



Az oldalláncok hatása a CuZnSOD enzimet modellező peptidek komplexképző sajátságaira

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Székely Enikő

Témavezető: Prof. Dr. Várnagy Katalin, egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi és Műszaki Tudományi Doktori Tanács
Kémiai Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2025.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Műszaki Tudományi Doktori Tanács **Kémiai Tudományok Doktori Iskola K/2 programja** keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából. Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2025.

.....
a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy **Székely Enikő** doktorjelölt **2018-2022** között a fent megnevezett Doktori Iskola **K/2** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2025.

.....
a témavezető aláírása

Az oldalláncok hatása a CuZnSOD enzimet modellező peptidek komplexképző sajátosságaira

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Kémia tudományágban

Írta: **Székely Enikő** okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémiai Tudományok doktori iskolája
(Koordinációs és analitikai kémiai programja) keretében

Témavezető: **Prof. Dr. Várnagy Katalin** egyetemi tanár

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2025.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm *Prof. Dr. Gáspár Attila* tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetőséget adott az általa vezetett Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken a doktori munkám elkészítéséhez.

Szeretném kifejezni őszinte hálámat és köszönetem témavezetőmnek, *Prof. Dr. Várnagy Katalin* egyetemi tanárnak, hogy segítette munkám értékes észrevételeivel és jó tanácsaival, valamint önzetlen segítségével hozzájárult szakmai fejlődésemhez és értekezésem megírásához.

Köszönet illeti *Dr. Farkas Etelka* professzor emeritát, *Dr. Sóvágó Imre* professzor emeritust, *Prof. Dr. Buglyó Péter* egyetemi tanárt és *Dr. Kállay Csilla* egyetemi docent, akik bármikor szívesen segítettek és nyomon követték munkámat illetve tanácsaikkal támogatták azt.

Köszönettel tartozom a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport minden régi és jelenlegi tagjának, akikkel a munka baráti hangulatban telt. Köszönöm *Dr. Lukács Mártonnak*, hogy segített a különböző berendezések és módszerek megtanulásában, továbbá kérdéseimmel bármikor bizalommal fordulhattam hozzá. Köszönettel tartozom *Hőgyéné Dr. Grenács Ágnes Juditnak* a közös szakmai eszmecsereért, amelyek ötletei formálták kutatásom irányát és eredményeit. *Dr. Csire Gizellának* hálásan köszönöm segítségét a ciklikus voltammetriás mérések elsajátításában és a Cu(II)-Ac-HDHAHDH-NH₂ rendszer méréseinek elvégzését. Köszönet illeti *Dr. Lihi Norbert* egyetemi docent az ESR és a SOD aktivitás mérésekben nyújtott segítségért. Külön szeretnék köszönetet mondani *Dr. Balogh Bettina Diána* és *Bodnár Nikolett* szaktársaimnak a doktori képzés alatt együtt töltött négy évről, az értékes szakmai és személyes beszélgetésekért, valamint a támogató baráti társaságukért.

Köszönettel tartozom *Molnár Marianna* hallgatónak a közös munkáért és a mérésekben nyújtott segítségért.

Köszönöm *Dr. Csire Gizellának* és *Dr. Nagy Lajos* egyetemi docensnek a tömegspektrumok felvételét.

Külön köszönöm *Bogdányi-Fekete Orsolyának* és *Dancs Grétának*, hogy mindig önzetlenül segítettek bármilyen problémám is merült fel. Szeretném megköszönni *Nagyné Dombi Gizella* tanszéki ügyintézőnek a hivatalos ügyekben nyújtott segítségét.

Hálával tartozom a CNR-IBB kutatóközpontban dolgozó, velünk együttműködésben álló, *Dr. Giuseppe Pappalardo* és *Dr. Giuseppe Di Natale* kutatóknak, hogy a külföldi tanulmányutam során önzetlenül segítettek.

Végezetül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak, különösképpen *férjemnek, szüleimnek és testvéreimnek*, akik az évek során mindvégig támogattak. Hálás vagyok a rengeteg szeretetért, megértésért és bátorításért, amit kaptam tőlük, mert ezek adtak erőt ahhoz, hogy kitartsak és sikerrel leküzdjem az előttem álló akadályokat.

A kutatások anyagi támogatásáért a NKFIH K115480, valamint a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 számú pályázatnak tartozom köszönettel. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával készült. A kutatómunkát támogatta továbbá a Tudományos Mecenatúra MEC-R 140974, valamint az NKFIH 2019-2.1.11-TÉT-2019-00055 számú pályázata is.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	1
2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK.....	3
2.1. A SOD enzimek előfordulása és szerepe	3
2.1.1. A CuZnSOD enzim.....	4
2.1.2. A CuZnSOD enzim lehetséges modelljei	8
2.1.3. A Cu(II)-komplexek SOD aktivitásának vizsgálata.....	10
2.2. Réz(II)komplexek redoxi sajátságai.....	13
2.2.1. Hisztidint tartalmazó peptidek Cu(II)-komplexeinek redoxi sajátságai..	15
2.3. Egy- vagy több hisztidint tartalmazó peptidek Cu(II)-, Ni(II)-, Zn(II)- komplexei.....	16
2.3.1. Hisztidint tartalmazó terminálisan védett peptidek jellemzése	20
2.3.1.1. <i>Egy hisztidint tartalmazó terminálisan védett peptidek jellemzése...</i>	20
2.3.1.2. <i>Több hisztidint tartalmazó terminálisan védett peptidek jellemzése.</i>	22
2.3.2. Oldalláncban különböző csoportot tartalmazó terminálisan védett multihisztidin peptidek jellemzése.....	27
3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK ÉS ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	30
3.1. Felhasznált vegyszerek, vizsgált ligandumok	30
3.2. Szilárdfázisú peptidszintézis	33
3.3. pH-potenciometria	38
3.4. UV-látható spektrofotometria	42
3.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia.....	45
3.6. Ciklikus voltammetria (CV).....	47
3.7. Elektronspin-rezonancia spektroszkópia (ESR).....	49
3.8. ¹ H-NMR spektroszkópia	50
3.9. Tömegspektrometria (MS).....	51

3.10. Szuperoxid-dizmutáz aktivitás vizsgálatok	52
4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	55
4.1. Aszparaginsavat tartalmazó peptidek.....	55
4.1.1 A peptidek sav-bázis tulajdonságai.....	55
4.1.2. Cu(II)-komplexek potenciometriás és spektrális vizsgálatai	56
4.1.2.1. <i>Két hisztidint tartalmazó tetrapeptidek</i>	61
4.1.2.2. <i>Három hisztidint tartalmazó pentapeptidek</i>	62
4.1.2.3. <i>Három hisztidint tartalmazó hexapeptidek</i>	64
4.1.2.4. <i>Négy hisztidint tartalmazó heptapeptidek</i>	65
4.1.4. A Cu(II)-komplexek elektrokémiai tulajdonságai	67
4.1.5. Ni(II)-komplexek	71
4.1.6. Zn(II)-komplexek.....	75
4.2. SOD modellpeptidek vizsgálata és eredményük	78
4.2.1. A peptidek sav-bázis tulajdonságai.....	78
4.2.2. Cu(II)-komplexek	79
4.2.3. Zn(II)-komplexek.....	90
4.2.4. Vegyes Cu(II)-Zn(II)-komplexek	92
4.2.5. A SOD-A5-G15 peptid Ni(II)-komplexei.....	95
4.2.6. SOD aktivitás vizsgálatok és eredményük.....	97
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	101
6. SUMMARY	104
7. IRODALOMJEGYZÉK	107
8. FÜGGELÉK	119

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata:

Ac-	acetilcsoport (védőcsoport)
Ac ₂ O	ecetsavanhidrid
AcOH	ecetsav
ACN	acetonitril
Ala, A	alanin
Arg, R	arginin
Asn, N	aszparagin
Asp, D	aszparaginsav
Boc	<i>tert</i> -butil-oxikarbonil (védőcsoport)
Bzl	benzil (védőcsoport)
CD	cirkuláris dikroizmus
CNR-IBB	Consiglio Nazionale Delle Ricerche - Istituto Di Biostrutture e Bioimmagini
CO vagy C=O	karbonilcsoport
COO ⁻	karboxilátcsoport
COOH	karboxilcsoport
CT sáv	töltésátviteli sáv (Charge Transfer)
CV	ciklikus voltammetria
Cys, C	cisztein
CCS	fehérje, ami a rezet szállítja a SOD enzimhez (copper chaperon for superoxide dismutase)
CuZnSOD	Cu(II)-, és Zn(II)-ionokat tartalmazó szuperoxid-dizmutáz enzim
DCM	diklórmétán
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropil-etilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DODT	2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol
EDT	etán-1,2-ditiol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ESI	elektroporlasztásos ionizáció (electrospray ionization)
ESR	elektronspin-rezonancia spektroszkópia
Et ₂ O	dietil-éter
Fmoc	9-fluorenil-metoxi-karbonil (védőcsoport)
Gln, Q	glutamin
Glu, E	glutaminsav
Gly, G	glicin
His, H	hisztidin
His-BIMA	<i>N</i> -hisztidil-bisz(imidazol-2-il)-metilamin
HOBt	<i>N</i> -hidroxi-benzotriazol
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High-Performance Liquid Chromatography)
IC ₅₀	az a komplexkoncentráció, mely az NBT redukciójának 50%-os inhibícióját okozza
Lys, K	lizin
log β [H _x L]	bruttó képződési állandó

$\log\beta$ vagy $\log\beta[M_pH_qL_r]$	stabilitási állandó
M, mM, μ M	koncentráció mértékegysége: mol/dm ³ , mmol/dm ³ , μ mol/dm ³
MALDI	mátrix által segített lézerdeszorpciós ionizáció
Me	metilcsoport
Met, M	metionin
MS	tömegspektrometria
NBT	nitroblue-tetrazólium-klorid
NH ₂	aminocsoport
NHE	normál hidrogén elektród
N _{im} , Im	imidazolnitrogén
NMP	N-metil-2-pirrolidon
NMR	mágneses rezonancia (nuclear magnetic resonance)
N ⁻	deprotonált amidnitrogén
<i>O</i> tBu	<i>O</i> - <i>terc</i> -butil
PEG	polietilén-glikol
<i>pK</i>	deprotonálódási állandó
Pro, P	prolin
RP-HPLC	fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
ROS	reaktív oxigén származék
(tiolát-), S ⁻	tiolátcsoport
Sar	szarkozin, N-metil-glicin
SCE	kalomel elektród
Ser, S	szerin
SOD	szuperoxid-dizmutáz
SOD-E5-N10	Ac-FHVHEGPHFN-NH ₂
SOD-E5-D16	Ac-FHVHEGPHFNGGHVGD-NH ₂
SOD-A5-G15	Ac-FHVHAGPHFNGGHVG-NH ₂
TBTU	2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium
<i>t</i> Bu	tetrafluoroborát
TFA	<i>terc</i> -butil (védőcsoport)
Thr, T	trifluorecetsav
TIS	treonin
TOF	triizopropil-szilán
Trp, W	repülési idő (time of flight)
Trt	triptofán
Tyr, Y	tritol
UV-látható	tirozin
Val, V	ultraibolya-látható spektroszkópia (UV-visible)
$\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)^{\text{vak}}$	valin
	a fémkomplex hiányában percenként mért abszorbanciaváltozás 560 nm-en
$\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)^{\text{komplex}}$	a fémkomplex jelenlétében percenként mért abszorbanciaváltozás 560 nm-en

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Az életműködéshez szükséges energiát minden aerob szervezet a táplálkozás útján felvett szerves molekulák elégetésével nyeri. Az oxigén jelenlétében történő lebontási folyamat melléktermékeként szabad gyökök keletkeznek. Ezek a szabad gyökök különösen reaktív vegyületek és káros hatással vannak a sejtek alkotóelemeire. Bár a természetes antioxidáns rendszerek hatékonyak, a reaktív oxigén származékok (ROS) kialakulása képes felülmúlni a szervezet védekező antioxidáns képességét, létrehozva egy oxidatív stressz állapotot, ami különféle patológiákkal, például szív- és érrendszeri betegségekkel, rákos megbetegedéssel és idegrendszeri zavarokkal társul. Az élő szervezetekben ezen vegyületek egyik legfontosabb képviselője a szuperoxid gyökanion, melynek a „semlegesítéséért” a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimek a felelősek. A SOD enzimek katalizálják a szuperoxid gyökanion dizmutációját hidrogén-peroxiddá és oxigénné, ezzel csökkentve az oxidatív stresszt. Ezért az exogén SOD enzim használata az oxidatív stresszel összefüggő betegségek kezelésére fontos stratégia. Azonban a természetes SOD enzimeknek vannak hátrányaik ezen alkalmazás során, mint például az alacsony szöveti áteresztőképesség és a magas molekulatömeg. Emiatt szükség van kis molekulakomplexek szintézisére, amelyek utánozzák a SOD szerkezetét és katalitikus aktivitását.

A legfejlettebb biológiai szervezetekben előforduló Cu,Zn-szuperoxid-dizmutáz (CuZnSOD) egy metalloenzim, amelynek aktív centrumában réz(II)- és cink(II)ionok találhatók. A Cu(II)-ion három imidazolnitrogénhez koordinálódik, míg a Zn(II)-ion két imidazolnitrogén és egy aszparaginsav karboxilátcsoportjának kötődése révén stabilizálódik. Mindezek mellett a két fémiont egy imidazolátohíd köti össze. A réz(II)ion redoxiaktív központként működik, amely lehetővé teszi a szuperoxid gyökanion átalakítását, míg a cink(II)ion szerkezetalkító szerepet tölt be. A CuZnSOD enzim működésének zavara vagy csökkent aktivitása számos neurodegeneratív betegség, például az amiotrófiás laterálszklerózis (ALS) kialakulásával is összefüggésbe hozható, így ennek a metalloenzimnek a modellezése és vizsgálata jelentős biológiai és orvosi relevanciával bír.

A bioszervetlen kémia egyik kiemelt területe a természetben előforduló enzimek működésének utánzása, vagyis a mimetikumok fejlesztése. A CuZnSOD

mimetikumok célja, hogy hatékonyan helyettesítsék az enzimet biológiai rendszerekben, különösen olyan esetekben, amikor annak működése károsodik. Az oligopeptidek fémkomplexeinek alkalmazása lehetőséget nyújt az enzim szerkezeti és funkcionális tulajdonságainak utánzására, miközben stabilabb vagy akár jobb katalitikus aktivitású modellek fejlesztésére is alkalmat adhatnak.

Kutatócsoportunk korábban vizsgált olyan peptideket, amelyek a CuZnSOD enzim aktív centrumában a Cu(II)-ion kötőhelyének (Ac-HVH-NH₂ tripeptid), illetve a Zn(II)-ion kötőhelyének (Ac-HVGD-NH₂ tetrapeptid) modellezésére szolgáltak. Ezt követően olyan multihisztidin peptideket szintetizáltak, amelyek a hisztidint különböző helyzetben és környezetben tartalmazták, valamint az oldalláncok specifikus hatásainak megértéséhez megtervezetten változtatták a szekvenciában a különböző típusú oldalláncokat. A PhD munkám során ezekbe a kutatásokba kapcsolódtam be. A munkám két fő részre tagolható: i) folytatva a korábban elkezdett szisztematikus vizsgálatokat, a negatív töltésű oldallánccal rendelkező aszparaginsavat tartalmazó peptidek tanulmányozása és ii) az eddigi eredmények felhasználásával CuZnSOD modellpeptidek szintézise, valamint vizsgálata.

A jelen doktori munka célja a CuZnSOD enzim működésének modellezése oligopeptidekkel, valamint ezek vizsgálata vizes közegben különböző fémionokkal. A kutatás során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztam meg:

- A CuZnSOD enzim aktív centrumának modellezésére potenciálisan alkalmas terminálisan védett, vizes közegben vizsgálható multihisztidin peptidek tervezése és szintézise.
- A multihisztidin ligandumok Cu(II)-, Zn(II)- és Ni(II)-komplexei összetételének, stabilitásának és szerkezetének meghatározása.
- A modellpeptidek Cu(II)-komplexeinek elektrokémiai vizsgálata.
- A Cu(II)-komplexelek SOD aktivitásának meghatározása.

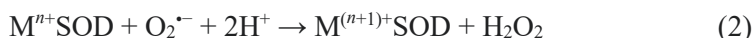
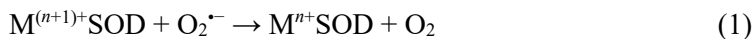
A fenti célok megvalósításával hozzájárulhatunk új CuZnSOD mimetikumok tervezéséhez és megértéséhez, valamint a bioszervetlen kémia területén történő alkalmazásuk előmozdításához.

2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

2.1. A SOD enzimek előfordulása és szerepe

Minden aerob szervezet az életműködéséhez szükséges energiát a táplálkozás útján felvett szerves molekulák elégetésével nyeri. A lebontási folyamat oxigén jelenlétében történik és melléktermékként szabad gyökök keletkeznek. Ezek a szabad gyökök erősen oxidáló hatású, rövid élettartamú és nagyon reaktív vegyületek. A szabad gyökök egyéb káros hatásai mellett felelősek lehetnek a szervezet öregedéséért [1], felhalmozódásuk akár idegrendszeri fejlődési rendellenességek vagy daganatok kialakulását is okozhatják [2,3]. A sejtekben azonban vannak olyan enzimek – szuperoxid-dizmutáz, peroxidáz, kataláz enzimek –, melyek képesek elbontani ezeket a szabad gyököket.

A szuperoxid-dizmutáz (SOD) az egyetlen antioxidáns metalloenzim, amely „semlegesíti” a szuperoxid gyökaniont ($O_2^{\cdot-}$) azáltal, hogy ezt a szabad gyököt oxigénné (O_2) és hidrogén-peroxiddá (H_2O_2) alakítja. Ezzel megakadályozza a reaktívabb hidroxilgyök ($OH\cdot$) [4], valamint a peroxinitrit ($ONOO^-$) képződését és az ezekből következő további károsodásokat [5]. Ennek a képességnek köszönhetően a SOD jelentős figyelmet kapott a terápiás felhasználás terén is. A SOD-okat széles körben kutatják és használják gyulladáscsökkentő, daganatellenes, sugárvédelmi kezelésekben [6,7]. A szuperoxid-dizmutáz enzimeket úgy osztályozzák, hogy melyik $M^{(n+1)n+}$ fémion vesz részt közvetlenül a redoxi-folyamatban ((1) és (2) egyenletek) [8].



, ahol M lehet Cu ($n = 1$), Mn ($n = 2$), Fe ($n = 2$) vagy Ni ($n = 2$).

A Ni-tartalmú enzimet (NiSOD) a *Streptomyces* törzsben [9,10] és a cianobaktériumok citoszoljában fedezték fel, de megtalálható a zöld algában is. A Fe-tartalmú enzim (FeSOD) a baktériumokban, a növények kloroplasztizában,

valamint még néhány primitív eukarióta élőlényben fordul elő. A Mn-tartalmú enzimet (MnSOD) először az *E. coli* citoszoljában azonosították, és a prokariótákban is itt van jelen. Az eukariótákban – például az emberi sejtekben – jellemzően a mitokondriális mátrixban található meg [11]. Emellett bizonyos növényi sejtek kloroplasztiszaiban is előfordul. A CuZnSOD a baktériumok periplazmájában, a növények kloroplasztiszaiban és a peroxiszómaiban található meg, az eukarióta sejtekben elsősorban a citoszolban, de jelen van a mitokondriális intermembrán térben és a sejtmagban is. [11]

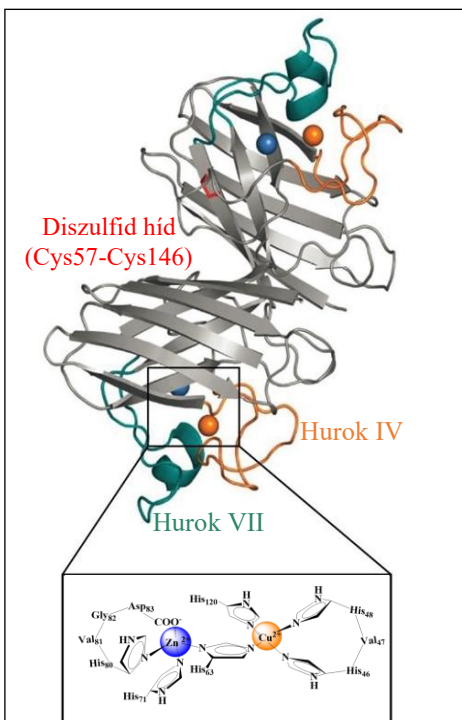
Szerkezetüket tekintve a MnSOD és a FeSOD enzimek hasonlóságot mutatnak, mert mindkét fémion körül kialakul egy trigonális bipiramisos elrendeződés. Az ekvatoriális síkban a fémionok két hisztidin imidazolnitrogénhez és egy aszparaginsav oldalláncához koordinálódnak, valamint axiálisan kötődik a harmadik hisztidin imidazolnitrogén és egy oldószermolekula [12-14]. A NiSOD enzimben a nikkel(II)ion a hat aminosavból álló N-terminális részhez (HisCysXaaYaaProCys) – a NiSOD aktív helyét jelentő hurok kialakításával – koordinálódik. A fémion a peptidváz első amidnitrogénjéhez és a két cisztein oldallánc tiolátcsoportjához kötődik tetragonális elrendeződést kialakítva [15]. A legfejlettebb biológiai szervezetekben előforduló és a legtöbbet kutatott CuZnSOD enzim szerkezetéről, működéséről a következő fejezetben olvashatunk.

