Structural and redox properties of copper(II) complexes of ligands containing side chain imidazole rings

10th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2010. június 22-26., Thessaloniki, Görögország (PO-255.)

4. Sarolta Timári, Katalin Várnagy

Copper(II) complexes as models of the active centre of Cu,Zn-SOD enzyme

4th European Conference on Chemistry for Life Sciences, 2011. augusztus 31 – szeptember 3., Budapest, Magyarország (299. oldal)

5. Sarolta Timári, Katalin Várnagy

Copper(II) complexes as models of the active centre of Cu,Zn-SOD enzyme

11th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 2011. december 2-5., Barcelona, Spanyolország (P-135.)

6. Katalin Várnagy, Sarolta Timári, Gizella Csire, Norbert Lihi

Coordination and redox properties of copper(II) and iron(II/III) complexes of bis(imidazol-2-yl) ligands

11th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 2011. december 2-5., Barcelona, Spanyolország (P-147.)

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy **Timári Sarolta** predoktori ösztöndíjas hallgató a lent feltüntetett cikkhez 50%-ban járult hozzá.

Tudományos publikáció:

C. Kállay, I. Turi, S. Timári, Z. Nagy, D. Sanna, G. Pappalardo, P. de Bona, E. Rizzarelli, I. Sóvágó

The effect of point mutations on copper(II) complexes with peptide fragments encompassing the 106-114 region of human prion protein

Monatsh. Chem., (2011), 142: 411-419.

Debrecen, 2012. május 17.

.....
Dr. Várnagy Katalin
témavezető