2.1.1. A CuZnSOD enzim

A CuZnSOD enzim története 1969-ben kezdődik McCord és Fridovich mérőldkönek számító tanulmányával, akik szarvasmarha vörösvérsejtből mutatták ki a réztartalmú szuperoxid-dizmutáz enzimet [16]. Röviddel ezután a réz mellett cink jelenlétét is leírták [17], majd közel 10 évvel később, 1982-ben megoldották a szarvasmarha vörösvérsejtből kinyert CuZnSOD enzim teljes háromdimenziós kristályszerkezetét [18]. Ezek után fellendült a kutatás és

azonosították 1987-ben emberekben [19], majd emlősökben [20,21], sok növényben [22], a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgombában [23,24], a *Photobacterium leiognathi* baktériumban [25] és még számos más Gram-negatív baktérium periplazmájában [26,27].

A CuZnSOD két alegységből álló 32 kDa-os és 153 aminosavat tartalmazó úgynevezett homodimer enzim. Az enzim szerkezete az 1. ábrán [28] és a szekvenciája a 2. ábrán látható [18,29,30]. Mindkét alegysége egy Cu(II)- és egy Zn(II)-kötőhelyet tartalmaz. A két fémion 620 pm távolságra van egymástól. Szerkezetét tekintve alegységenként egy β -hordóból és két (IV és VI) hurokból áll.



1. ábra: A CuZnSOD enzim röntgendiffrakciós képe (fent) [28] és aktív centrumának szerkezeti képlete (lent)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
A	T	K	A	V	C	V	L	K	G	D	G	P	V	Q	G	I	I	N	F	E	Q	K	E	S	N
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
G	P	V	K	V	W	G	S	I	K	G	L	T	E	G	L	H	G	F	H	V	H	E	F	G	D
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
N	T	A	G	C	T	S	A	G	P	H	F	N	P	L	S	R	K	H	G	G	P	K	D	E	E
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
R	H	V	G	D	L	G	N	V	T	A	D	K	D	G	V	A	D	V	S	I	E	D	S	V	I
105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
S	L	S	G	D	H	C	I	I	G	R	T	L	V	V	H	E	K	A	D	D	L	G	K	G	G
131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153			
N	E	E	S	T	K	T	G	N	A	G	S	R	L	A	C	G	V	I	G	I	A	Q			

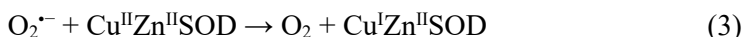
2. ábra: A CuZnSOD enzim aminosavszekvenciája, ahol a – β -redő, – turn és – α -hélix szerkezeti elemek, míg – réz(II)ionhoz, – cink(II)ionhoz és – mindkét fémionhoz kötődő aminosavak

A β -hordó 8 szálú 7 hurokkal összekötött antiparallel elrendeződésű β -redőt tartalmaz. A hurok IV. részében található a fehérjelánc 49-83 és a hurok VI-ban a 121-142 közötti szekvencia részlete. A IV-es hurokban a Zn(II)-ion megkötéséért felelős – His63, His71, His80, Asp83 –, valamint a diszulfidkötésben résztvevő Cys57 oldalláncok vannak jelen. A VII-es hurok egy úgynevezett elektrosztatikus hurok, mert a benne található oldalláncok egy pozitív elektrosztatikus teret hoznak létre, amellyel elősegítik a szuperoxid gyökanion kötődését és a Cu(II)-ionhoz való eljutását [31,32]. A Cu(II)-ion megkötéséért felelős oldalláncok (His46, His48, His120), illetve a His48-hoz és Gly61-hez hidrogénkötéssel kötődő – a katalitikus aktivitáshoz elengedhetetlen – Arg143 [33] aminosavak egy β -redőben foglalnak helyet. A Cys57-en kívül a diszulfidhíd kialakításában még a Cys146 vesz részt. Ugyanakkor a szekvenciában található további két cisztein (Cys6, Cys111) tiolcsoportja érzékeny az oxidációra, mert diszulfidhíd nem alakul ki közöttük [34].

A két alegységet hidrofób kölcsönhatások tartják össze és egymással ellentétesen helyezkednek el. A fehérje nagy termodinamikai és kinetikai stabilitással rendelkezik, amiért a diszulfidhíd és a fémionok felelősek, illetve ezek által szabályozott a monomer-dimer egyensúlya is [21,35-41]. A rezet Cu(I)-ion formában a CCS nevezetű chaperon fehérje szállítja és adja át az apo-SOD enzimnek [42-44]. Ez a kísérő fehérje három doménből áll és a II-es domén közvetlen kölcsönhatásban van a humán SOD dimerrel [45-49]. A CCS továbbá elősegíti a fémion oxidációját Cu(II)-ionná és eközben alakulhat ki a diszulfidhíd is [44].

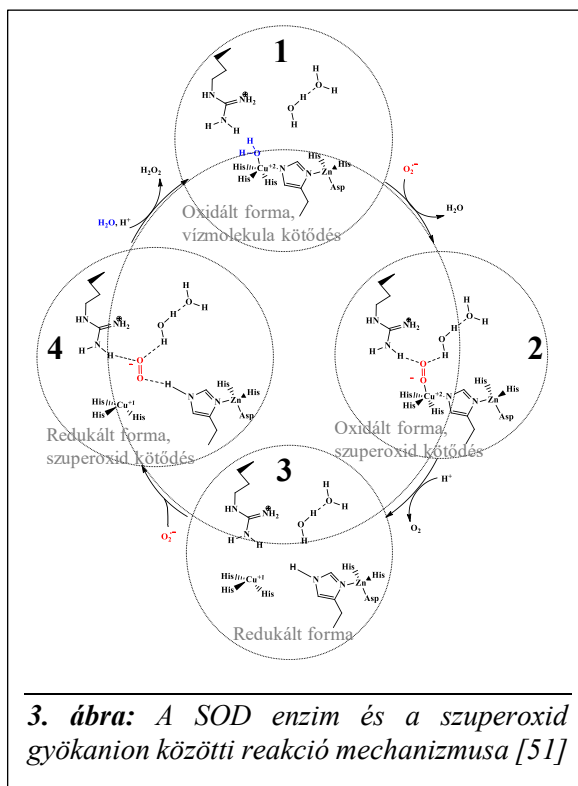
A CuZnSOD legfontosabb része az aktív centrum (1. ábra lent) felelős a szabad szuperoxid gyökanion elbontásáért. Az aktív centrumban három hisztidin (His46, His48, His120) imidazolnitrogén kötődik a Cu(II)-ionhoz, míg a Zn(II)-ion két hisztidin (His71, His80) imidazolnitrogénhez és egy aszparaginsav (Asp83) oldallánchoz koordinálódik [18,30]. Hídligandumként (His63) a két fémiont egy deprotonált imidazolato gyűrű köti össze [50]. Továbbá jelen van még két vízmolekula is a Cu(II)-ion környezetében, illetve a szekvenciában az

aktív helyet hidrogénkötés kialakításával a 143-as pozíciójú arginin stabilizálja. A Cu(II)-ion erősen torzult koordinációs szférája miatt a geometriája átmenetet képez a négyzetes piramis és a trigonális bipiramisos elrendeződés között, míg a Zn(II)-ion tetraéderes szerkezetet vesz fel. A cink(II)ionnak elsősorban szerkezetalakító szerepe van, míg a Cu(II)-ion oxidációs száma az alábbi reakciók ((3) és (4) egyenlet) szerint változik meg a folyamat során:



A reakció (3. ábra) [51] első lépéseként a Cu(II)-ion koordinációs szférájában axiális helyzetben lévő vízmolekulát a $\text{O}_2^{\cdot-}$ kiszorítja és az egyik oxigénje a Cu(II)-ionhoz kötődik, a másik pedig hidrogénkötéssel az Arg143-hoz. Ez a folyamat váltja ki azt a hatást, hogy a réz(II)ion redukálódik réz(I)ionná, miközben a His63 aminosavval kialakított két fémion között jelenlévő imidazolátóhid felbomlik. Ezen folyamat eredményeként megjelenik az első lépés terméke, az O_2 molekula.

Második lépésben megy végbe a következő szabadgyök elbontása, mely során H_2O_2 képződik és a Cu(I)-ion Cu(II)-ionná oxidálódik [30]. Az egyenlet alapján látható, hogy két szuperoxid gyökanion képes a katalitikus ciklus során az enzim átalakítani, miközben változásokon megy keresztül a réz(II)ion geometriája (négyzetes piramis $\rightarrow$ torzult tetraéder $\rightarrow$ négyzetes piramis) [30,52].



3. ábra: A SOD enzim és a szuperoxid gyökanion közötti reakció mechanizmusa [51]

2.1.2. A CuZnSOD enzim lehetséges modelljei

A CuZnSOD enzimmel történő kutatásokat két fő területre oszthatjuk. Az első nagy területen belül, magát a fehérjét vizsgálták és alkalmazzák a különböző terápiás kezelésekben, azonban van néhány hátránya ennek a felhasználásnak, mint például a nagy molekulatömeg és a gyenge szöveti permeabilitás [53]. Ezért szükség van olyan kis molekulatömegű vegyületek szintetizálására, amelyek képesek utánozni a CuZnSOD enzimet mind funkcionálisan, mind szerkezetileg is. Ezért az elmúlt évtizedek során az enzim modellezésére több kutatócsoport megannyi erőforrás felhasználásával rengeteg kutatási eredményt közölt. A kutatások egyik csoportját azok a ligandumok jelentik, amelyek modellezni próbálják az enzim szerkezetét és működését, valamint a fémionok körüli geometria megteremtésére törekednek. Az előállított komplexek között megtalálhatóak ciklopeptidek Cu(II)-komplexei [54,55], Schiff-bázis ligandumok [56-62] és egyes ligandumú komplexek [63,64].

A vizsgálatok egyik típusát jelentik azok a rendszerek, melyekben a két fémiont összekötő imidazolra helyezték a hangsúlyt, és az enzim működési pH-tartományában ez a hídszerkezet stabilis. Ezekben a komplexekben a ligandum például poliamin [65], dipeptid [66] vagy makrociklusos vegyület [67-72] volt.

Makrociklusos ligandumok Cu(II)-komplexeinek vizsgálatai azt mutatták, hogy a kialakuló komplexek hatékony SOD modellek lehetnek [73-79]. Egy dinukleáris makrociklusos ligandum Cu(II)-komplexeinek vizsgálata azt mutatta, hogy a natív enzimben is megjelenő torzult tetragonális-piramisos geometria jön létre a fémion körül és a kialakuló imidazolátohid a natív enzimet jellemző pH-tartományban bomlik fel [80]. Később egy másik kutatócsoport, akik szintén imidazolátohid kialakítására képes makrociklusos ligandumot állítottak elő, azt a megállapítást tették, hogy az a komplex hatékonyabb SOD modell, amelyik tartalmaz egy Cu(II)-, és egy Zn(II)-iont, továbbá a jelentős aktivitás a ligandum flexibilitásával magyarázható [81].

Két Cu(II)-iont tartalmazó homodinukleáris [82], valamint a Cu(II)-, és Zn(II)-iont egyaránt tartalmazó heterodinukleáris – az összekötő imidazolgyűrűt tartalmazó – ligandumok vizsgálata során is hasonló következtetésekre jutottak [65,83-90]. A homodinukleáris komplexek vizsgálata alapján, azok a komplexek mutatnak jelentős aktivitást, melyekben a fémion körül torzult szerkezet alakul ki [91,92]. A heterodinukleáris komplexek vizsgálata információt szolgáltatott a Zn(II)-ion szerepéről. Később S. Nedd és munkatársai is kimutatták, hogy az enzim cinkkötőhelyéről a Zn(II)-ion eltávolítása csökkenti a katalitikus aktivitást, mivel a szuperoxid gyökánionnak a rézionokhoz való megfelelő koordinációja és a katalízishez szükséges redukciós potenciál csak Zn(II)-ion jelenlétében érhető el [93]. Emellett vizsgáltak olyan dinukleáris ligandumokat, amelyekben Ni(II)-ionnal helyettesítették a Zn(II)-iont, valamint a Cu(II)-iont. L.-J. Ming és J. S. Valentine kutatásukban azt írják, hogy bár a Zn(II)-ion alapvetően hozzájárul a katalízishez, de a Ni(II)-ionnal való helyettesítés csak kis változásokat eredményez az enzim szerkezetében és a katalitikus aktivitásban is, azaz a CuNiSOD analógok hasonló aktivitással rendelkeznek, mint a natív CuZnSOD enzim. Ezenkívül megállapították, hogy a Ni(II)-ion a Cu(II)-iont is tudja helyettesíteni a NiZnSOD rendszer részeként [94].

Vizsgáltak olyan kétmagvú komplexeket is, amelyek bipiridilt vagy fenantrolint tartalmaztak ligandumként [95]. Bár ezek a vegyületek a makrociklusos ligandumokat tartalmazó komplexekre jellemző aktivitás értékeket nem érték el, ennek ellenére a heterodinukleáris komplexek a két Cu(II)-iont tartalmazó homodinukleáris komplexek értékétől nagyobb SOD aktivitást mutattak. A komplexekben kialakult 8,5-10-es pH-tartományban a stabilis imidazolátóhid. Az R. N. Patel és munkatársai által végzett kutatások is azt mutatták, hogy a fémcentrum körül kialakuló geometria változásával összefügg a komplex SOD aktivitása. De attól is függ, hogy sztérikusan mennyire gátolt a szuperoxid anion ligandumhoz való kapcsolódása. Ezt a kötődést pedig befolyásolja, hogy milyen gyorsan tud az axiálisan koordinált oldószer molekulával cserélni a ligandum.

Piridingyűrűket tartalmazó ligandumok Cu(II)-komplexeinek vizsgálatai figyelemre méltó SOD aktivitás értékeket mutattak [96,97]. Megfigyelték, hogy a négyes koordinációs számú komplexektől az ötös koordinációjúak aktívabbak voltak, tehát a SOD aktivitásra kedvező hatása a réz(II)ion körül kialakuló torzult geometria [96]. Egy másik tanulmányban megállapították, hogy a nagy hatékonyságú SOD aktivitás nagy komplex stabilitással jár együtt, amelyet a fémion körüli geometria fenntartása mellett a piridinvázhoz kapcsolt különböző típusú szubsztituensek módosításával tudtak elérni [98].

A SOD enzimet szerkezetileg utánzó komplexek sorát folytathatnánk a fémionhoz négy nitrogénen keresztül koordinálódó szalicilátot tartalmazó ligandumokkal [99-101], vagy akár a nanoenzimek vizsgálataival is [102], hiszen ezek között is találunk kimutatható mértékű SOD aktivitással rendelkező vegyületeket. Ugyanakkor a kutatások egy másik irányzata és a dolgozat alapja is az enzim aktív centrumában található fehérjelánc modellezésére szolgáló, a SOD enzimet funkcionálisan és szerkezetileg is utánozni képes hisztidintartalmú (oligo)peptidek előállítására és koordinációs kémiai jellemzése, ezért a továbbiakban ezek alaposabb bemutatásával foglalkozom.

2.1.3. A Cu(II)-komplexek SOD aktivitásának vizsgálata

A Cu(II)-komplexek SOD aktivitásának meghatározására többféle módszer is létezik, melyekről a kísérleti körülmények részben írok részletekbe menően. A fellelhető kutatásokban számtalan Cu(II)-iont tartalmazó komplex SOD aktivitását adták meg, melyek között előfordultak funkcionális modellek és olyan réz(II)komplexek is, amelyek az enzim aktív centrumának kötésviszonyait modellezték. A vizsgálatok összességében azt mutatták, hogy sok tényezőtől függ a SOD modellek aktivitása. Megállapítható, hogy az határozza meg egy komplex SOD aktivitását, hogy mennyire gyorsan axiálisan a fémcentrumhoz kötődő ligandum cseréje és hogy a reakciócentrumba a szuperoxid gyökáion bekötődése sztérikusan mennyire gátolt [64,103,104]. Megfigyelték azt is, hogy nagyobb

SOD aktivitás mérhető, ha nitrogén-donoratomot tartalmazó gyűrűs vegyület (pl: imidazol, piridin) foglalja el a réz(II)ion valamelyik koordinációs helyét és a keletkező komplex torzult geometriát mutat [105], de mindezek mellett flexibilis a fémiont körülvevő koordinációs környezet [106,107]. Azonban erős ligandumtér esetén csökken a SOD aktivitás [108,109].

Mivel a SOD aktivitás meghatározásához foszfát pufferre van szükség, ezért indokolt volt a Cu(II)-PO_4^{3-} rendszer aktivitásának mérése. Bebizonyosodott, hogy a CuHPO_4 is mutat bizonyos mértékű SOD aktivitást ($\text{IC}_{50} = 1,06 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$) [106].

Az előző fejezetben láthattuk, hogy több a SOD enzim aktív centrumára szerkezetileg hasonlító különböző típusú ligandum Cu(II) -komplexénél érték el jelentős aktivitást. Mindezen vizsgálatok mellett mindkét végükön, azaz N- és C-terminálisan is védett, illetve nem védett (N- és/vagy C-terminálisban nem tartalmaznak védőcsoportot) oligopeptidek SOD aktivitását is tanulmányozták, köztük a kutatócsoportunkban is végeztek ezirányú vizsgálatokat. Többek között elemezték bisz(imidazolil)-származékok, prion modellpeptidek, hisztidint tartalmazó és hisztidint nem tartalmazó terminálisan védett és nem védett peptidek SOD aktivitását is.

A bisz(imidazolil)-származékok réz(II)komplexeinek vizsgálata azt mutatta, hogy bár ligandumfelesleg esetén a fémion négy imidazolnitrogénon keresztül kötődik, de az aktivitást befolyásolja a komplexek szerkezete [110]. Megállapították, hogy a SOD aktivitás annál kisebb minél merevebb a szerkezet, hiszen ilyen körülmények között nehezebben megy végbe a redukció, vagyis a Cu(II)/Cu(I) átalakulás. A Cu(II)-His-BIMA 3:2 arányú rendszerben egy imidazolatohidás $[\text{Cu}_3\text{H}_4\text{L}_2]$ összetételű komplexet írtak le a fiziológiás pH-tartományban, melynek aktivitása a többi vizsgált komplexhez képest nagyobbak adódott. Ez megegyezik azzal a korábbi megállapítással, hogy az egymagvúakhoz képest nagyobb aktivitást mutatnak a többmagvú imidazolatohidás komplexek [110].

A prion modell peptidek Cu(II)-komplexeivel végzett vizsgálatok során is tapasztaltak kismértékű SOD aktivitást [111-113].

Terminálisan nem védett glicint, valamint glicint és egy hisztidint tartalmazó di-, tri-, és tetrapeptidek Cu(II)-komplexeinek vizsgálata azt mutatta, hogy a hisztidin jelenléte csökkenti az aktivitást. A tanulmányban azt is leírták, hogy amint növekszik a fémion körül az ekvatoriális sík torzulása, úgy nő a komplex aktivitása [114].

Kettő, valamint több hisztidint tartalmazó terminálisan nem védett és védett peptidek réz(II)komplexeinek tanulmányozásával is foglalkoztak [115-117]. Azt a megállapítást tették, hogy az N- és C-terminusán védett származékok Cu(II)-komplexei a szuperoxid gyökianiont hatékonyabban bontják. Ezt azzal indokolták, hogy ezekben a rendszerekben kisebb stabilitású komplex alakul ki, valamint a fémion körüli szabad koordinációs helyre be tud kötődni a szuperoxid gyökianion. Továbbá azt is leírták, hogy kisebb aktivitás mérhető, ha az imidazolnitrogénen kívül a deprotonálódott amidnitrogén is részt vesz a fémion koordinálásában. Ennek az az oka, hogy az imidazolnitrogén koordinálta komplexekhez képest az amidnitrogének részvételével kialakuló komplexben az ekvatoriális térerősség nagyobb [115,116,118].

Kutatócsoportunkban a több hisztidint tartalmazó, vagy másnéven multihisztidin peptidek Cu(II)-komplexeire végzett SOD aktivitás mérések is megegyeznek a többi kutatócsoport eredményeivel. Összességében elmondható, hogy azok a komplexek bizonyultak ígéretes SOD modellnek, melyeknél több imidazolnitrogén vesz részt a Cu(II)-ion megkötésében. Ugyanakkor, ha belép a koordinációs szférába az amidnitrogén, vagy ha a szabad Cu(II)-ionok mennyisége megnő a pH csökkenésével a SOD aktivitás értéke is csökken [119]. Valamennyi komplex közül legnagyobb SOD aktivitás értéket az Ac-HAAHGH-NH₂ és az Ac-(HisSar)₃His-NH₂ peptidek [CuL] összetételű komplexe mutatott [120].

2.2. Réz(II)komplexek redoxi sajátosságai

A Cu,Zn-szuperoxid-dizmutáz enzim működése során a Cu(II)-ionok oxidációs állapota megváltozik. Ha átfogó képet akarunk kapni azon komplexekről, melyek modellezik az enzimet, érdemes megvizsgálnunk az őket jellemző redoxipotenciál értékeket. Az alábbi redoxipotenciál értékekkel jellemezhetők a Cu(II)-ionok vizes közegben végbemenő elektronátmenettel járó átalakulásai [121]:



A különböző rézkomplexek képződésének hatására ezen értékek megváltoznak. Általánosan igaz az, hogy a Cu(II)/Cu(I) rendszer redoxipotenciál értékeit számottevő mértékben megváltoztatja a kialakult rézkomplexek koordinációs módja. A Cu(II)-iont tartalmazó komplexekben – a fémion leggyakoribb koordinációs száma a 4, 5 és 6 – többnyire a tetragonálisan torzult, pszeudo-oktaéderes elrendeződés valósul meg. A Cu(I)-iont tartalmazó komplexekre viszont a lineáris, síkháromszöges vagy tetraéderes geometria a jellemző a koordinációs szám értékétől függően [122]. Ciklikus voltammetriás mérések alatt, egy sztereokémiai átrendeződés megy végbe az oldatban, ugyanis első lépésben Cu(I)-ionná redukálódik a komplexben kötött Cu(II) fémion, majd második lépésben ismét +2-es lesz az oxidációs állapota. Ennek köszönhetően jobbra kvázireverzibilis redoxi folyamat játszódik le, ugyanakkor a katódos, valamint az anódos csúcsok elkülönülése nagyobb, mint ami az egyelektronos redoxi folyamatokat jellemzi.

A 2.1.3. fejezetben láthattuk, hogy számos ligandum Cu(II)-komplexének SOD aktivitását vizsgálták, mindemellett a kialakuló részecskék redoxi sajátosságait is tanulmányozták. A vizes oldatokban mért értékeket tartalmazza néhány ligandum esetén az 1. táblázat. A táblázatból látható, hogy a kapott redoxipotenciál értékek széles tartományban helyezkednek el.

Összességében elmondható, hogy aromás nitrogénen keresztül kötődő egyszerű ligandumok réz(II)komplexeit pozitív érték jellemzi, ami a fémion könnyebb redukálhatóságára utalhat. Azokat a peptid-komplexeiket is ez jellemzi, melyekben az oldalláncbéli imidazolhoz kötődik a fémion (ciklo(GH)₄, ciklo(GHG)₂). Ugyanakkor amennyiben a fémion kötődésében részt vesz a molekulában található terminális aminocsoport vagy az oldalláncbéli karboxiláts csoport is (ciklo(L-aszpartil-L-aszpartil)-bisz-hisztamin, ciklo(L-glutamil-L-glutamil)-bisz-hisztamin) csökken a redoxipotenciál értéke. Ezenkívül jelentősen csökken a redoxipotenciál értéke, ha a Cu(II)-peptid komplexekben az amidnitrogének koordinálódása is megtörténik [129].

1. táblázat: A különböző ligandumok Cu(II)-komplexeinek redoxipotenciál értékei (NHE = normál hidrogén elektród, SCE = telített kalomel elektród)

Ligandum	redoxipotenciál érték (V)	vonatkozási elektród
Schiff-bázis komplexek [123]	–1,015 - (–0,875)	SCE
Makrociklusos ligandumok [124-127]	–0,850 - (–0,440)	SCE
Hisztidin, piridin, imidazol [128]	–0,170; 0,240; 0,317	NHE
ciklo(GH) ₄ , ciklo(GHG) ₂ [129]	0,195; 0,219	NHE
ciklo(L-aszpartil-L-aszpartil)-bisz-hisztamin, ciklo(L-glutamil-L-glutamil)-bisz-hisztamin [55]	–0,030; 0,100	SCE
GH, GHG, GHK, GGH [130,131]	–0,220 - (–0,120)	SCE
Ac-HGGG-NH ₂ [132] Ac-(PHGGGWGQ) _n -NH ₂ ahol n = 1, 2, 4 [132,127]	–0,299 - (–0,270) –0,530 - (–0,299)	NHE
N-Ac-His; N-Ac-Hm [119]	0,338; 0,293	NHE
bisz(imidazolil)-származékok [110]	0,055 - (–0,117)	NHE
Ac-HXH-NHMe, Ac-HXXH-NH ₂ , Ac-HHGH-NHMe, Ac-HHVGd-NH ₂ , Ac-HXHZH-NH ₂ , Ac-HXXHZH-NH ₂ , Ac-HXXXHXH-NH ₂ , Ac-S3H4-NH ₂ ^a [119,120]	0,190 - 0,400	NHE

^a X, Z lehet G: glicin, V: valin, A: alanin, P: prolin, és az S a szarkozint az Me a metilcsoportot jelöli.

2.2.1. Hisztidint tartalmazó peptidok Cu(II)-komplexeinek redoxi sajátosságai

Számos hisztidin tartalmú, védett és nem védett terminális csoportot tartalmazó peptid Cu(II)-komplexének elektrokémiai vizsgálatát végezték el. A szabad terminális aminosocsoporttal rendelkező peptidok esetében többnyire az amidnitrogént tartalmazó komplexeket tanulmányozták. Azt tapasztalták, hogy a jellemző redoxipotenciál értékek a negatív tartományba esnek, tulajdonképpen nehezen megy végbe az amidnitrogén koordinációjú komplexek fémcentrumának redukálása [130-132]. Ennek a negatív redoxipotenciál értéknek az az oka, hogy nem kedvez a Cu(I)-ionnak a koordinációs szférában elhelyezkedő amidnitrogének által okozott ekvatoriális tér erősödés. Néhány ligandum réz(II)komplexeinek vizsgálata során azt figyelték meg, hogy a képződő Cu(I)-komplexek kémiai reakciója miatt az anódos csúcsokra kapott áramerősség kisebb értéket mutat, mint a katódos csúcsoké [133].

A terminálisan védett multihisztidin peptidok $[CuL]$ és $[CuL_2]$ komplexeket képeznek a fiziológiás pH-tartományban, ahol az oldalláncbeli imidazolnitrogénen keresztül koordinálódik a fémion. A részecskék redoxipotenciál értékei a 0,200-0,400 V tartományba esnek. A $[CuL]$ komplexekre mérhető redoxipotenciál értékek jelentősen függenek a hisztidinek helyzetétől és a számától. A koordinálódó imidazolnitrogének számának növekedésével a fémion koordinációs szférája telítettebbé válik, ami stabilisabb szerkezetet okoz, ugyanakkor a redoxipotenciál érték csökken [119].

A vizsgálatok azt mutatták, hogy a komplex stabilitása és a formálpotenciál értékeinek változása között szoros összefüggés van. Minél stabilisabb szerkezettel rendelkezik a komplex, annál nehezebben lehet redukálni, azaz annál negatívabb redoxipotenciál érték jellemzi. Minden esetben egyelektron-átmenettel járó, kvázireverzibilis reakció játszódik le. Ennek ellenére a katódos és anódos csúcsok közötti távolság 0,059 V-nál nagyobb, ami azzal magyarázható, hogy az elektród felületén egy lassú elektrontranszfer folyamat megy végbe [119].

Annak érdekében, hogy a szuperoxid gyökkanion elbontására képes legyen egy komplex, a mért redoxipotenciál értéknek a (8) és (9) egyenlettel megadott két részfolyamatra jellemző (–0,16 V - +0,89 V) potenciáltartományba kell esnie [134]:



A CuZnSOD enzimre jellemző formálpotenciál értéke is beleesik ebbe a tartományba, ami 0,360 V-nak adódott a mérések alapján. A SOD enzimnek azok a Cu(II)-komplexek lehetnek modelljei, amelyekre a kapott redoxipotenciál értékek is ebben a tartományban vannak.

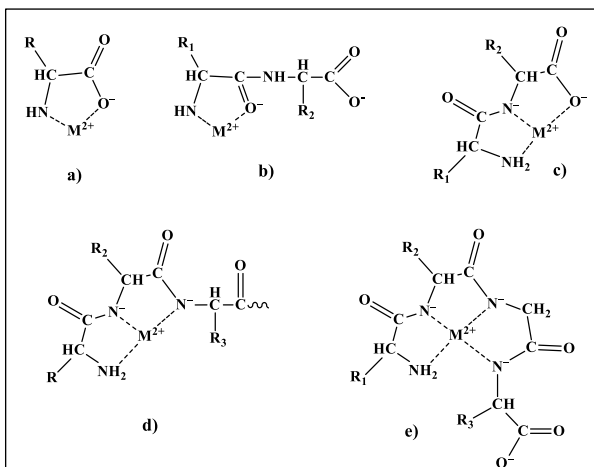
A fentebb említett ligandumok Cu(II)-komplexeire kapott redoxipotenciál értékek a SOD vonatkozásában kedvező tartományban vannak, ami alapján ezek a részecskék potenciális SOD modellek.

Miután megismertük a CuZnSOD enzim aktív centrumának modellezésére akár a későbbiekben alkalmazható komplexek, köztük az oligopeptidek redoxi tulajdonságait, illetve SOD aktivitását és mivel a tézis fő témája a multihisztidin peptidek fémionokkal alkotott rendszereinek oldategyensúlyi vizsgálatai, ezért a következő részben összefoglalom az imidazolil-csoport hatását az egy és több hisztidint tartalmazó peptidek koordinációs kémiai tulajdonságaira.

2.3. Egy- vagy több hisztidint tartalmazó peptidek Cu(II)-, Ni(II)-, Zn(II)-komplexei

Az α -aminosavakból felépülő peptidek egy terminális aminocsoportot és egy terminális karboxilcsoportot tartalmaznak, ezenkívül az oldallánc minőségétől függően egy másik funkciós csoportot. Az oldalláncban koordinálódó donoratomot nem tartalmazó α -aminosavak terminális csoportjai a keláteffektusnak köszönhetően több átmenetifém-ion stabilis megkötésére is képesek öttagú kelátgyűrűt kialakítva, egy úgynevezett aminosavszerű koordinációt létrehozva (4. a) ábra). A két terminális csoport távolsága a

peptidekben megnő, ezáltal egyszerre nem tudnak egyazon stabilis kelátgyűrűben részt venni a fémion megkötésekor. Ebben az esetben a fémion természete határozza meg azt a csoportot, ami az elsődleges kötőhely lesz. Az általunk vizsgált átmenetifémionok a nitrogénatom felé mutatnak nagyobb affinitást, azaz az aminos csoport fog horgonydonorként viselkedni. Ebben az esetben az aminos csoport nitrogénjéhez és az amid-



4. ábra: Az aminosavakkal és peptidekkel képződő fémkomplexek szerkezete: **a)** az aminosavakkal képződő [ML] komplex szerkezete, **b)** a dipeptidekkel képződő [ML] komplex szerkezete, **c)** a dipeptidekkel képződő [MH₋₁L] komplex szerkezete, **d)** az oligopeptidekkel képződő [MH₋₂L] komplex szerkezete, **e)** az oligopeptidekkel képződő [MH₋₃L] komplex szerkezete

csoport oxigénjéhez való koordinációval egy öttagú kelátgyűrű képződik és kialakul a (NH₂, CO) koordinációjú [ML] összetételű komplex (4. b) ábra). Ez azonban az aminosavakkal kialakuló (NH₂, COO⁻) koordinációjú komplexekhez képest kisebb stabilitású komplexeket jelent. Mivel a peptidkötés, vagy más néven az amidkötés révén kelátképző helyzetben további két donoratomot (nitrogén- és oxigénatom) is tartalmaz a molekula, további koordinációs módok valósulhatnak meg. Ahhoz, hogy a peptidkötésben jelenlévő nitrogénatom koordinálódjon az amidcsoport deprotonálódása szükséges, ami szabad ligandum esetén erősen lúgos pH-tartományban (>14) következik be, valamint némely fémion (pl. Cu(II)- és a Ni(II)-ionok) is képes elősegíteni az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját. Ennek következtében (5,5)-tagú kelátgyűrűs [MH₋₁L] összetételű komplex alakul ki dipeptidek esetén (NH₂, N⁻, COO⁻) (4. c) ábra), oligopeptidek esetén (NH₂, N⁻, CO) koordinációs módokkal. Mivel a peptidlánc növekedésével nő az amidcsoportok száma, ezért a pH további emelésével ezek deprotonálódásá-

val és koordinálódásával (5,5)- és (5,5,5)-tagú csatolt kelátrendszer kialakulása mellett $[MH_2L]$ és $[MH_3L]$ összetételű komplexek keletkeznek (4. d) és e) ábra) [135].

Amennyiben az oldalláncban található donorcsoport(ok) a fémion megkötésére képesek, akkor a komplexek szerkezetét és stabilitását annak koordinációja befolyásolhatja [136]. A fémionok az élő szervezetben megtalálható legtöbb fehérjéhez (kivéve például a NiSOD, albumin) az aminosavak oldalláncaiban található donorcsoportokon keresztül koordinálódnak. Az oldalláncok minősége szerint nem (alanin, fenilalanin, valin), gyengén vagy erősen koordinálódó oldalláncbeli donorcsoportokat különböztetünk meg. A legerősebb kölcsönhatást a biológiailag nélkülözhetetlen átmeneti fémionokkal a hisztidin és a cisztein aminosavak oldalláncai alakítják ki és ezek az aminosavak biztosítják a fehérjék fémkötőhelyeinek többségét. A hisztidin oldalláncának imidazolgyűrűjében található két nitrogén atom (a „pirrol típusú” (N(1)) és az N(3)) közül legtöbb esetben az N(3) kötődik a fémionhoz, mert ennek következtében nagy stabilitású, kisebb tagszámú kelátgyűrű keletkezik. A cisztein oldalláncában található deprotonálódott tiolcsoport a soft jellegű fémionokhoz koordinál többnyire. Viszont nagyobb jelentősége a fehérjék térbeli szerkezetének kialakításában, vagy stabilizálásában az oxidációja során kialakuló diszulfidhidaknak van. Emellett jelentős szerep jut a gyengén koordinálódó donorcsoportot tartalmazó aminosavak közül az aszparaginsav β -, valamint a glutaminsav γ -karboxil csoportjának kötődésének, de a természetben találunk még példát a lizin ϵ -aminocsoportja, a szerin hidroxilcsoportja, a tirozon fenolos hidroxilcsoportja, a metionin tioétercsoportja, továbbá az aszparagin és a glutamin β - sőt γ -karboxamidcsoportja koordinációjára is.

Meg kell említenünk, hogy a legnagyobb nehézséget a rövidláncú peptidek fémkomplexeinek vizsgálata során a már fiziológiás pH-tartományban bekövetkező amidnitrogének deprotonálódásának és koordinációjának megelőzése jelenti a Cu(II)- és Ni(II)-komplexekben. A Zn(II)-komplexekben a deprotonálódott amidnitrogén koordinációja ritkán fordul elő, az elsődlegesen

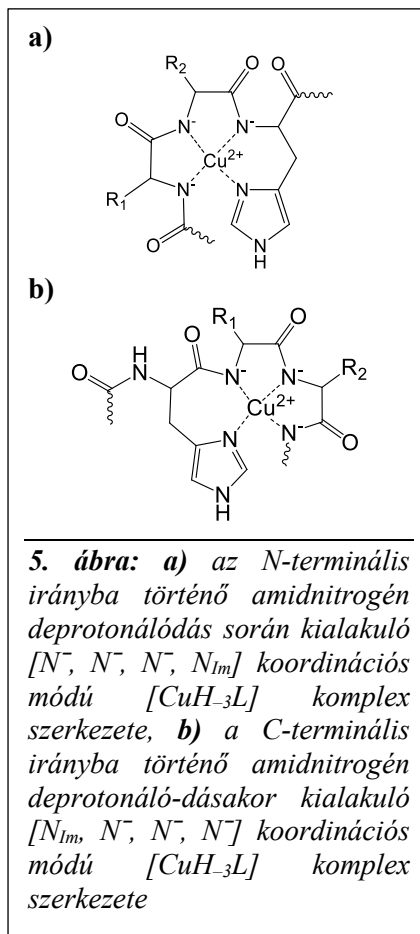
megvalósítandó cél az oldatban tartás a semleges és az enyhén lúgos pH-tartományokban. Egy lehetséges megoldás az amidnitrogén koordináció elkerülésére a megfelelően kiválasztott peptidszekvencia, melyekben az oldalláncokon keresztül jön létre a koordináció. A multihisztidin peptidek, ahol a hisztidinegységek egymáshoz közel helyezkednek el, ígéretes eredményeket mutatnak. Egy másik lehetséges alternatíva a prolin szekvenciába történő beépítése. A prolin egy gyűrűs oldalláncot (egy szekunder ament) tartalmazó aminosav. A láncközi szekvenciába történő beépítése úgynevezett „lánctörő” szerepet tölt be, mivel a kialakuló peptidkötés nem tartalmaz hidrogént, ezáltal a fémion(ok)ra cserélhető deprotonálódásra képes amidnitrogének sora megtörik a peptidláncban. Ami azt jelenti, hogy az egymás után bekövetkező amidnitrogének deprotonálódása során kialakuló 5- vagy 6-tagú kelátgyűrűk kialakulása nem tud teljesülni. Mindemellett a prolin jelenléte a peptidszekvencia konformációjának változtatásával is jár, mellyel a makrokelátok kialakulása kedvezményezetté válik.

Habár számos kutatócsoport évtizedek óta nagyszámú összefoglalót és tanulmányt közölt [135, 137-142], de a kezdeti tendencia azt mutatja, hogy nem törekedtek a biomolekulákkal való maximális megfelelés megvalósítására. Többségében szabad N-terminális aminocsoportot tartalmazó peptideket vizsgáltak, ami a legtöbb esetben fontos szerepet játszik a fémionok megkötésében. Ugyanakkor a fehérjék láncközi kötőhelyeinek valódi modelljei az N- és C-terminálisan is védett (oligo)peptidek. Emiatt az utóbbi években ezen molekulák is a kutatások központi témájává váltak. Mivel munkánk egyik célja a CuZnSOD fehérje fémkötőhelyeit modellező hisztidint tartalmazó oligopeptidek vizsgálata, ezért a következő részben a mindkét végükön védett hisztidintartalmú peptidek fémkomplexei koordinációs kémiai viselkedését részletezem.

2.3.1. Hisztidint tartalmazó terminálisan védett peptidek jellemzése

Említettem korábban, hogy a fehérjék és metalloproteinek fémion-megkötésében az egyik legfontosabb donorcsoport a hisztidin imidazolil-csoportja, emiatt Cu(II)- és Ni(II)-komplexeit már részletesen tanulmányozták és ezen információkból több összefoglaló tanulmány is született [135,137,138,141,143,144]. Ezekből megállapítható, hogy a peptidszekvenciában jelenlévő imidazolil-csoport a komplexképződési folyamatok sokszínűségét eredményezi, illetve a keletkező fémiont tartalmazó komplexek megnövekedett termodinamikai stabilitásában mutatkozik meg. Mindezek mellett megállapítható, hogy számos paraméter befolyásolja a komplexképződést, ilyen például a fémion jellege, a fémion-ligandum arány, a

szekvenciában található hisztidinek száma, valamint a koordinációt befolyásoló egyéb oldalláncokhoz viszonyított helyzete, ezen oldalláncok minősége, továbbá a terminális funkciós csoportok védettsége.



2.3.1.1. Egy hisztidint tartalmazó terminálisan védett peptidek jellemzése

A terminális aminos csoport hiánya következtében az egy hisztidint tartalmazó védett C- és N-terminussal rendelkező peptidkomplexekben a horgonydonor szerepét a hisztidin imidazolnitrogén (N_{Im}) egyedül tölti be. Enyhén savas, valamint semleges oldatban a fémion az oldalláncok donorcsoportjain keresztül

kötődik, miközben makrokelát szerkezetű komplexek keletkeznek. A pH emelésével az amidnitrogének részvételével 6- és 7-tagú kelátgyűrűk alakulhatnak ki a fémion körül (Cu(II), Ni(II)). A peptidek szekvenciájától függően ezen amidnitrogének deprotonálódása az N-, illetve a C-terminális irányba mehet végbe. Mivel a 7-tagú kelátgyűrűk kisebb termodinamikai stabilitást mutatnak, mint a 6-tagúak, ezért az N-terminális felé történő deprotonálódás kedvezőbb, amelynek hatására egy (5,5,6)-tagú (5.a ábra) nagy stabilitást nyújtó csatolt kelátrendszer jön létre [145]. Ugyanakkor, ha N-terminális helyzetben van a hisztidin (például Ac-HVGD-NH₂ [118]) vagy a szekvenciában egy disszociábilis protonnal nem rendelkező amidnitrogént tartalmazó aminosav előzi meg (például prolin [146,147] vagy szarkozin [148]), akkor az amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja a C-terminális irányban valósul meg és (7,5,5)-tagú (5.b ábra) csatolt kelátgyűrűs rendszer képződik. Ezeket az ismereteket az alábbiakban néhány példán keresztül mutatom be.

A Cu(II)-Ac-HVGD-NH₂ rendszer esetén a peptid imidazolnitrogén donoratomja az elsődleges fémkötőhely az enyhén savas oldatban képződő [CuL] összetételű komplexben. Ezen komplex stabilitása nagyobb, mint az egyszerű imidazolcsoportot tartalmazó peptidek megegyező összetételű komplexei [149], ami az aszparaginsav β -karboxilátcsoportjának fémionhoz történő koordinációjával magyarázható, amely során egy [N_{lm}, COO⁻] összetételű makrokelát alakul ki. Az oldatban lúgos közegben (pH > 10) [CuH₋₃L] és [CuH₋₄L] részecskék jelennek meg. A [CuH₋₄L] komplexben – (N⁻,N⁻,N⁻,N⁻) kötésmóddal – négy nitrogén donoratom koordinálódik a fémionhoz. Ugyanakkor a [CuH₋₃L] összetételű komplex a spektrális paraméterek alapján akár [3N⁻, COO⁻] vagy [N_{lm}, 2N⁻ + OH⁻] koordinációs módokkal is leírható [118].

A Zn(II)-Ac-HVGD-NH₂ rendszerben a savas közegben képződő [ZnL] összetételű komplexben az imidazolnitrogén mellett az aszparaginsav karboxilátcsoportja is rész vesz a fémion megkötésében. A semleges illetve enyhén lúgos közegben bár kialakul a [ZnH₋₁L] vegyes hidroxido komplex, de

bekövetkezik a fémion hidrolízise, azaz a Zn(II)-ion nem képes előidézni az amidnitrogének deprotonálódását [118].

A Cu(II)-L (L = Ac-PHAAA-NH₂, Ac-AQPHTEI-NH₂) rendszerben a hisztidin imidazolnitrogénje tölti be a horgonydonor szerepét, amely a réz(II)ionhoz enyhén savas pH-tartományban kötődik. A pH emelésével, a hisztidin előtti prolinnak köszönhetően, az amidnitrogének koordinációjának következtében (7,5,5)-tagú csatolt kelátrendszer képződik [146,147].

2.3.1.2. Több hisztidint tartalmazó terminálisan védett peptidek jellemzése

A több hisztidint tartalmazó peptideket a metalloenzimek [119,120], továbbá egyéb fehérjék [150-152] szerkezetének, valamint katalitikus aktivitásának modelljeként használjuk. Ezek a peptidek optimális körülményeket biztosítanak makrokelátgyűrűk képződésére, melynek termodinamikai stabilitását meghatározza a peptidlánc hossza, valamint a hisztidinek között lévő távolság.

Az élő szervezetben megtalálható fehérjék vizsgálatai alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a fehérjék és a fémionok között kialakuló kötésviszonyokat a terminálisan mindkét végükön védett multihisztidin peptidek jobban modellezik. Mivel ezekben a peptidekben nincs szabad amino- és karboxilcsoport, hiszen a C- és N-terminális végükön védőcsoporttal vannak ellátva, ebből adódóan a terminálisan nem védett peptidekhez képest megváltozik a komplexkémiailag viselkedésük is. Ezekben a peptidekben a fiziológiai pH-tartományban a növekvő hisztidinek száma elősegíti a makrokelát szerkezetű komplexek kialakulását és bár a növekvő hisztidil oldalláncok számának hatására nő a kialakuló imidazol-koordinációjú komplexek termodinamikai stabilitása, viszont a hisztidinek között lévő távolság növekedésével csökken a képződő makrokelát szerkezetek stabilitása. A legnagyobb stabilitású komplexek azokkal a peptidekkel alakultak ki, amelyekben a hisztidineket egy vagy két aminosav választotta el egymástól (ezek a ligandumok –HXHZH–, valamint –HXXHZH– szekvenciát tartalmaznak). Ennek az a magyarázata, hogy ezekben a

szekvenciákban képes a képződő makrokelát szerkezetű komplex a legnagyobb mértékben eltolni a nagyobb pH irányába az amidnitrogének deprotonálódását [142].

A multihisztidin peptidek komplexképződési folyamatait vizsgálva gyakran tapasztalható koordinációs izomer szerkezetek megjelenése. A keletkező izomer szerkezetek arányát az imidazolil-csoportok száma és helyzete határozza meg, de jelentős befolyással bír a molekula mérete, az oldalláncok hidrofób jellege, valamint a képződő komplex töltése is. S mindezek mellett, mivel a horgonydonor szerepét a szekvenciában jelenlévő valamennyi imidazolnitrogén betöltheti, ezért fémionfelesleg alkalmazása során többmagvú komplexek alakulhatnak ki.

Előzőleg már utaltam rá, hogy a CuZnSOD enzim Cu(II) kötőhelyét modellezhetik a több hisztidint tartalmazó N- és C-terminusban védőcsoportot tartalmazó peptidek, mivel az általuk kialakított $[\text{CuL}]$ és $[\text{CuL}_2]$ összetételű imidazol-koordinációjú komplexek szerkezetükben hasonlítanak az enzim aktív centrumára. Ennek ellenére érdemes vizsgálni az amidnitrogén részvételével létrejövő komplexeket is, mert jó modellként szolgálhatnak. Az enzim aktív centrumának szerkezetét figyelembe véve, azt a megállapítást tehetjük, hogy a Cu-kötőhelyet a HVH tripeptiddel, a Zn-kötőhelyét a HVGD tetrapeptiddel modellezhetjük. Ezen két peptid N-terminusban nem védett és mindkét végükön védett származékait is megvizsgálták [118,153,154]. Összességében azt várhatjuk, hogy a terminálisan védett szekvenciák esetén képződő komplexek szerkezete hasonlít jobban az enzim aktív centrumára, ezért a dolgozatban is csak ezeket mutatom be. Az Ac-HVGD-NH₂ elemzését a 2.3.2.1. fejezetben láthattuk.

Az Ac-HXH-NH₂ szekvenciájú peptidek esetében – ilyen peptid például az Ac-HVH-NH₂ [118] – az imidazol-koordinációjú $[\text{CuL}]$ összetételű makrokelát szerkezetű komplex mindkét hisztidin részvételével alakul ki. A Cu(II)-Ac-HVH-NH₂ ligandumfelesleg tartalmazó oldatában számottevő mennyiségben keletkezik $[\text{CuL}_2]$ összetételű biszkomplex. Ebben a biszkomplexben a spektrális paraméterek alapján a Cu(II)-ion koordinációs

szférájában vélhetően három vagy négy nitrogén donoratom található. Még a fiziológiás pH-n két amidnitrogén átfedő lépésben történő deprotonálódásával $[\text{CuH}_2\text{L}]$ összetételű részecske képződik, melyben (7,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer alakul ki és $[\text{N}_{\text{Im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}]$ koordinációs móddal telítődik a réz(II)ion koordinációs szférája. A pH további növelésével keletkezik a $[\text{CuH}_3\text{L}]$ összetételű komplex, amelyben egy amidnitrogén veszi át a helyét a koordinációs szférából kiszoruló egyik hisztidinnek $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}]$ koordinációs móddal. A folyamatban a kisebb tagszámú, de sokkal kedvezményezettebb (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer képződik. [118]

Az elmúlt évtizedben szisztematikus vizsgálatok folytak, annak felderítésére, hogy a hisztidinek száma és pozíciója miképpen befolyásolja a feltüntetett két kötőhelyet és környezetét, ezért számos olyan több hisztidint tartalmazó peptidet vizsgáltak, amelyekben a hisztidineket egy, kettő vagy több aminosav választja el egymástól.

A két hisztidint tartalmazó peptidekben növelve a hisztidinek közötti aminosavak számát Ac-HXXH-NH_2 szerkezetű ligandumokhoz (például $\text{X} = \text{V}$ [155], A [120]) jutunk. Ezen peptidekben a C-terminális hisztidin a horgonycsoport. A réz(II)ion hatására elkülönült lépésben játszódik le az első amidnitrogén deprotonálódás és megjelenik a $[\text{CuH}_1\text{L}]$ komplex. A pH emelésével a $[\text{CuH}_2\text{L}]$ és $[\text{CuH}_3\text{L}]$ komplexekben a Cu(II)-ion koordinációs szférájában egy imidazolnitrogén mellett két, illetve három amidnitrogén koordinálódik a fémionhoz. Ezeknél a peptideknél is megjelenik a $[\text{CuL}_2]$ összetételű biszkomplex a ligandumfelesleget tartalmazó mintákban.

A hisztidinek számát tovább növelve a szekvenciában jutunk el olyan peptidekhez, amelyek az Ac-HXHZH-NH_2 [156] általános képlettel jellemezhetők. Ekkor olyan $[\text{CuL}]$ összetételű komplex alakul ki, amelyben a három imidazol gyűrű kötődésével képződik a makrokelátot tartalmazó szerkezet, aminek a megjelenése visszaszorítja az amidnitrogének deprotonálódását. A fiziológiás pH-tartományban a meghatározó részecske az $[\text{N}_{\text{Im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}]$ koordinációs módú $[\text{CuH}_2\text{L}]$ komplex. Hasonlóan az előző részben tárgyalt

Ac-HXXH-NH₂ szerkezetű peptidekhez itt is a nagyobb pH-tartományban három amidnitrogén és egy imidazolnitrogén kötődik a központi fémionhoz, [CuH₃L] komplex jön létre [N⁻, N⁻, N⁻, N_{Im}] koordinációs móddal. A fémion felesleget tartalmazó mintákban kialakulnak többmagvú komplexek is. A 7-9 közötti pH-tartományban megjelenik a [Cu₂H₄L] komplex, amiben az egyik fémion a C-terminális végen található, a másik a közbenső hisztidinhez kötődik.

Az Ac-HXXHZH-NH₂ (X = A, G; Z = A, V, G) [120], Ac-HXXHZZH-NH₂ (X = A; Z = V) [155] és az Ac-HXXXXHXXH-NH₂ (X = G [120]) szekvenciájú peptidek esetén hasonlóan az Ac-HXHZH-NH₂ ligandumokhoz a fémion három imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik a [CuL] komplexben. A pH emelésével a láncvégi és a láncközi hisztidinek is horgonycsoportként viselkednek, ennek köszönhetően izomer szerkezetek alakulnak ki az oldatban. Az izomerek aránya bár függ a peptid aminosav szekvenciájától, de általánosan elmondható, hogy a [CuH₂L] komplexben jórészt a C-terminális részhez koordinálódik a fémion, míg a [CuH₃L] komplexben a kedvezőbb kötőhely a közbenső hisztidin. Fémionfelesleg alkalmazásakor itt is képződnek kétmagvú komplexek. Négy amidnitrogén deprotonálódásával [N_{Im}, N⁻, N⁻] + [N_{Im}, N⁻, N⁻, N_{Im}] vegyes koordinációs móddal [Cu₂H₄L] összetételű komplex, míg öt amidnitrogén részvételével [3 N⁻, N_{Im}] + [2 N⁻, N_{Im}] koordinációs módú [Cu₂H₅L] összetétellel jellemezhető komplexek alakulnak ki.

Vizsgáltak hisztidint és szarkozint váltakozva tartalmazó szekvenciájú peptideket – Ac-(HisSar)_nHis-NH₂ (ahol *n* = 1-3) (jelölésük rendre: S1H2, S2H3, S3H4) – is. A szarkozin beépítése a peptidláncba ugyanis nem teszi lehetővé a szarkozin N-terminális részén levő peptidkötések deprotonálódását, ezáltal az oldalláncbéli imidazolcsoportok koordinációja kerül előtérbe. Így az imidazolkoordinációjú makrokelát szerkezetű komplexek stabilitása nagyobb lesz, és szélesebb pH-tartományban (gyengén savas és fiziológiás) vannak jelen, de a hisztidinek számától, illetve azok pozíciójától függően változik a stabilitásuk [148].

Tanulmányozták hasonló szekvenciájú peptidekkel a nikkel(II)ionok komplexképződési jellemzőit is. A semleges pH-tartományban a fő részecske az imidazol oldalláncokon keresztüli koordinációval létrejövő $[\text{NiL}]$ összetételű komplex. A réz(II)komplexekhez hasonlóan változik a hisztidinek száma és pozíciója függvényében a makroelát szerkezetű részecskék stabilitása. Ugyanakkor a Cu(II)-ionoktól eltérően az amidnitrogének deprotonálódása lassabban játszódik le, az enyhén lúgos pH-tartományban kezdődik el és a második (esetenként a harmadik) amidnitrogén deprotonálódása erősen kooperatív módon történik meg. Például a $-\text{HXH}-$ szekvencia esetén az ($\text{N}_{\text{Im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) koordinációs mód a kedvezményezett, a $-\text{HXXH}-$ szekvencia esetén a $[\text{NiH}_3\text{L}]$ komplex képződése nagy pH-n és kooperatív módon az imidazol oldallánc koordinációját követően következik be. [157]

A képződő Zn(II)-komplexek szerkezetére és összetételére a hisztidin egységek száma nincs olyan nagy hatással, mint amit a réz(II)ion esetén tapasztaltak. Ennek legfőbb magyarázata, hogy a cink(II)ion kisebb mértékű affinitást mutat az amidnitrogénhez. A terminálisan védett peptideknél néhány kivételtől eltekintve semleges/lúgos pH-tartományban csapadék képződik, hiszen a kis stabilitású Zn(II)- N_{Im} kötésű komplexek nem képesek felvenni a versenyt a cink hidrolízisével. Az 1:1 arányú Zn(II)-Ac-HVH-NH₂ rendszerben pH ~ 5 felett csapadékképződés volt tapasztalható, ezért nem tudtak stabilitási állandókat meghatározni [154]. A Zn(II)-Ac-HXXH-NH₂, vagy a Zn(II)-Ac-HXXHYYH-NH₂ rendszereknél a kialakuló kis termodinamikai stabilitással rendelkező $[2\text{N}_{\text{Im}}]$, valamint $[3\text{N}_{\text{Im}}]$ típusú koordinációs módú $[\text{ZnL}]$ komplexek sem képesek lúgos körülmények között oldatban tartani a Zn(II)-ionokat. [155]

A komplexképzési folyamatra a hisztidinek melletti egyéb koordinálódó donorcsoportok jelenléte is hatással van, amellyel a következő fejezetben foglalkozom részletesen.

2.3.2. Oldalláncban különböző csoportot tartalmazó terminálisan védett multihisztidin peptidek jellemzése

A fehérjék, köztük a CuZnSOD enzim, aktív centrumában található fémkötőhelyek környezetében nemcsak hisztidin található, hanem egyéb koordinálódó donorcsoportok is. Ezért ebben a fejezetben azt mutatom be a dolgozat további eredményeinek értelmezése végett, hogy az oldalláncban akár a nyílt láncú (alanin, glicin, prolin, valin), a semleges (aszparagin, glutamin), a pozitív (lizin), a negatív töltésű (aszparaginsav, glutaminsav), valamint az aromás (fenilalanin) oldalláncot tartalmazó aminosavak jelenléte milyen szerepet tölthet be a Cu(II)-ionok koordinációjában.

Az Ac-HXH-NH₂ és az Ac-HXHYH-NH₂ (ahol X és Y = G, A, V, P) szekvenciákban a nemkötő oldalláncok (alanin, glicin, prolin, valin) jelenléte és pozíciója a fő részecskék eloszlására és kötésmódjára nincs különösebb hatással [156,157]. Ugyanakkor, ha a fémion számára azon hisztidin a horgonycsoport, mely előtt egy aminosav távolságra glicin helyezkedik el (–GXH–), a glicin aminosav jelenléte a spektrális paraméterek alapján egy sztereokémiai átrendeződést okoz [158]. M. Klewpatinond és munkatársai tanulmánya szerint amennyiben a fémion számára a –GXH– szekvenciárész a fő kötőhely, a CD-spektrumokban a Cotton-effektusok előjele pont az ellentéte a –YXH– szekvenciát tartalmazó peptidek CD-görbéiben megjelenő Cotton-effektusokhoz viszonyítva [158].

Az aszparagin és a glutamin oldalláncok jelenléte a fellelhető irodalom alapján nem okoz nagymértetű változást a fémkomplexek termodinamikai stabilitásában és a kialakuló komplexek szerkezetében. Egy tanulmány szerint az egy glutamin oldalláncot tartalmazó terminálisan nem védett peptidek fémkomplexeiben a fémion-peptid kötésben nem vesz részt a glutamin oldallánca [159]. Ha azonban több glutamin van a szekvenciában a komplexek koordinációs módja bár nem változik, de a kialakuló hidrogénkötéseknek köszönhetően jelentős hatással lehetnek a komplexek stabilitására. Az aszparagin oldalláncok szerepére

ellentmondásos irodalmi eredményeket találhatunk, ugyanakkor a vizsgálatok alapján az aszparagin oldallánc a kialakuló koordinációs módokra és a komplexek stabilitására nincs hatással. [160-162]

A lizin, az aszparaginsav és a glutaminsav oldalláncaikban negatív vagy pozitív töltéssel rendelkező csoportot tartalmaznak és ezáltal a képződő komplexek nettó töltését megváltoztatják, ami befolyásolja azok stabilitását. Az Ac-HAHHK-NH₂ és az Ac-HKHAH-NH₂ peptidek vizsgálatai azt mutatták, hogy a lizin oldalláncának deprotonálódása nem okoz változást a fémion koordinációs környezetében [163]. Ugyanakkor a Cu(II)-ionnal képződő komplexekben az aszparaginsav és a glutaminsav karboxilátcsoportjai képesek megnövelni az imidazolkoordinálta komplexek stabilitását a gyengén savas pH-tartományban [164].

A fenilalanin bár nem vesz részt a fémion koordinációjában, elsősorban szerkezetalkító szerepet játszik, hiszen az oldalláncában található nagy térkitöltésű aromás gyűrű kölcsönhatásba léphet a fémionhoz koordinálódó imidazolgyűrűvel, így stabilizálva a képződő komplexek szerkezetét vagy módosítva a fémion körül kialakuló geometriát, de összességében növelve a komplexek stabilitását.[163]

Munkám egyik célja olyan peptid előállítása volt, mely funkcionálisan és szerkezetileg is képes utánózni a natív CuZnSOD enzim aktív centrumát. A tervezéshez fontos volt ismerni a fent említett oldalláncok hatását a komplexképződésre, valamint figyelembe kellett venni a megfelelő peptidszekvencia tervezésekor, nemcsak az aktív centrumban található aminosav sorrendet, hanem az előállítandó peptid oldhatóságát is. A hisztidin egy semleges, enyhén pozitív töltésű aminosav, ezért több hisztidin jelenléte bár növeli a Cu(II)-ionnal való kölcsönhatás erősségét, azonban ha sok hisztidin van a peptidben, akkor a szekvencia kevésbé lesz poláris, ami csökkentheti az oldhatóságot. Hosszabb láncú peptideknél aggregációhoz vezet, ha a hisztidinek túl közel vannak egymáshoz, illetve a hosszabb peptidek esetén nagyobb a hajlam a másodlagos szerkezeti elemek (α -hélix, β -redő) kialakulására, ami megintcsak

rontja az oldhatóságot [165]. Ennek folyományaként, olyan aminosavakat kellett beépíteni a peptidszekvenciába, melyek segítik a vizes közegben történő vizsgálatainkat és az előállított peptid oldékonyságát növelik. Az aszparaginsav és a glutaminsav negatív töltést hordozó oldallánccal rendelkeznek, azaz ezek az aminosavak növelik a peptid oldhatóságát, mert az elektrosztatikus kölcsönhatások révén jól hidratálódnak. A lizin és az arginin bázikus aminosavak és pozitív töltéssel rendelkeznek, ezek az aminosavak a pozitív töltés révén segíthetik a peptid oldódását. A poláris aminosavak (szerin, treonin, aszparagin) képesek hidrogénkötések kialakítására a vízmolekulákkal, ezáltal segíthetik az oldhatóságot. Ugyanakkor a hidrofób aminosavak (fenilalanin, valin, leucin, izoleucin, triptofán) jelenléte csökkenti az oldhatóságot vizes közegben, tehát ha túl sok ilyen aminosav található a peptidben, akkor csökken az oldhatóság. Mindezekon kívül szem előtt kellett tartani, hogy az acetil védőcsoporttal ellátott N-terminális régió is csökkenti az oldhatóságot.

3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK ÉS ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

3.1. Felhasznált vegyszerek, vizsgált ligandumok

A peptidek szilárdfázisú szintéziséhez szükséges oldószerek, vegyszerek kereskedelmi forgalomból származnak, és további tisztítás nélkül történt a használatuk. A Novabiochem cégtől szereztük be a Rink Amide AM gyantát, a 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-terametilammónium-tetrafluoroborát (TBTU) és az aminosavakat, amelyek védett formában 9-fluorenil-metoxi-karbonil (röviden Fmoc) védőcsoporttal kerülnek forgalomba (Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH (OtBu: 5-terc-butil), Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH (Trt: tritil), Fmoc-Lys(Boc)-OH (Boc: tercbutyloxykarbonil), Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Val-OH). A Sigma Aldrich cégtől származik a 2,2'-(etiléndioxi)dietántiol (DODT), a dietil-éter (Et₂O), az *N*-metil-2-pirrolidon (NMP), az *N*-hidroxi-benzotriazol hidrát (HOBt·H₂O), a 2-metil-bután-2-ol és a triizopropil-szilán (TIS). A Merck Millipore terméke volt a HPLC-tisztaságú, szintetikus célokra használható trifluorecetsav (TFA) és az *N,N*-diizopropil-etilamin (DIPEA). A Molar Chemicals Kft.-től vásároltuk a piperidint, a diklór-metánt (DCM), a dietil-étert (Et₂O), a 96%-os ecetsavat és a folyadékkromatográfiás célokra használható nagy tisztaságú acetonitrilt (ACN). A VWR International cég pedig a szintetikus célokra használható *N,N*-dimetil-formamid (DMF) és az ecetsavanhidrid (Ac₂O) termékeket forgalmazza.

A kutatáshoz használt Ac-SarHAH-NH₂, Ac-HADHAH-NH₂, Ac-FHVVHAGPHFNGGHVGD-NH₂, Ac-FHVHEGPHFN-NH₂ és Ac-FHVHEGPHFNGGHVGD-NH₂ peptideket szilárdfázisú peptid szintézissel a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén állítottam elő. Az Ac-HADH-NH₂, Ac-HDAH-NH₂, Ac-HAHDH-NH₂, Ac-HDHAH-NH₂, Ac-HGFHVH-NH₂, Ac-HDHAHDH-NH₂ peptideket úgyszintén a tanszékünkön Dr. Csire Gizella és több záródolgozatot készítő hallgató szintetizálta.

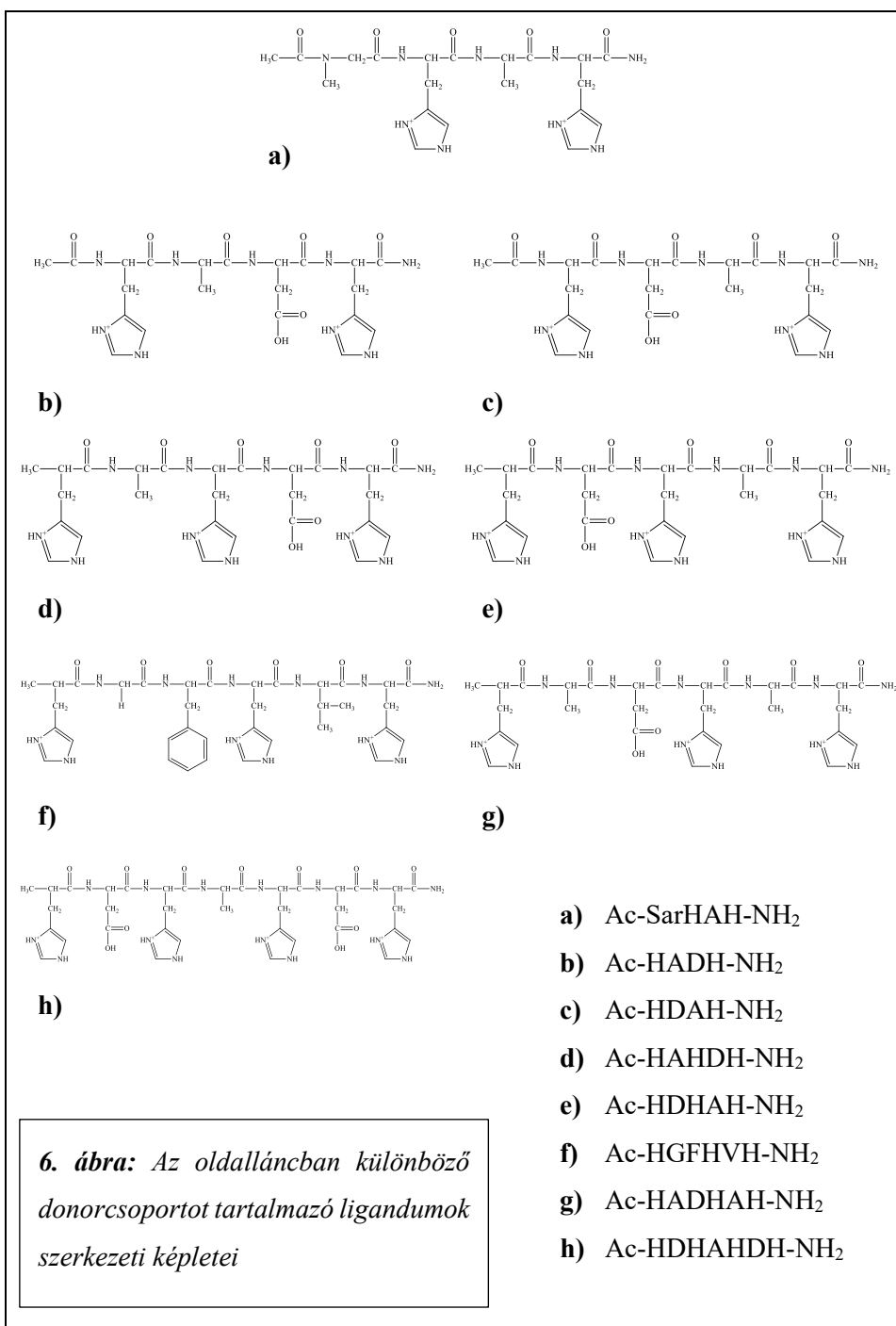
A SOD modellpeptidek dolgozatban használt rövidítéseit az alábbi 2. táblázat tartalmazza. A vizsgált ligandumok képletei a 6. és 7. ábrán szerepelnek.

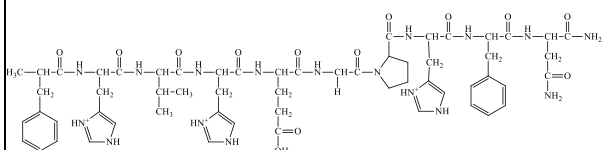
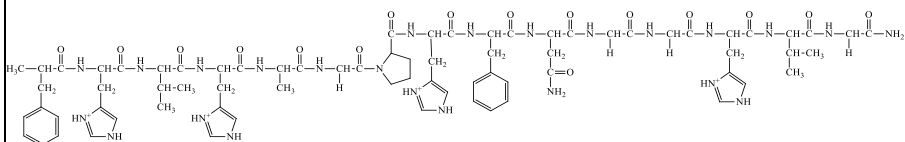
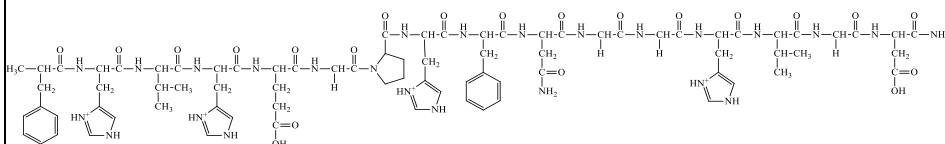
2. táblázat: A SOD modellpeptidek dolgozatban használt rövidítései

Szekvencia	A dolgozatban használt rövidítés
Ac-FHVHEGPHFN-NH ₂	SOD-E5-N10
Ac-FHVHEGPHFNGGHVGD-NH ₂	SOD-E5-D16
Ac-FHVHAGPHFNGGHVG-NH ₂	SOD-A5-G15

A pH-potenciometriás titrálásokhoz használt szilárd KOH-ot a Merck Millipore vállalatától, míg a koncentráció meghatározásához használt kálium-hidrogén-ftalátot a VWR cégtől szereztük be. A minták állandó ionerősségét KNO₃ (Molar Chemicals Kft.) és KCl (Merck) felhasználásával oldottuk meg. A vizsgálatokhoz a CuCl₂, Cu(NO₃)₂, NiCl₂, NiSO₄, ZnCl₂ és Zn(NO₃)₂ törzsoldatok a Reanal Finomvegyszergyár Zrt. a.l.t. minőségű vegyszereiből készültek. A vizsgálatok kivitelezéséhez és az oldatok elkészítéséhez Millipore Water System frissen készített háromszor ioncserélt vizet használtam. A fémoldatok pontos koncentráció meghatározása gravimetriásan oxinát csapadékok formájában, klasszikus komplexometriás titrálásokkal és pH-potenciometriával történtek.

A ¹H-NMR vizsgálatokhoz használt 99,8%-os izotóptisztaságú vegyszereket (D₂O-, DCl- és NaOD-oldatok) az ISOTEC Inc. cég állította elő. A SOD aktivitás mérésekhez a Sigma-Aldrich cégtől rendeltük a nitroblue-tetrazólium-klorid sót (NBT), a xantin és a xantin-oxidáz enzimeket.



Ac-FHVHEGPHFN-NH₂, SOD-5E-10NAc-FHVVHAGPHFNGGHVG-NH₂, SOD-5A-15GAc-FHVHEGPHFNGGHVGD-NH₂, SOD-5E-16D**7. ábra:** A SOD modellpeptidok szerkezeti képletei

3.2. Szilárdfázisú peptidszintézis

Napjainkban a peptidok szintézise az 1962-ben [166] R. B. Merrifield által publikált szilárdfázisú peptidszintézis módszerével történik. Az amerikai professzor által kidolgozott módszert 1984-ben Nobel-díjjal jutalmazták. A Merrifield-féle eljárás alkalmazásakor a peptidok szintézise szilárd fázishoz, úgynevezett gyantához kapcsolva történik. A gyanta (klórmetilezett sztirol-divinil-benzol kopolimer) szemcséinek felületén, valamint belsejében az aminosavak kötődését funkciós csoportok teszik lehetővé. Az aminosavak kötődését ezekhez a csoportokhoz és később a peptidlánc lehasadását a gyanta szerves oldószeres duzzasztása teszi lehetővé. A duzzasztás tehát elengedhetetlen

lépése a peptidszintézisnek. Mivel az aminosavak a gyanta felszínén lévő funkcióscsoportokhoz, majd egymáshoz történő csatolása egy heterogén reakció, emiatt a peptidlánc felépítése során lejátszódó reakciók összessége időben egy lassú szintézist eredményez. Ugyanakkor számtalan előnye miatt egy kedvelt eljárás. Ilyen előnyök például: (i) egyszerű szűréssel a feleslegessé vált reagensek a reakciótérből könnyen eltávolíthatók, (ii) a folyadékfázisban végrehajtott előállítással szemben a hozam javul, mert az egyes aminosavak kapcsolása után a peptid mosása és kicsapása nem szükséges, (iii) könnyedén feldolgozható a kapott termék, (iv) az eljárás a ciklikus ismételhetsége révén automatizálható. [167]

A peptidlánc kiépülése az N-terminális vég irányába a C-terminális vég felől történik. Az első aminosav karboxilcsoportját a gyantához rögzítjük kovalens kötéssel, ezután a láncvégi aminosavhoz kapcsoljuk a további aminosavakat, ezáltal a szintézis teljes ideje alatt a gyantához kötve marad a felépülő peptid. A fenti folyamatok miatt a gyantával szemben több elvárás is megfogalmazódott: (i) az alkalmazott szilárd hordozó jó mechanikai és kémiai ellenállóképességgel rendelkezzen, (ii) ne reagáljon a felhasznált oldószerekkel és reagensekkel, de az épülő peptidlánccal se, (iii) a gyanta és a peptid közötti kovalens kötés az egész folyamat során végig stabil maradjon, viszont könnyen hasítható legyen a szintézis végén, (iv) jól duzzadjon az alkalmazott oldószerekben, hiszen a növekvő peptidláncnak könnyen hozzáférhetőnek kell lennie valamennyi reagens számára, (v) a szintézis sikerét befolyásolja a gyanta szemcsemérete, a szemcse alakja és homogenitása.

A peptidlánc felépítése és a változatos összetételű melléktermékek képződésének elkerülése miatt az aminosavak terminális csoportjai, valamint a oldalláncban található reakcióképes funkcióscsoportok védőcsoporttal vannak ellátva. Ezen védőcsoportoknak a szintézis teljes ideje alatt stabilnak, ugyanakkor a szintézis végén könnyen eltávolíthatónak kell lenniük, amely többféle stratégia révén érhető el [168,169]. Munkánk során a legtöbb aminosavnál úgynevezett ortogonális védőcsoport stratégia, azaz a Fmoc/*t*Bu [170] módszer szerint jártunk el, amely során az α -aminocsoportokon a Fmoc (9-fluorenil-metoxi-karbonil), az

oldalláncokon pedig a *t*Bu (terc-butil csoport) és annak származékai biztosítják a csoportok védelmét. Ezen csoportok eltávolítása eltérő kémiai körülményeket igényel, egyhe bázis (pl.: piperidin) alkalmazásával hasítható a Fmoc védőcsoport, míg savas közegben (pl.: trifluoecetsav tartalmú oldattal) távolíthatók el az oldalláncok védőcsoportjai.

A peptid szintézisét a *Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén* található Liberty 1TM mikrohullámú peptidszintetizáló készülékkel (CEM, Matthews, NC) végeztük automatizált módon *N,N*-dimetil-formamid (DMF) oldószerrel, és az aminosavakat a TBTU/HOBt/DIEA technika segítségével aktiváltuk. A Fmoc/*t*Bu stratégiát alkalmaztuk az N-terminuson acetilezett modellpeptidek előállításához, melyhez Rink Amide AM típusú gyantát használtunk. Ez a gyantatípus egy olyan funkcionált polisztirol mátrixból áll, amely 1% divinil-benzollal térhálósított. A Rink Amide [171] típusú gyantáról történő hasítás következtében a szintetizált peptidek – így a dolgozatban szereplő peptidek – C-terminális végén amid védőcsoport van.

A készülék első lépésben a Fmoc védőcsoport(ok) eltávolítását 20 V/V% piperidint és 0,1 mol/dm³ HOBt·H₂O-t tartalmazó DMF-oldattal végezte 30 W teljesítményű mikrohullámú sugárzás alkalmazásával 80 °C-on 180 másodpercig. A Fmoc védőcsoportok hasítását nyomon követtük a készülékhez kapcsolt UV MONITOR egység (CEM, Matthews, NC) segítségével. Az egység működése azon az elven alapul, hogy a piperidin hatására egy nagy reaktivitású dibenzofulvén köztitermék keletkezik, mely a piperidinnel adduktot képez és ennek a keletkező adduktnak az ultraibolya tartományban 301 nm-en ($\epsilon_{310\text{nm}} = 7800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$) jellegzetes fényelnyelése van, tehát spektrofotometriásan nyomon követhető a védőcsoport eltávolításának sikeressége. Ezt követően az aminosavak csatolása 30 W teljesítményű mikrohullámú sugárzás segítségével 80 °C-on 300 másodperc alatt ment végbe, amelyhez az aminosavakat négyszeres feleslegben (0,2 mol/dm³) alkalmaztuk. A karboxilcsoport(ok) aktiválására az aktivátor (0,5 mol/dm³ HOBt és 0,5 mol/dm³ TBTU DMF-ben oldva), illetve az aktivátor bázis (2,0 mol/dm³ DIPEA NMP-ben

oldva) elegyét használtuk. Ezután a Fmoc védőcsoport eltávolítását és a következő aminosav csatolását ciklikusan ismételve kaptuk meg a tervezett szekvenciájú peptidet. Az előállított peptidet tartalmazó gyantát a szintézis befejező lépésében – a peptidek N-terminális végére kerülő acetil védőcsoport miatt – a készülék az utolsóként kapcsolt aminosavegység Fmoc védőcsoportjának eltávolítása után 6 *V/V%* ecetsav-anhidridet és 5 *V/V%* DIPEA-t tartalmazó DMF-oldat hozzáadásával kezelte. A készülék az egyes reakciók között a reagensek feleslegét DMF hozzáadásával és azt követően szűrővel távolította el.

A szintézis végeztével a gyantához kötött peptideket a további feldolgozás előtt diklórmetán, 96%-os ecetsav, 2-metil-2-butanol és dietil-éter (Et₂O) alkalmazásával mostuk. Ezt követően szobahőmérsékleten végeztük el a peptid gyantáról történő hasítását és az oldalláncbeli védőcsoportok eltávolítását 94,0 *V/V%* TFA, 1,0 *V/V%* DODT, 2,5 *V/V%* TIS, 2,5 *V/V%* H₂O elegyével 2-3 órán keresztül (a peptidlánc hosszától függően). Majd a gyantáról lehasított peptidet szűrővel választottuk el. Az oldatból kicsaptuk a peptidet hideg dietil-éterrel, ezután a felülúszót eltávolítottuk centrifugával (ScanSpeed 406) történő tömörítést követően, majd argon gázzal szárítottuk. Az így kapott peptidet vízben oldottuk fel, és liofilizáltuk befejezésképpen. A teljes előállítási folyamat végén a tervezett peptideket valamennyi esetben trifluorecetsav-só formájában nyertük.

A kapott liofilizált peptidek tisztaságát minden esetben fordított fázisú HPLC, ESI-MS és/vagy MALDI-TOF, valamint pH-potenciometriás technikák segítségével ellenőriztük. Az oldalláncban különböző donorcsoportot tartalmazó ligandumokhoz Grace Vydac 218TP C18 (250 mm × 4,6 mm, 300 Å, 5 µm) kolonnát használtunk, vizsgálataik alapján az előállított anyagok egy komponensűek és > 90%-os hatóanyagtartalmúak voltak, ezért a vizsgálatokhoz további tisztítás nélkül használtuk fel azokat. A SOD modell típusú peptidek esetén Teknokroma Europa Protein C18 (250 mm × 4,6 mm, 300 Å, 5 µm) kolonnát, valamint elválasztásukhoz Teknokroma Europa Protein 300 C18 (250 mm × 10 mm, 5 µm) kolonnát használtam. Az analitikai HPLC Jasco MD-2010 plus diódasoros detektort, míg a félpreparatív HPLC Jasco UV-2077

plus 4- λ UV-látható detektorral van felszerelve. A peptidkötésre jellemző 222 nm maximális elnyelési hullámhosszon detektáltuk a termékek egységességét. A mérésekhez eluensként 0,1 V/V% TFA-t tartalmazó vizet (A) és acetonitrilt (ACN) (B) használtunk, valamint 1 és 3 ml/perc-et választottunk áramlási sebességnek.

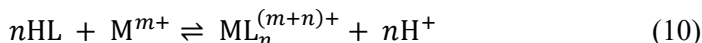
Mivel nem minden szintézis volt sikeres – például kimaradtak aminosav részek, keverékek képződtek vagy kis hozam is előfordult – ezért ezeknek a szintézisét megismételtük és az összes dolgozatban szereplő modellpeptidet sikerült tisztán előállítani, amit a MALDI-TOF analízis alátámasztott a jellemző molekulatömegekkel. A SOD modellpeptidekre az így kapott mért és számított m/z értékeket tartalmazza a 3. táblázat.

3. táblázat: A SOD modellpeptidek mért és számított m/z értékei:

Részecske	Összetétel	m/z (Mért)	m/z (Számolt)
SOD-5E-10N			
L^-			
H_2L^+	$C_{59}H_{77}N_{18}O_{14}^+$	1261,629	1261,586
$NaHL^+$	$C_{59}H_{76}N_{18}NaO_{14}^+$	1283,620	1283,568
KHL^+	$C_{59}H_{76}KN_{18}O_{14}^+$	1299,592	1299,542
Na_2L^+	$C_{59}H_{76}N_{18}Na_2O_{14}^+$	1305,599	1305,599
SOD-5A-15G			
L			
HL^+	$C_{74}H_{100}N_{25}O_{17}^+$	1610,768	1610,772
H_2L^{2+}	$C_{74}H_{101}N_{25}O_{17}^{2+}$	805,888	805,890
H_3L^{3+}	$C_{74}H_{102}N_{25}O_{17}^{3+}$	537,595	537,596
SOD-5E-16D			
L^{2-}			
H_3L^+	$C_{80}H_{107}N_{26}O_{22}^+$	1783,78	1783,8048
NaH_2L^+	$C_{80}H_{106}N_{26}NaO_{22}^+$	1805,77	1805,7867
KH_2L^+	$C_{80}H_{106}KN_{26}O_{22}^+$	1821,74	1821,7606
Na_2HL^+	$C_{80}H_{105}N_{26}Na_2O_{22}^+$	1827,75	1827,7687
$KNaHL^+$	$C_{80}H_{105}KN_{26}NaO_{22}^+$	1843,71	1843,7426
Na_2HL^+	$C_{80}H_{104}N_{26}Na_3O_{22}^+$	1849,73	1849,7506

3.3. pH-potenciometria

A pH-potenciometria az oldatfázisban lejátszódó komplexképződési folyamatok egyensúlyi vizsgálatának leggyakrabban használt módszere. Felhasználhatóságának feltétele, hogy az oldat pH-jának változásával járjon a komplexképződés, tehát a fémion koordinációja a ligandum protonálódási egyensúlyára hatással legyen. A (10) reakcióegyenlettel írható le a hidrogénion (H^+) és a fémion (M^{m+}) közötti kompetíciós folyamat.



A bruttó komplexképződési folyamatot a (11) egyensúlyi egyenlettel adhatjuk meg (a könnyebb kezelhetőség miatt nem tüntettem fel a részecskék töltését):



, ahol M a fémion, L a teljesen deprotonált ligandum, H a hidrogénion, q , p és r pedig sztöchiometriaai együtthatók.

Ezek a pH-potenciometriai vizsgálatok arra adnak lehetőséget, hogy a különböző fémion-ligandum arányoknál képződő részecskék sztöchiometriáját és stabilitási állandóit ($\log\beta$) megállapíthassuk. Az (11) reakcióegyenlet alapján keletkező $M_pH_qL_r$ összetételű komplexek bruttó stabilitási állandója (β_{pqr}) a (12) képlettel adható meg:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_pH_qL_r]}{[M]^p[H]^q[L]^r} \quad (12)$$

A kapott adatok alapján a SUPERQUAD [172] valamint a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén kifejlesztett PSEQUAD [173] számítógépes programokkal a szabad ligandumokra jellemző bruttó képződési állandók, valamint a keletkező komplexek stabilitási állandói meghatározhatók.

A SUPERQUAD és a PSEQUAD programokkal lehetőségünk van egy adott rendszer különböző koncentrációjú, illetve fémion-ligandum arányú mintáira kapott adatsorokat párhuzamosan kiértékelni. A program használatához

számos adatot szükséges megadnunk, melyek a következők: a hidrogénion, a ligandum és a fémion analitikai koncentrációja, a víziószorzat (K_w), az Irving-faktor (IRV_{atl}), a mérőoldat – esetünkben a $\sim 0,20 \text{ mol/dm}^3$ KOH-oldat – pontos koncentrációja, a minta kiindulási térfogata, a titrálás során kapott térfogat-pH adatpárok, a részecskék ismert és/vagy feltételezett összetétele, becsült és/vagy ismert stabilitási állandók. A program Newton-Rapson iterációval közelíti a bemenő adatok alapján a finomítani kívánt stabilitási állandók értékét addig, ameddig a mérőoldatra nézve minimumot talál a $\sum_{i=1}^n (V_{\text{mért},i} - V_{\text{számított},i})^2$ összefüggésre (ahol $V_{\text{mért},i}$ az i -edik mérési pont mérőoldatának térfogata, $V_{\text{számított},i}$ az i -edik mérési pont számított térfogata). A kiindulási komponensekre felírható anyagmérleg egyenletek ((13) – (15) egyenletek) megoldásával adja meg a rendszerben keletkező részecskék koncentráció értékeit, ahol n jelöli a vizsgált rendszerben keletkező asszociátumok számát, az $[M]$, $[H]$ és $[L]$ a komponensek koncentrációi, a $\beta_{p_i q_i r_i}$ a stabilitási állandók, a p_i , q_i és r_i az asszociátumokban lévő atomok száma:

$$c_M = [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [H]^{q_i} [L]^{r_i} \quad (13)$$

$$c_H = [H] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [H]^{q_i} [L]^{r_i} \quad (14)$$

$$c_L = [L] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [H]^{q_i} [L]^{r_i} \quad (15)$$

Vegyes rendszerekben lejátszódó komplexképződési folyamatoknál, ahol két különböző fémion is jelen van az oldatban, a komponensek száma négyre változik a fent feltüntetett háromról, ezáltal négy komponensre is felírható az anyagmérleg. A program az iterációsorozat végén megadja a finomított állandók értékeit, valamint azok hibáját és a közelítés pontosságát az illesztési paraméterként definiált $|V_{\text{számított},i} - V_{\text{mért},i}|$ átlagértékeként. A disszertációban megjelenő stabilitási állandók ($\log \beta$, $\log \beta[M_p H_q L_r]$) után feltüntetett zárójelben szereplő értékek jelölik az állandó utolsó tizedesjegye szerinti standard deviáció értékét. Mindemellett a kiválasztott komponensekre vonatkozóan ábrázolja a pH-függvényében a részecskék koncentráció-eloszlási görbét. Törzskomplexek képződése esetén a fémionra számoljuk a móltörtet, ha több

különböző fémiont tartalmazó vegyes rendszereket vizsgálunk, akkor a ligandum móltörtjét érdemes ábrázolni.

A kísérleti részben található koncentráció-eloszlás görbéket a részecskék stabilitási szorzatai, összetétele és azok kiindulási koncentrációinak felhasználásával, a MEDUSA programmal [174] szerkesztettem meg, majd Microsoft Excel táblázatkezelő alkalmazással ábrázoltam.

Számos matematikai művelet felhasználásával szükségünk volt bevezetni különféle úgynevezett származtatott állandókat a fémkomplexek képződését jellemző bruttó stabilitási állandók összehasonlíthatósága érdekében. Az értekezés táblázatai a ligandumok protonálódási állandóiból számított deprotonálódási állandókat (pK) tartalmazzák. A következő részben bemutatom a dolgozatban szereplő származtatott állandók számításának módját.

A hisztidin oldalláncának imidazolil-csoportja részvételével kialakuló makrokelát szerkezetű fémkomplexek stabilitásának jellemzésére használjuk a $\log K(M + N_{lm})$ értéket, ahol az M a $Cu(II)$ -, a $Ni(II)$ -, vagy a $Zn(II)$ -ionok. Ha a ligandum teljesen deprotonált formában van, és valamennyi imidazolnitrogén a fémionhoz koordinálódik, akkor ezen állandó értéke megegyezik az $[ML]$ összetételű komplexre jellemző $\log \beta$ értékével. Viszont, ha a ligandum olyan funkciós csoportot tartalmaz, ami a komplexképződéshez képest nagyobb pH-tartományban deprotonálódik (például $Tyr-OH$, $Lys-NH_3^+$), abban az esetben a következő egyenletek alapján számoljuk az értékét ((16) és (17) egyenletek):



$$\log K(M + N_{lm}) = \log \beta(MH_xL) - \log \beta(H_xL) \quad (17)$$

Mivel az általunk vizsgált fémionok ($Cu(II)$ -, $Ni(II)$ - és esetenként a $Zn(II)$ -ionok) elősegítik az amidnitrogének deprotonálódását és koordinálódását, ezért az amid nitrogének deprotonálódására jellemző állandók kiszámítására az alábbi egyenletek használhatók ((18) és (19) egyenletek):

$$pK(\text{amid}) = \log \beta[MH_nL] - \log \beta[MH_{n-1}L] \quad (18)$$

A kooperatív deprotonálódás esetén ((19) egyenlet):

$$pK\left(\frac{MH_nL}{MH_{n-x}L}\right)_{\text{átlag}} = \frac{\log\beta(MH_nL) - \log\beta(MH_{n-x}L)}{x} \quad (19)$$

Fontos megjegyezni, hogy a dolgozatban látható titrálási görbén a titráló lúgekvivalensek függvényében ábrázoltuk a pH-értékeket, ahol a nulla ekvivalensnél a teljesen protonált ligandum van jelen és a (20) képlettel számolható:

$$\text{lúgekvivalens} = \frac{n_{\text{KOH}} - n_{\text{H}^+ \text{ felesleg}}}{n_{\text{ligandum}}} \quad (20)$$

A titrálásokat vizes oldatokban állandó 25 °C (298 K) hőmérsékleten végeztük, mely hőmérsékletet Julabo F12 típusú ultratermosztáttal biztosítottuk. Hamilton fecskendővel (1,00 vagy 0,50 cm³ térfogatú) felszerelt Mol-AcS mikrobürettával adagoltuk a pontosan ismert koncentrációjú (~ 0,2 mol/dm³) karbonátmentes, argon alatt tárolt KOH-oldatot. A pH-mérése Methrom 6.0234.110 kombinált üvegelektóddal felszerelt MOLSPIN pH-mérővel történt. Az elektród kalibrálását 0,0500 mol/dm³ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldattal végeztük, melynek pH-ja 298 K hőmérsékleten 4,005. A titrálás során a légköri szén-dioxid kizárása miatt a mintaoldatok gőzterébe argont vezettünk, a folyamatos kevertetést pedig VELP mágneses keverő végezte.

A továbbiakban felhasznált HCl- és HNO₃-oldatok koncentrációját a már ismert koncentrációjú KOH-oldattal állapítottam meg, és a pontos koncentrációkat a titrálási görbék Gran-féle linearizálásával határoztam meg [175]. Az Irving és munkatársai által bemutatott módszert alkalmaztuk a diffúziós potenciál kiküszöbölésére [176].

A ligandum törzsoldatokat szilárd anyag bemérésével és háromszor ioncserélt vízzel készítettem. A mintákban a ligandum kiindulási koncentrációja SUPERQUAD programmal számolva $1,0 \times 10^{-3} - 2,0 \times 10^{-3}$ mol/dm³ koncentrációtartományban mozgott. A fémion-ligandum arány 2:1 és 1:3 között változott. A titrálási minták kezdeti térfogata 3,00 vagy 4,00 cm³ volt, melyben az állandó 0,2 mol/dm³ ionerősséget KCl- vagy KNO₃-oldat hozzáadásával biztosítottuk.

A pH-potenciometriás mérések során ismereteket szerezhethetünk a keletkező komplexek összetételéről, valamint stabilitásáról, ugyanakkor a feltételezhető koordinációs módról, a koordinálódó donoratomokról, a szerkezetről nem ad információt. A módszer egyéb gyengesége, hogy egyes esetekben egy rendszer jól leírható több modellel is, esetleg azonos pH-effektussal jár kétféle sztöchiometriájú részecske képződése is. Ezért indokolt az oldategyensúlyi elemzés kiegészítése további spektroszkópai módszerekkel, mint például UV-látható spektrofotometria, CD spektroszkópia. Egyéb módszerek (ESR, MS, NMR) bevonása további bizonyítékokat szolgáltatathat a komplexek oldatbeli szerkezetéhez.

3.4. UV-látható spektrofotometria

Az átmenetifém-komplexek képződése során a ligandum elektromos terének hatására a központi fémion d-pályái felhasadnak és eltérő lesz az energiájuk. A komplexek színét és fényelnyelését a keletkező d-pályák közötti elektronátmenetek (d-d átmenetek) okozzák. A fémion és a ligandum közötti elektronátmenetek, vagy másnéven töltésátviteli (CT) sávok eredményeként főként az ultraibolya tartományban nagy intenzitású abszorpciós sávok jelennek meg. A spektrumok értékelésével következtethetünk a koordinálódó donoratomok számára és kémiai minőségére, valamint a keletkező komplexek szerkezetére.

A Cu(II)-komplexek sajátossága, hogy a tetragonálisan torzult, oktaédeses térben a Jahn-Teller effektus következtében jellemző ^2E_g alap- és ^2T_g gerjesztett állapotú energiaszintek gyenge-, és erősterű ligandumok esetén is négyfelé hasadnak, az így létrejött négy energiaszint között háromféle energiájú d-d átmenetnek kellene megjelennie: $d_{xz} (d_{yz}) \rightarrow d_{x^2-y^2}$; $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$; $d_{z^2} \rightarrow d_{x^2-y^2}$. Viszont a spektrumokban gyakran ezek az átmenetek összeolvadnak egyetlen széles sávzá, melynek energiája, illetve intenzitása (A) függ a koordinálódó donoratomok számától és minőségétől, továbbá az abszorpciós maximumhoz tartozó hullámhossz ($\lambda_{\max}$) értékét a komplex pontos geometriája befolyásolja.

A Cu(II)-komplexekre jellemző $\lambda_{\max}$ értékeket befolyásoló tényezőket Sigel és Martin [137], valamint Pettit és munkatársai [139] is vizsgálták. Ha a vizes oldatokban jelenlévő $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ kation ekvatoriális pozíciójában lévő vízmolekulákat lecseréljük O-, vagy N-donoratomokra, akkor az abszorpciós maximum a rövidebb hullámhosszak felé tolódik el (hipszokróm eltolódás). Ez a hatás különösen a N-donoratomot tartalmazó funkciós csoportok koordinálódásakor számottevő. Kutatásaik alapján megadhatók azok a hullámhossztartományok, amelyekbe a különböző számú nitrogén donoratomot tartalmazó komplexek abszorpciós maximuma esik (4. táblázat). [177]

4. táblázat: A réz(II)komplexek abszorpciós maximumának ($\lambda_{\max}$) és a moláris abszorbanciájának (ϵ) függése a koordinált nitrogénatomok számától

Koordinált nitrogénatomok száma	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
1	680-730	30-60
2	620-670	40-120
3	540-590	100-150
4	500-530	120-200

Emellett ismert egy olyan általánosan alkalmazható empirikus egyenletet is, amivel megbecsülhető a különböző koordinációjú Cu(II)-komplexekre jellemző abszorpciós maximum is [137]:

$$\lambda_{\max} = \frac{1000}{[0,294(\text{C}=\text{O}/\text{H}_2\text{O})+0,346(\text{COO}^-)+0,460(\text{NH}_2)+0,494(\text{N}=\text{O})+0,434(\text{N}_{\text{Im}})]} \quad (21)$$

Azonban az összefüggés nem veszi figyelembe az axiális koordináció jelenlétét, mely során a $\lambda_{\max}$ értékek a nagyobb hullámhosszak felé (batokróm eltolódás) tolódnak el. Valamint az effektus nagysága nemcsak a donoratomok minőségétől függ, hanem a kelátgyűrű méretétől, valamint a ligandumhoz kapcsolódó, de a koordinációban nem résztvevő egyéb funkciós csoportoktól is [178].

A d^8 elektronkonfigurációjú nikkell(II)ion komplex vegyületeiben 4-es és 6-os koordinációs számmal fordul elő leggyakrabban [179]. Gyenge terű ligandumokkal általában 6-os koordinációs számú oktaéderes geometriájú, nagy spinszámú és paramágneses komplexek jönnek létre. Ebben az esetben három

spinmegengedett d-d átmenet valósulhat meg, amelyek kis intenzitásúak ($\epsilon_{\max} < 30 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a Laporte-szabály szerinti tiltás értelmében. Egy-egy sáv jelenik meg az abszorpciós spektrumban a közeli infravörös (770-1430 nm), a látható (500-910 nm) és a közeli ultraibolya (370-520 nm) hullámhossztartományban. Létezik egy kisebb intenzitású spintiltott negyedik átmenet is, mely mindössze csak vállként jelentkezik valamelyik sávon. Négyes koordinációs számmal tetraédes vagy síknégyszetes geometriájú Ni(II)-komplexek képződnek, melyek fényelnyelése az oktaédes komplexekénél sokkal intenzívebb. Gyenge terű, egyfogú ligandumokkal kialakuló tetraédes elrendeződésű komplexek abszorpciós spektrumában 500-900 nm között egy nagyobb intenzitású sáv ($\epsilon_{\max} \sim 100\text{-}1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) jelenik meg. Erős terű ligandumokkal (például a peptidek amidnitrogénjei, tiolátcsoport, makrociklusok) szinte kizárólag síknégyszetes geometriájú diamágneses komplexek képződnek és ezek keletkezése intenzív színváltozással is jár (a pH emelésével rendre változik sárga $\rightarrow$ vörös $\rightarrow$ barna színűvé az oldat). Ezen részecskék egy nagy intenzitású ($\epsilon_{\max} \sim 50\text{-}500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) elnyelési sávval rendelkeznek az abszorpciós spektrumban 400-550 nm körül. Egy még intenzívebb második sáv is megjelenhet 430 nm alatt, ami többnyire töltésátviteli eredetű.

A Zn(II)-ion komplexei szintelenek, ami a d^{10} elektronkonfigurációjának következménye. Ez a tulajdonsága megnehezíti komplexeinek vizsgálatát olyan spektroszkópai módszerekkel, amelyek során elektronátmenet történik.

A méréseket 1,000 cm-es úthosszúságú küvetában, különböző pH-értékeken Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras és VWR UV-1600PC típusú egysugaras spektrofotométerekkel 298 K hőmérsékleten végeztem. A spektrumokat 200-900 nm közötti hullámhossz tartományban rögzítettem. A minták koncentrációja és a fémion-ligandum aránya megegyezett a pH-potenciometriai méréseknél alkalmazottal. A pH-mérésekhez 6.0234.110 Metrohm kombinált üvegelektóddal ellátott Metrohm 827 pH lab hordozható pH-mérő készüléket használtam. A pH beállításához a korábban ismertetett KOH- és HCl-oldatokat használtam.

3.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus spektroszkópia egy olyan spektroszkópai módszer, amely a polarizált fény és egy optikailag aktív anyag kölcsönhatásán alapszik. A síkban polarizált fény felbontható két azonos hullámhosszúságú, amplitúdójú és fázisú cirkulárisan polarizált fénysugár összegére (balra és jobbra cirkulárisan polarizált fény). A fény e két komponensével különböző módon lépnek kölcsönhatásba az optikailag aktív anyagok, mely során a síkban polarizált fény átalakul elliptikusan polarizálttá. Ezáltal a balra és jobbra cirkulárisan polarizált fény eltérő mértékű abszorpciót szenved. Ezt az abszorpciós különbséget nevezzük Cotton-effektusnak [180] vagy cirkuláris dikroizmusnak, ami a következő egyenletekkel írható le:

$$\Delta A = A_{\text{bal}} - A_{\text{jobb}} = \log\left(\frac{I_0}{I_b}\right) - \log\left(\frac{I_0}{I_j}\right) = \Delta \varepsilon \cdot c \cdot \ell \quad (22)$$

ahol A az abszorbancia, I_0 a belépő fény intenzitása, I_b és I_j az egyes komponensek kilépő intenzitása, $\Delta \varepsilon$ a moláris abszorpciós koefficiensek különbsége, c a koncentráció és ℓ a kütetta úthossza.

A cirkuláris dikroizmus (CD) görbét úgy kapjuk, hogy ábrázoljuk a kétféle fénysugár moláris abszorpciójának különbségét ($\Delta \varepsilon = \varepsilon_{\text{bal}} - \varepsilon_{\text{jobb}}$) a sugárzás hullámhosszának függvényében. Ellentétben az abszorpciós sávokkal a CD görbe minimumai és maximumai viszonylag keskeny Gauss-görbék, melyek az elektrongerjesztési abszorpciós spektrum maximuma helyén vagy ahhoz közel jelentkeznek. Ennek okán a CD spektrum több esetben informatívabb az UV-látható spektrumoknál, mivel viszonylag ritkán fordul elő a keskenyebb sávok miatt, hogy átfednek egymással a különböző elektronátmeneket folyamatai, ezen kívül meghatározó szerkezeti információt hordoz a Cotton-effektusok előjele is.

A szabad fémion az UV-látható spektroszkópiával szemben a d-d tartományban nem mutat aktivitást, ami a fehérje/peptid molekulák kölcsönhatásának vizsgálatát megkönnyíti, hiszen csak ebből a kölcsönhatásból erednek a jelek [181].

A fémkomplexek optikai aktivitása három helyzetből származhat: a konfigurációs-, a konformációs- és a vicinális (szomszédos) hatásból [182,183]. Az optikai aktivitáshoz legnagyobb mértékben a konfigurációs hatás járul hozzá és akkor jelentkezik, amikor a fémionhoz koordinálódott atomok vagy csoportok elhelyezkedése asszimmetrikus. A konformációs hatás a kelátgyűrűk tulajdonságaitól függően [184] bizonyos fémion-ligandum összetétel esetén mutatkozik. Míg a vicinális (szomszédos csoport) hatás a kelátgyűrű környezetében elhelyezkedő csoportok jelenlétéből adódik [182,183]. Ezen kívül intenzív d-d átmeneteket figyeltek meg, azoknál a négyzetes geometriájú komplexeknél, ahol az N_{lm} és a peptid- N^- egyidejű koordinációja valósul meg [156,185,186]. Ebben az esetben az aktivitás abból ered, hogy két koordinálódó csoport által bezárt kelátgyűrűbe esik a királis α -szénatom [183].

Számtalan kutatócsoport [183,187,188] vizsgálta a kis tagszámú peptidek különböző fémionokkal alkotott komplexeinek CD spektroszkópiai tulajdonságait. A vizsgálatok azt mutatták, hogy a koordinálódó donorcsoportok nem azonos mértékben továbbítják a királis információt a kromofór csoporthoz, ez esetben a központi fémionhoz. Megállapították, hogy a fémkomplexekben a legnagyobb hatást az amidnitrogének koordinálódása eredményezi, majd a karboxilátogének és legkisebb hatásfokkal az aminonitrogének közvetítik a környezet kiralitását [137]. Azonban figyelembe kell vennünk a koordinálódó donortatomok minőségén kívül a kromofór csoport és a kiralitáscentrum távolságát is, hiszen annál gyengébb az effektus, minél távolabb helyezkednek el ezek egymástól.

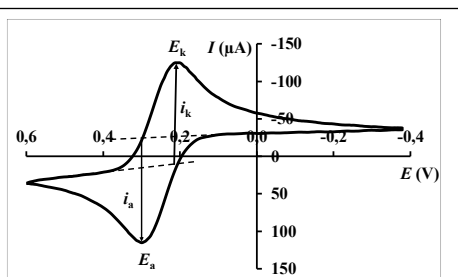
A CD méréseket a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén JASCO-810 típusú készüléken végeztük. A spektrumokat szobahőmérsékleten, 200-800 nm hullámhossztartományban, különböző pH-értékeken rögzítettük. A pH-mérésekhez a korábban már említett kombinált üvegelektroddal ellátott hordozható pH-mérő készüléket használtuk. A vizsgálathoz 0,100 és 1,000 cm-es úthosszúságú kvarcküvetéket alkalmaztunk. A legtöbb mérésben a minták koncentrációja és a fémion-ligandum arány megegyezett a pH-potenciometriás

mérések során beállítottnal. A SOD modellpeptidek esetén rögzítettem CD spektrumokat a ligandum, illetve a fémion koncentrációjának függvényében is. A primer adatok kiértékelése a gyártó által fejlesztett szoftverrel történt, az értekezésben feltüntetett spektrumokhoz a Microsoft Excel programot használtuk.

3.6. Ciklikus voltammetria (CV)

A ciklikus voltammetria (CV) olyan elektroanalitikai technika, mely segítségével gyorsan és költséghatékonyan nyerhetünk információt különböző kémiai vegyületek, biológiai anyagok vagy elektródák felületének elektrokémiai tulajdonságairól (formálpotenciál, komplexek látszólagos stabilitási állandójának meghatározása, illetve reakciók mechanizmusának feltérképezése). Az elektrokémiai folyamatokról gyorsan minőségi és mennyiségi információkat kaphatunk széles potenciáltartományban.

A CV olyan módszer, mely feszültség szabályozással működik. Lényege, hogy lineárisan változtatjuk a munkaelektrod feszültségét egy kezdeti potenciál értékről (E_i) egy fordulópont potenciálnak nevezett ($E_{\lambda 1}$) értékig. Ezt a fordulópont potenciál értéket elérve a potenciálváltozás előjele megfordul és a második fordulópont potenciál ($E_{\lambda 2}$) szintén lineárisan halad. Ebben a pontban ér véget a ciklus. Ennek következtében bekövetkező potenciál változást egy referencia elektród potenciáljához képest mérjük. A referencia elektród leggyakrabban egy telített kalomel elektród (SCE), vagy Ag/AgCl elektród. Az ellenelektrod általában platina. A munkaelektrod minőségét a vizsgálandó anyag szabja meg. Abban az esetben kapjuk meg a ciklikus voltammogramot, ha ábrázoljuk a munkaelektrodon átfolyó áramerősséget az alkalmazott feszültség függvényében (8. ábra). [189-192]



8. ábra: Példa egy ciklikus voltammogramra

A kapott voltammogrammból több információt is nyerhetünk. A katódos (E_k) és az anódos (E_a) csúcspotenciál értékek számtani közepe adja meg a féllépcsőpontenciál ($E_{1/2}$) értékét.

$$E_{1/2} = \frac{E_k + E_a}{2} \quad (23)$$

Ha ezt a féllépcső potenciál értéket a referenciaelektród potenciálértékével korrigáljuk, akkor megkapjuk a végbemenő folyamatra jellemző redoxipotenciál értéket (E°) normál hidrogénelektródra vonatkoztatva.

$$E^\circ = E_{1/2} + E^\circ(\text{Ag/AgCl}) \quad (24)$$

Az anódos és a katódos csúcspotenciálok különbségéből kaphatjuk meg a csúcsszeeparáció értékét, amelyből következtethetünk a redoxi folyamatban résztvevő elektronok számára és a reakció mechanizmusára.

$$\Delta E = E_a - E_k = \frac{0,059}{n} \quad (25)$$

, ahol n a folyamatban résztvevő elektronok száma. Egy egyelektronos folyamatban az értéke 0,059 V.

A katódos és az anódos csúcsáram (i_k és i_a) aránya is információt hordoz. Amennyiben a folyamat reverzibilis, az i_a és i_k aránya egy.

$$\frac{i_a}{i_k} \approx 1 \quad (26)$$

A ciklikus voltammetriás méréseket Basi Epsilon Eclipse, az Ac-HADH-NH₂ és Ac-HDAH-NH₂ peptidek vizsgálatai esetén Methrom 746 VA Trace Analyzer típusú készülékkel végeztem. A minták méréséhez háromelektrodos rendszert használtam. Referenciaelektrodként Ag/AgCl elektrodot (BASI Instr. RE-5B, MF-2079) alkalmaztam, amelyben a háttérelktrolit 3 mol/dm³ koncentrációjú NaCl-oldat volt ($E^\circ_{(\text{Ag/AgCl})} = 0,209$ V). Segédelektrodként – egy mikrocellában is alkalmazható – platinaelektrodot (ALS Co. Japan), munkaelektrodként pedig 2 mm átmérőjű szén- (CHI104) és platinaelektrodokat (CHI102) alkalmaztam. A mikrocellát platina munkaelektrod segítségével a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ redoxi rendszerrel kalibráltam, a mért redoxipotenciál értéket az irodalmi adattal ($E^\circ = 0,458$ V [193]) vetettem össze, mely megfelelő egyezést mutatott. A méréseket 1,0 cm³ térfogatban 0,2 mol/dm³ KNO₃ ionerősség

mellett, a tanszéken tervezett mikrocellában végeztem el. A Cu(II)-ligandum arányát az oldatokban 1:5-re állítottam. Minden esetben 25 °C-on vizes oldatokat vizsgáltam, a ligandum koncentrációja 1×10^{-3} mol/dm³ volt, az oldatok pH-ját Methrom 827 mobile pH-mérő és 6.0234.110 kombinált üvegelektrod használatával KOH-oldattal és HNO₃-oldattal állítottam be a kívánt értékre. A minták oxigénmentesítését minden mérés előtt 5 percig tartó argongáz átbuborékoltatásával végeztem. A szabad ligandumokat és a komplexeket +0,800 V és -0,800 V közötti tartományban 140 µA határáram mellett mértem 25, 50, 100 és 200 mV/s közötti pásztázási sebesség alkalmazásával. Az értékeléshez szükséges paramétereket az eL-Chem Viewer program segítségével kaptam meg.

3.7. Elektronspin-rezonancia spektroszkópia (ESR)

Az ESR spektroszkópia fontos vizsgálati módszere a párosítatlan elektront tartalmazó, azaz paramágneses tulajdonságú molekuláknak és ionoknak (például szabad gyököknek, néhány átmenetifém komplexnek, triplett állapotú molekuláknak). Az általunk vizsgált tetragonálisan torzult oktaéderes Cu(II)-komplexek is ebbe a csoportba tartoznak. A vizsgálat során egy erős mágneses térbe helyezik a mintát, amely során a Zemann effektus értelmében megszűnik a párosítatlan elektronok energiaszintjeinek degeneráltsága. Mikrohullámú sugárzás hatására a felhasadt energiaszintek között átmenet jöhet létre. A mérés során a mágneses tér erősségét változtatják állandó erősségű mikrohullámú frekvencia mellett és a detektálás során az abszorbanancia első deriváltját mérik.

Mivel a víznek a mikrohullámú tartományban nagy az abszorpciója, ezért a mintákat fagyasztott, vagy szilárd formában vizsgálják. A mérhető paramétereket anizotrópiának nevezzük és ezen paraméterek miatt a spektrum párhuzamos és merőleges tartományai is megkülönböztethetőek lesznek. A spektrumokból kinyerhetők a g faktor értékei és a hiperfinomcsatolási-állandó ($A_{||}$) az alábbi egyenletek szerint:

$$g_{\parallel} = g_{\parallel}^0 \cdot \frac{H_0}{H_{\parallel}} \quad (27)$$

$$A_{\parallel} [\text{cm}^{-1}] = \frac{g_{\parallel} \cdot \mu_B \cdot a_{\parallel}}{h \cdot c} \quad (28)$$

, ahol g_0 a külső standard értéke, H_0 és $H_{\parallel}$ a mintában és a standardban mért mágneses térerő értéke [Gauss], $a_{\parallel}$ a parallel csatolási állandó [Gauss], μ_B a Bohr-magneton [értéke: $9,2740 \cdot 10^{-24} \text{ J} \cdot \text{T}^{-1}$], h a Planck-állandó [$6,6250 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}^{-1}$] és c pedig a fénysebesség [értéke: $2,9979 \cdot 10^{10} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$].

A két paraméter ($g_{\parallel}$ és $A_{\parallel}$) értékét összehasonlítva az egyéb módszerekkel igazolt szerkezetű részecskékkel, következtetéseket vonhatunk le a fémionhoz koordinált donoratomok kémiai minőségéről, a kialakuló kötésmódokról, valamint a komplexekben bekövetkező geometriai változásokról.

A méréseket az MTA Természettudományi Kutatóközpont Szerkezetkutató Központjában Bruker EleXsys E500 készülékkel Dr. May Nóra Veronika és Dr. Lihi Norbert végezték.

3.8. ^1H -NMR spektroszkópia

Az NMR (mágneses-magrezonancia spektroszkópia) széles körűen alkalmazott szerkezetvizsgáló módszer, mely során az eltérő kémiai környezetben található atomok a spektrumokban eltérő kémiai eltolódás értéket mutatnak. Mivel ezen változás jelentős lehet a (de)protonálódási folyamatoknál, ezért alkalmas a ligandum proton-disszociációs folyamatainak megismerésére és a komplexképződés monitorozására is. Annak függvényében, hogy az NMR időskálán a képződő részecskék egymásba alakulása gyors vagy lassú folyamat a spektrumokban különböző jelenségeket látunk. Lassú csere esetén elkülönült jelcsoportok jelennek meg, míg gyors cserénél a ligandumok megfelelő jeleinek az eltolódását láthatjuk.

A munkám során néhány peptid cink(II)komplexeit tanulmányoztuk ^1H -NMR spektroszkópiával. Az Ac-HADH-NH₂ vizsgálatait Dr. Ozsváth András és Dr. Erdei Judit Zsuzsa végezték. $[\text{ZnH}_{-1}\text{L}]$ és $[\text{ZnH}_{-2}\text{L}]$ komplexek spektrumát

vizsgáltuk enyhén lúgos oldatokban. A spektrumban megjelenő jelek pontos azonosítása miatt felvettük a teljesen deprotonált ligandum spektrumát is. A méréseket Brucker Avance I 400 MHz készüléken végeztük, a kiértékeléshez MestreNova 9.0 szoftvert használtunk. A ligandumokat D₂O-ban oldottuk fel és a kémiai eltolódás értékeket trimetil-szilil-propánsav (TSP) nátrium sójához (0,00 ppm) képest adtuk meg [194]. Az NMR titrálások során 1:1 fémion-ligandum arányokat alkalmaztunk, ahol a ligandum koncentrációja 10,0 mM és a minták 0,20 M KCl ionerősséget tartalmaztak. Az oldatok pH*-értékeit DCl- és NaOD-oldatokkal állítottuk be, és vizes közegben alkalmazható pufferre kalibrált hordozható pH-mérővel ellenőriztük. A pH*-értékeket az alábbi összefüggéssel tudjuk átszámolni a tényleges pH-kra [195]:

$$\text{pH} = 0,930 \text{ pH}^* + 0,40 \quad (29)$$

3.9. Tömegspektrometria (MS)

Az MS és a tandem MS módszert a biomolekulák analízisére elterjedten alkalmazzák [196,197]. A legelterjedtebben alkalmazott ionizációs módszer az elektropray-ionizáció (ESI) pozitív és negatív módban egyaránt. Az ESI ionizáció használható a minta komponenseinek gerjesztésére (ionizálására), mellyel elhanyagolható a vizsgált fehérjék, peptidek vagy ezek fémkomplexeinek fragmentációja, ezáltal meghatározható a tömegük. ESI ionizáció során beporlasztják az oldatot az ionforrásba egy nagyfeszültséget tartalmazó kapillárison keresztül, amelynek hatására töltést vesznek fel a minta részecskéi. A szárítógáz segítségével az oldószermolekulákat eltávolítják, ezáltal az ionok gázfázisba kerülnek. Az ennek következtében keletkezett ionok a nagyvákuum alatt lévő time of flight (TOF, repülési idő) analizátorba jutnak és a nagyfeszültség hatására különböző időben kerülnek a detektorba m/z (tömeg/töltés) értékük szerint.

Tandem MS alkalmazásával szerkezeti információ nyerhető annak köszönhetően, hogy lehetővé teszi a ligandum és/vagy komplex hasadását,

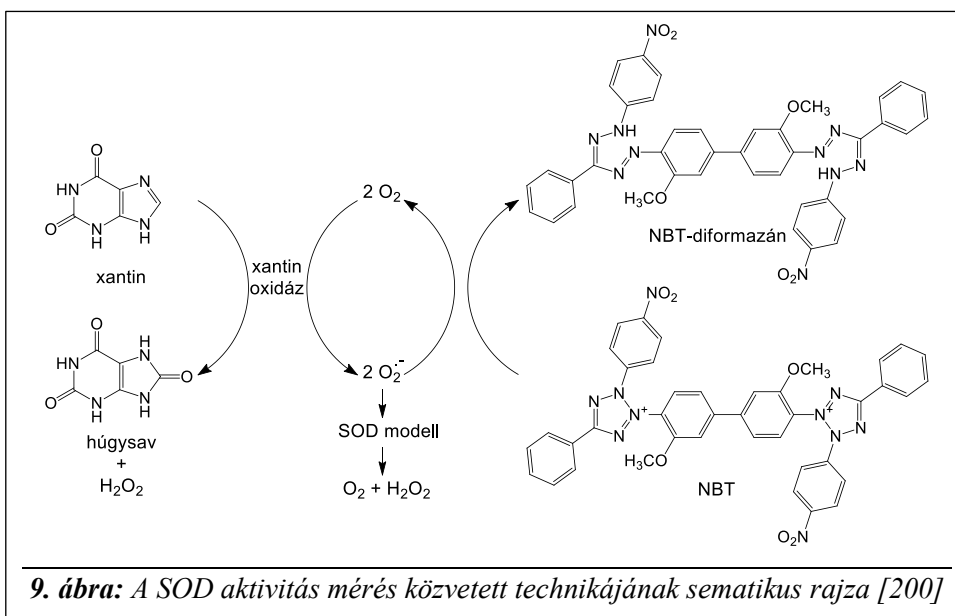
fragmentálódását. Műszerezettségét tekintve két tömeganalizátort tartalmaz a tandem MS. Lényegében az első analizátor segítségével kiválasztjuk a spektrumból azt az iont, amelynek meg akarjuk határozni az összetételét, majd a kiválasztott ion fragmentálódik a második analizátorba kerülve és a detektor érzékeli és rögzíti az így keletkezett termékionokat.

A keletkezett komplexek azonosítására ESI-MS és ESI-MS/MS technikát alkalmaztunk. A méréseket Dr. Csire Gizella a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén található maXis II MicroTOF-Q típusú Qq-TOF MS készülékkel (Bruker Daltonik, Bréma, Németország) végezte pozitív és negatív módban ESI ionforrás mellett. A minta áramlási sebessége 3 µl/perc volt, mely egy fecskendőpumpa (ColeParmer Ins. Co., Vernon Hills, IL, USA) alkalmazásával hajtható végre. Beállításra került a spray feszültsége 4 kV-ra, 200 °C-ra a szárító gáz (N₂) hőmérséklete, 4 l/perc-re az áramlási sebesség. Az MS/MS mérések esetén nitrogén került felhasználásra ütközési gázként. Az ütközési cellában $1,2 \cdot 10^{-3}$ mbar volt a nyomás. ESI körülmények között a nátrium-trifluoracetát oldatból keletkező klaszterionjai szolgálnak külső kalibrálóként.

3.10. Szuperoxid-dizmutáz aktivitás vizsgálatok

A szuperoxid gyökanion diszproporcióját a Cu,Zn-szuperoxid-dizmutáz enzim katalizálja ($k \sim 2,0 \times 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$, pH = 7,4). Közvetlenül és közvetve is mérhető az enzim működését utánzó fémkomplexek aktivitása [198]. Közvetlen technika során – a szuperoxid gyökanion előállítására – több módszert is használhatnánk, például a villanófény fotolízist [197] vagy az impulzus radiolízist [199], ugyanakkor ezek magas költsége miatt nem terjedtek el a laboratóriumi gyakorlatban. A leggyakrabban használt közvetett módszer a xantin és xantin-oxidáz reakciójának következtében *in situ* előállított O₂^{•-} (szuperoxid gyökanion) és a nitroblue-tetrazólium-klorid (NBT) közötti reakció UV-látható spektrofotométerrel való monitorozása. Aktivitást nem mutató fémkomplexek

mellett az NBT az előbb említett reakció során keletkező szuperoxid gyökänion hatására NBT-diformazánná redukálódik. Ez a folyamat egy színváltozással járó reakció, amely az 560 nm-nél mért abszorbancia mérésével követhető nyomon. Amennyiben a fémkomplex aktivitást mutat a szuperoxid gyökänion koncentrációja csökken, emiatt a NBT-só redukciója akadályozottá válik, ez pedig a mért abszorbancia csökkenését okozza (9. ábra [200]).



A mérések kivitelezéséhez foszfát puffert (HPO_4^{2-} és H_2PO_4^- , $c = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$), $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ NBT-oldatot és $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú xantint használtunk. A xantin-oxidáz mennyiségét úgy állítottuk be, hogy az abszorbancia változás 560 nm-en $0,020\text{-}0,025 \text{ min}^{-1}$ értékek közé essen. A reakciót szobahőmérsékleten, 1,00 cm úthosszú küvettában Agilent Cary 8454 diódasoros fotométeren követtük. Változó koncentrációjú ($5,0 \times 10^{-8} - 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$) Cu(II)-komplex jelenlétében, illetve annak távollétében is vizsgáltuk az NBT redukcióját. Először egy vak minta abszorbancia változását rögzítettük 560 nm-en 8 percig. Ez a vak minta tartalmazta az NBT-t, a xantint és a xantin-oxidáz enzimet. A további mérések során a kiinduló minta tartalmazta a xantint, a xantin-oxidázt és az NBT-t, majd

négy perc után hozzáadtuk a mintához a fémkomplexet, melynek az ezt követő négy percben mértük az abszorbanciaváltozását.

A vegyületek SOD aktivitását az IC_{50} értékkel jellemezhetjük, mely azt a komplexkoncentrációt jelöli, ahol a diformazán képződése a felére csökken az enzimutánzó vegyület távollétében mért értékhez képest. Azaz, ha adott pH-értéknél a Cu(II)-komplex koncentráció függvényében ábrázoljuk az inhibíció (%) értékét ((30) egyenlet), akkor a telítési görbén az 50%-os inhibícióhoz tartozó komplexkoncentráció adja az IC_{50} értékét.

$$\text{inhibíció \%} = \frac{\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)^{\text{vak}} - \left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)^{\text{komplex}}}{\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)^{\text{vak}}} \times 100 \quad (30)$$

, ahol $\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)^{\text{vak}}$ a fémkomplex hiányában, míg a $\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)^{\text{komplex}}$ a fémkomplex jelenlétében mért abszorbanciaváltozás 560 nm-en.

A $c_{\text{Cu(II)-komplex}}$ és a kiszámított inhibíció adatokra az alábbi (31) egyenlet szerint illeszthetünk telítési görbét [197]:

$$\text{inhibíció} = \frac{A \times c_{\text{Cu(II)-komplex}}}{B + A \times c_{\text{Cu(II)-komplex}}} \quad (31)$$

, ahol A és B illesztési paraméterek. Az így kapott SOD aktivitás értékekből – a jobb összehasonlíthatóság miatt – relatív aktivitás értékeket számítottunk ki, a korábban kutatócsoportunkban mért natív enzim IC_{50} értékének a felhasználásával, az alábbi (32) egyenlet alapján:

$$\text{relatív aktivitás} = \frac{IC_{50}(\text{CuZnSOD})}{IC_{50}(\text{komplex})} \times 100 \quad (32)$$

Majd meghatároztuk a k_{cat} értékét az alábbi (33) egyenletnek megfelelően ($k_{\text{NBT}}(\text{pH} = 7,8) = 5,94 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$) [201]:

$$k_{cat} = \frac{k_{\text{NBT}} \times [\text{NBT}]}{IC_{50}} \quad (33)$$

4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. Aszparaginsavat tartalmazó peptidek

Kutatómunkám első részében a különböző helyzetben aszparaginsavat és két vagy három hisztidint tartalmazó terminálisan védett peptidek Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-komplexeit tanulmányoztam abból a szempontból, hogy az oldalláncbéli karboxilátsoport hogyan befolyásolja a peptidek komplexképző és redoxi sajátságait. A komplexképződési folyamatok összegző és összehasonlító elemzéséhez az általam potenciometriásan és spektroszkópiásan részletesen vizsgált Ac-SarHAH-NH₂, valamint a hexa- és heptapeptid (Ac-HADHAH-NH₂, Ac-HDHAHDH-NH₂) eredményein túl korábban a kutatócsoportunkban szakdolgozatot és diplomamunkát készítő hallgatók Ac-HADH-NH₂ [202], Ac-HDAH-NH₂ [202], Ac-HAHDH-NH₂ [203,204], Ac-HDHAH-NH₂ [202,203] és Ac-HGFHVH-NH₂ [205,206] peptidek komplexeire kapott pH-potenciometriás és spektroszkópiás eredményeit is felhasználtam.

4.1.1 A peptidek sav-bázis tulajdonságai [202-205]

A vizsgált ligandumok protonálódási állandó értékeit a pH-potenciometria módszerével határoztuk meg, és a szabad ligandumokra számított deprotonálódási állandó értékeket irodalmi adatokkal kiegészítve az 5. táblázat tartalmazza. A táblázatban szereplő deprotonálódási állandókból azt láthatjuk, hogy a legkisebb deprotonálódási állandó érték(ek) az aszparaginsav oldalláncában található karboxilcsoport(ok)hoz köthető(k), és a pH emelésével deprotonálódnak a hisztidin oldalláncában található imidazoliumcsoportok. A $pK(\text{His})$ -értékek közötti kis különbségek arra utalnak, hogy az imidazolnitrogének deprotonálódási folyamatai átfedő lépésekben játszódnak le. Az aszparaginsav jelenléte a szekvenciában a pK -értékek kismértékű növekedéséhez vezet azon aszparaginsavat nem tartalmazó peptidekre közölt irodalmi adatokhoz képest, amelyekben a hisztidinek száma és helyzete megegyezik.

5. táblázat: A ligandumok deprotonálódási állandó (pK) értékei irodalmi adatokkal kiegészítve [$I = 0,20 \text{ mol/dm}^3$ (KCl) és $T = 298 \text{ K}$]

	pK ₁ (Asp)	pK ₂ (Asp)	pK ₁ (His)	pK ₂ (His)	pK ₃ (His)	pK ₄ (His)
Ac-HVH-NH ₂ [118]	–	–	5,88	6,82	–	–
Ac-SarHAH-NH ₂	–	–	6,01 (1)	6,76 (1)	–	–
Ac-HAAH-NH ₂ [120]	–	–	6,00	6,74	–	–
Ac-HADH-NH ₂	3,48 (6)	–	6,14 (3)	7,02 (2)	–	–
Ac-HDAH-NH ₂	3,55 (3)	–	6,20 (1)	7,01 (1)	–	–
Ac-HAHVH-NH ₂ [156]	–	–	5,67	6,24	6,83	–
Ac-HVHAH-NH ₂ [156]	–	–	5,75	6,31	6,94	–
Ac-HAHDH-NH ₂	3,43 (1)	–	5,93 (1)	6,49 (1)	7,18 (3)	–
Ac-HDHAH-NH ₂	3,42 (1)	–	5,89 (7)	6,47 (4)	7,14 (6)	–
Ac-HAAHVH-NH ₂ [120]	–	–	5,69	6,31	6,81	–
Ac-HAAHGH-NH ₂ [120]	–	–	5,80	6,36	7,00	–
Ac-HGFHVH-NH ₂	–	–	5,75 (1)	6,34 (1)	6,96 (1)	–
Ac-HADHAH-NH ₂	2,83 (3)	–	5,90 (2)	6,48 (8)	7,11 (1)	–
Ac-S3H4-NH ₂ [148]	–	–	5,51	6,15	6,45	7,19
Ac-HDHAHDH-NH ₂	2,96 (2)	3,72 (1)	5,75 (1)	6,38 (1)	6,66 (1)	7,17 (1)

4.1.2. Cu(II)-komplexek potenciometriás és spektrális vizsgálatai [202,203,205]

Minden peptid esetében megvizsgáltuk a réz(II)ionok jelenlétében bekövetkező komplexképződési folyamatokat. A komplexek sztöchiometriáját és stabilitási állandó értékeit különböző fémion-ligandum arányok mellett a pH-potenciometria módszerével határoztuk meg. A komplexképződés minden vizsgált peptid esetén pH = 4 körül kezdődött, és egy extra lúgfogyasztó folyamatot tapasztaltunk a szabad ligandum titrálási görbéjéhez képest, ami az amidnitrogének deprotonálódásához és koordinációjához köthető. A kapott eredmények azt mutatták, hogy a négytagú peptidnél csak egymagvú, az öt- és hattagú peptidnél az egymagvú komplexek mellett kétmagvú, míg a héttagú peptideknél hárommagvú komplexek is képződnek. A kapott stabilitási állandó értékeit a 6. táblázat tartalmazza. Mivel a különböző ligandumok azonos sztöchiometriájú komplexeinek töltése eltérő, ezért a továbbiakban a komplexek töltését az egyszerűség kedvéért nem tüntettem fel.

6. táblázat: A Cu(II)-peptid rendszerekben képződő komplexek stabilitási állandói ($\log\beta$) [$I = 0,20 \text{ mol/dm}^3$ (KCl) és $T = 298 \text{ K}$]

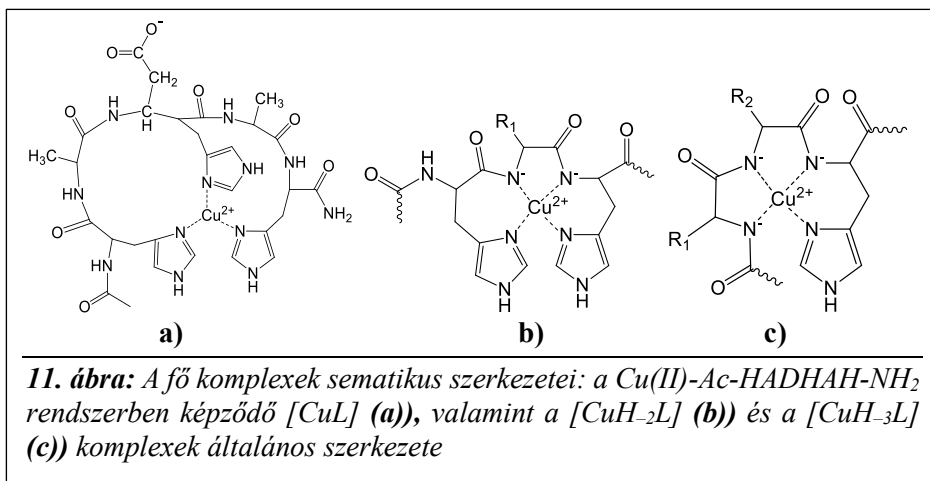
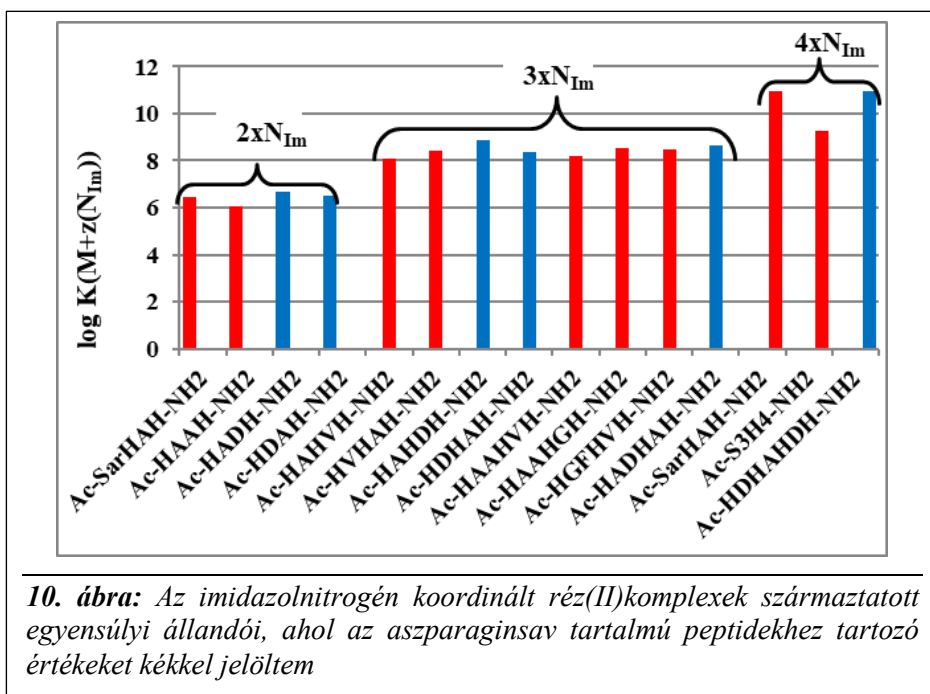
$\log\beta$ [$M_p H_q L_r$]	Ac-SarHAH-NH ₂	Ac-HADH-NH ₂	Ac-HDAH-NH ₂	Ac-HAHDH-NH ₂	Ac-HDHAH-NH ₂	Ac-HGFHVH-NH ₂	Ac-HADHAH-NH ₂	Ac-HDHAHDH-NH ₂
[CuL ₂]	10,96 (5)	–	–	–	–	–	–	–
[CuH ₃ L]	–	–	–	–	–	–	–	25,10 (3)
[CuH ₂ L]	–	–	–	18,28 (8)	17,57 (6)	–	–	–
[CuHL]	–	–	–	13,66 (6)	13,49 (2)	13,28 (4)	13,64 (2)	16,54 (2)
[CuL]	6,45 (2)	6,70 (4)	6,50 (4)	8,89 (4)	8,38 (2)	8,49 (1)	8,65 (2)	10,95 (5)
[CuH ₁ L]	–	–0,07 (1)	–0,25 (8)	1,98 (7)	1,49 (3)	1,07 (4)	–	–
[CuH ₂ L]	–6,21 (2)	–8,07 (9)	–7,37 (6)	–5,23 (6)	–6,08 (3)	–6,80 (6)	–6,20 (4)	–4,36 (6)
[CuH ₃ L]	–15,45 (4)	–16,40 (9)	–16,56 (9)	–15,47 (7)	–16,9 (1)	–15,89 (6)	–15,70 (6)	–14,61 (8)
[Cu ₂ H ₂ L]	–	–	–	–	–	–	–1,02 (6)	3,26 (3)
[Cu ₂ H ₃ L]	–	–	–	–	–8,09	–	–7,54 (4)	–
[Cu ₂ H ₄ L]	–	–	–	–	–17,7 (3)	–	–14,64 (5)	–12,16 (5)
[Cu ₂ H ₅ L]	–	–	–	–	–29,8 (3)	–	–23,64 (8)	–22,59 (8)
[Cu ₂ H ₆ L]	–	–	–	–	–	–	–34,54 (7)	–33,84 (6)
[Cu ₃ H ₅ L]	–	–	–	–	–	–	–	–14,6 (1)
[Cu ₃ H ₆ L]	–	–	–	–	–	–	–	–23,75 (5)
[Cu ₃ H ₇ L]	–	–	–	–	–	–	–	–32,87 (2)

A horgonycsoport szerepét minden esetben a hisztidin imidazolil-csoportja tölti be. Az imidazolkoordinálta komplexek a 4-7 közötti pH-tartományban vannak jelen. Mivel a peptidekben található hisztidinek számától és az egyéb protonálódásra képes donorcsoportoktól függ a komplexek protonáltsági foka, ezért az összehasonlításra az imidazol-koordinációjú komplexekre kiszámítható származtatott állandók ((16), (17) egyenlet) alkalmasak (7. táblázat, 2-5 oszlop). A könnyebb átláthatóság érdekében a 10. ábrán feltüntetett oszlopdiagramon is láthatóak a jellemző imidazolnitrogén koordinált komplexek származtatott egyensúlyi állandó értékei.

Ezek az adatok egyértelműen mutatják, hogy a komplexek stabilitása a koordinálódó imidazolnitrogének számának növekedésével párhuzamosan nő. Ha összehasonlítjuk az azonos számú koordinálódó imidazolcsoportot tartalmazó komplexek stabilitását, akkor azt látjuk, hogy a kapott adatok közel hasonlóak, ugyanakkor az aszparaginsav oldallánc általában kissé növeli az imidazolkoordinált komplexek stabilitását, amelyet a karboxilátcsoport(ok) gyenge kölcsönhatásának tulajdonítottunk.

7. táblázat: A képződő komplexek származtatott állandó értékei

	$\log K(\text{Cu(II)} + \text{N}_{\text{Im}})$	$\log K(\text{Cu(II)} + 2\text{N}_{\text{Im}})$	$\log K(\text{Cu(II)} + 3\text{N}_{\text{Im}})$	$\log K(\text{Cu(II)} + 4\text{N}_{\text{Im}})$	$\text{p}K(\text{amid})_1$	$\text{p}K(\text{amid})_2$	$\text{p}K(\text{amid})_3$
Ac-HVH-NH ₂ [118]	–	6,63	–	11,58	6,25 (átlag)		10,34
Ac-SarHAH-NH ₂	–	6,45	–	10,96	6,33 (átlag)		9,24
Ac-HAAH-NH ₂ [120]	–	6,08	–	–	7,01	7,12	8,34
Ac-HADH-NH ₂	–	6,70	–	–	6,77	8,00	8,33
Ac-HDAH-NH ₂	–	6,50	–	–	6,75	7,12	9,19
Ac-HAHVH-NH ₂ [156]	–	6,25	8,08	–	6,81	7,12	9,96
Ac-HVHAH-NH ₂ [156]	–	6,39	8,42	–	6,59	7,40	9,53
Ac-HAHDH-NH ₂	4,61	6,48	8,89	–	6,91	7,21	10,24
Ac-HDHAH-NH ₂	3,96	6,35	8,38	–	6,89	7,57	10,81
Ac-HAAHVH-NH ₂ [120]	–	6,22	8,17	–	7,04	7,97	9,40
Ac-HAAHGH-NH ₂ [120]	–	6,02	8,55	–	7,02	7,43	9,05
Ac-HGFHVH-NH ₂	–	6,32	8,49	–	7,42	7,87	9,80
Ac-HADHAH-NH ₂	–	6,53	8,65	–	7,42 (átlag)		9,50
Ac-S3H4-NH ₂ [148]	–	5,89	7,41	9,29	–		–
Ac-HDHAHDH-NH ₂	4,89	–	9,37	10,95	7,65 (átlag)		10,25



A korábban vizsgált multihisztidin peptidekhez hasonlóan az imidazolkoordinált komplexek képződése nem tudja megakadályozni az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját. Minden esetben a horgonycsoport szerepét az a hisztidin rész jelenti, amelyhez kötődve a Cu(II)-ion indukálja a peptidkötésben lévő nitrogénatom deprotonálódását és koordinálódását. A pH emelésével megtörténik az egy-, két-, illetve három

amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja, melynek eredményeként $[\text{CuH}_1\text{L}]$, $[\text{CuH}_2\text{L}]$ és $[\text{CuH}_3\text{L}]$ komplexek képződnek. Az ezen folyamatokra jellemző deprotonálódási állandók a 7. táblázat utolsó három oszlopában található.

A kialakuló imidazol-, $[\text{N}_{\text{Im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}]$ és $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}]$ koordinációjú komplexek sematikus szerkezetét mutatja be a 11. ábra. Ezeket a koordinációs módokat a spektroszkópiai vizsgálatok eredményei is alátámasztják, melyeket a függelék F1. és F2. táblázataiban tüntettem fel.

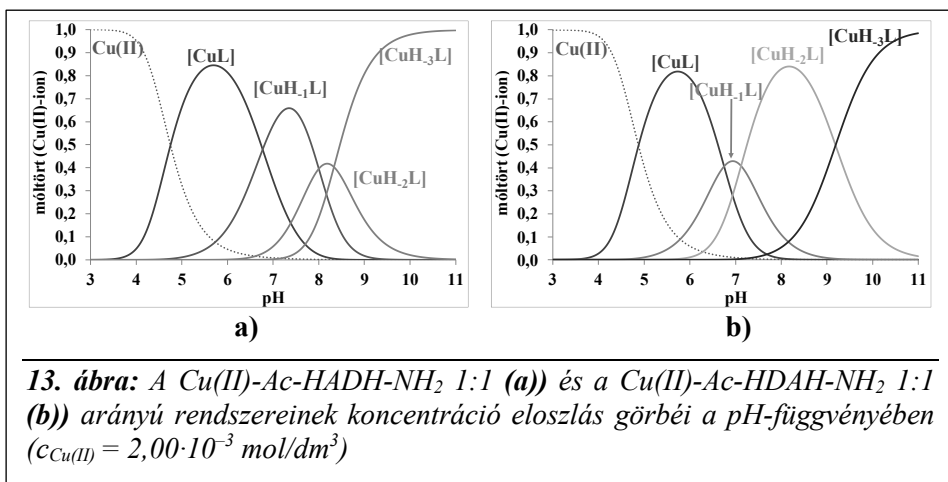
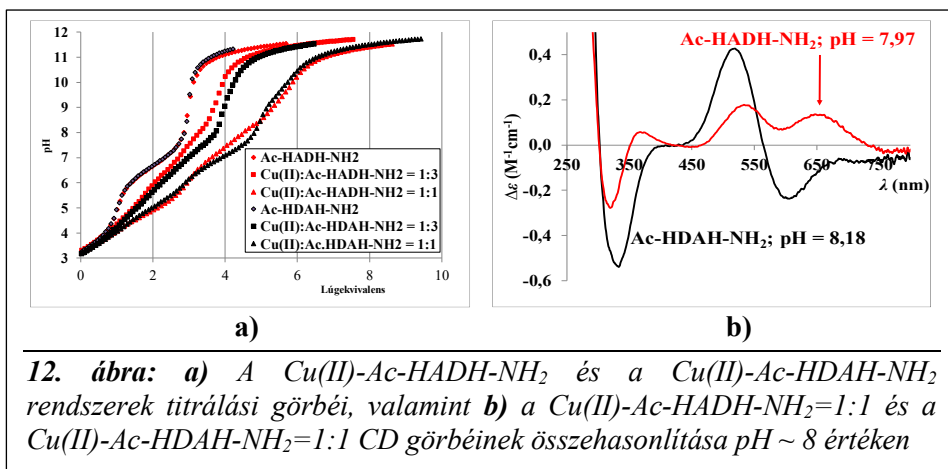
A $-\text{HXH}-$ szekvenciát tartalmazó peptidek $[\text{CuH}_2\text{L}]$ komplexe esetén $[\text{N}_{\text{Im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}]$ koordinációt feltételeztünk. Ennek megfelelően a (21) empirikus képlet alapján a várható λ_{max} érték 540 nm (feltéve, hogy a donortatomok egy síkban helyezkednek el). A mért λ_{max} értékek ezeknél a peptideknél 530-560 nm között vannak, ami megegyezik a feltételezett koordinációs móddal. A nagyobb hullámhossznál megjelenő abszorpciós maximumot az aszparaginsav tartalmú $\text{Ac}-(\text{HX})_n\text{H}-\text{NH}_2$ peptidek $[\text{CuH}_2\text{L}]$ komplexe esetén kaptuk, ami a karboxilátcsoport axiális koordinációjára utal. Az $\text{Ac}-\text{HXYH}-\text{NH}_2$ szekvenciájú peptidek $[\text{CuH}_2\text{L}]$ komplexére kapott λ_{max} érték nagyobb a $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}]$ koordinációs módra vártnál (a (21) egyenletből számítva $\lambda_{\text{max}} = 582$ nm), amely az N-terminális hisztidin és/vagy a karboxilátcsoport axiális koordinációját mutatja. Az $\text{Ac}-\text{HXYHZH}-\text{NH}_2$ szekvenciájú peptidek esetén legalább kétféle koordinációs módú $[\text{CuH}_2\text{L}]$ komplex jelenik meg, amelyek arányáról a későbbiekben látható CD adatokból kaphatunk pontosabb képet.

A $[\text{CuH}_3\text{L}]$ komplexet az $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}]$ koordinációs mód jellemzi, amit a spektrális adatok is megerősítenek ((21) egyenletből számítva $\lambda_{\text{max}} = 522$ nm). Azonban az aszparaginsavat tartalmazó peptidek komplexeire meghatározott λ_{max} értékekben kismértékű eltolódás figyelhető meg.

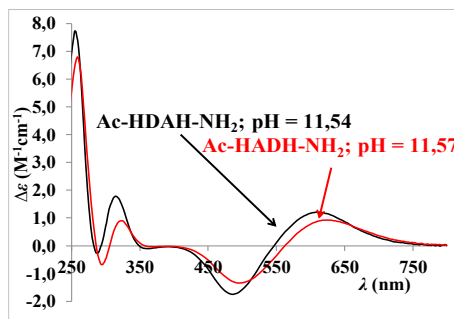
A CD spektroszkópiai adatokból további következtetéseket lehet levonni. Mivel a kiértékelések során hasonló eredményeket kaptunk, mint amit a korábbi vizsgálatok alapján az irodalmi áttekintésben már ismertettem, ezért a továbbiakban az eltéréseket mutatom be.

4.1.2.1. Két hisztidint tartalmazó tetrapeptidek

A $\text{Cu(II)-Ac-HADH-NH}_2$ és a $\text{Cu(II)-Ac-HDAH-NH}_2$ rendszerek 1:1 arányú titrálási görbéinek összehasonlításakor a komplexképződési folyamatokban eltérés mutatkozott az 5-11 pH-tartományban, amit a két görbe titrálási görbéiről láthatunk (12. a) ábra), valamint a két peptide $\sim 8,0$ -as pH-n kapott CD spektrumok összehasonlítására használt 12. b) ábra is mutat. Megállapítható a spektrumok alapján, hogy az Ac-HADH-NH_2 ligandum $[\text{CuH}_1\text{L}]$ komplexében, illetve az Ac-HDAH-NH_2 peptid $[\text{CuH}_2\text{L}]$ komplexében részt vesz a karboxilátcsoport a koordinációban. Ez a kölcsönhatás összhangban van a két tetrapeptidre kapott $\text{pK}(\text{amid})_2$ és $\text{pK}(\text{amid})_3$ értékeivel



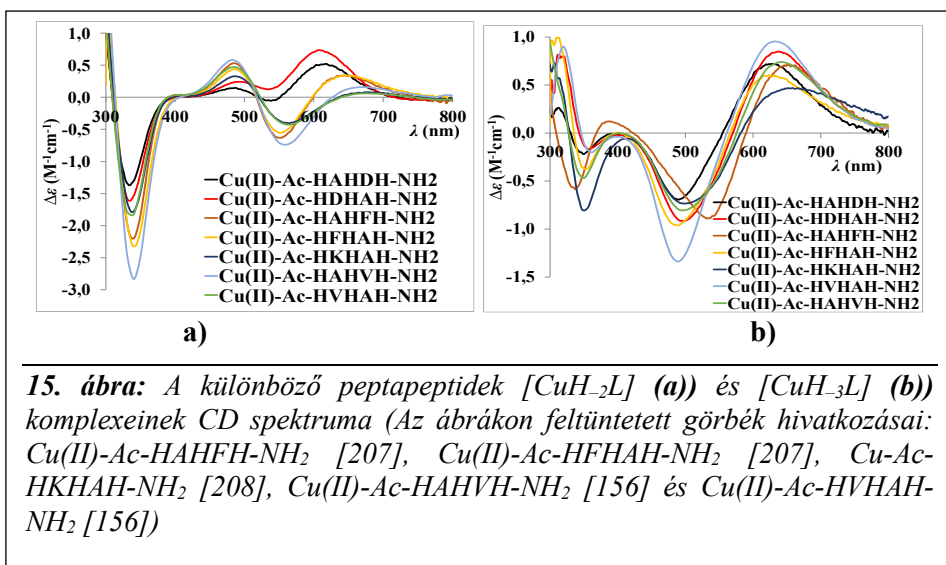
(lásd a 6. táblázat, valamint 13. ábra), hiszen az Ac-HADH-NH₂ pK(amid)₂ és az Ac-HDAH-NH₂ peptid esetén a pK(amid)₃ értéke nagyobb az összehasonlításra használt peptidek adataitól. Ezek az adatok megerősítik azt a megállapítást, miszerint a koordinált karboxilát-csoport akadályozza a következő amidnitrogén deprotonálódását. Ugyanakkor a karboxilát-csoport nincs hatással a [CuH₃L] komplexek szerkezetére, a CD spektrumok hasonlóak (14. ábra), és jól egyeznek az irodalomból ismert Ac-HAAH-NH₂ [120] ligandum réz(II)komplexe spektrumával.



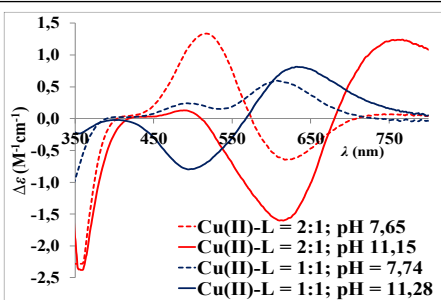
14. ábra: A Cu(II)-Ac-HADH-NH₂=1:1 és a Cu(II)-Ac-HDAH-NH₂=1:1 CD görbéinek összehasonlítása pH ~ 11,5 értéken

4.1.2.2. Három hisztidint tartalmazó pentapeptidek

Az Ac-HXHZH-NH₂ peptidek [N_{lm}, N⁻, N⁻, N_{lm}] vagy [N⁻, N⁻, N⁻, N_{lm}] koordinációs móddal kötődő komplexekben a fémion a C-terminális hisztidinhez vagy a közbenső hisztidinhez is kapcsolódhat, ezáltal koordinációs izomer szerkezeteket kialakítva. A korábbi vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy kedvezményezettebb a C-terminális hisztidin részvételével kialakuló fémion-ligandum kölcsönhatás. Ha összehasonlítjuk az egyéb oldalláncot (például valint, alanint, fenilalanint, lizint) [156,207,208] tartalmazó peptidek [CuH₂L] komplexeinek spektrális paramétereit az aszparaginsavat is tartalmazó pentapeptidekével, akkor különbséget látunk, mert a karboxilát-csoport koordinációja jelentős eltérést eredményez a CD spektrumokban (15. a) ábra). Ez a megfigyelés független attól, hogy az aszparaginsav a molekula C- vagy N-terminális részén található. Ugyanakkor ez a különbség az aszparaginsav tartalmú pentapeptidek [CuH₃L] komplexeinél nem volt megfigyelhető (15. b) ábra).

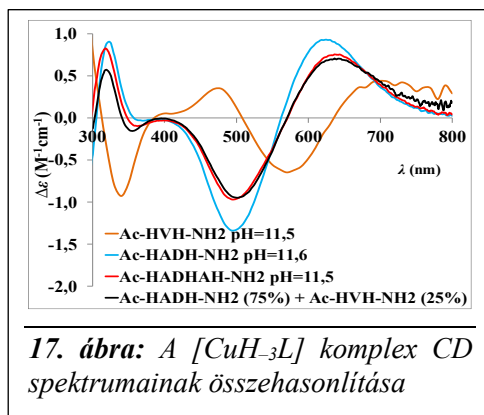


Az egynél több hisztidin jelenléte a molekulában egynél több fémion megkötését és ezáltal kétmagvú komplexek kialakulását teszi lehetővé. Az Ac-HDHAH-NH₂ peptid esetén megfigyeltünk kétmagvú komplexek kialakulását, míg az Ac-HAHDH-NH₂ peptidnél a fémionfelesleg csapadékképződéshez vezetett. A kétmagvú komplexek kialakulását a CD spektroszkópiai mérések alátámasztották, ugyanis a $Cu(II)$ -Ac-HDHAH-NH₂ = 2:1 arányú rendszerének CD spektrumai eltérnek az 1:1 fémion-ligandum arányú spektrumoktól. Ezt szemlélteti a 16. ábra.



4.1.2.3. Három hisztidint tartalmazó hexapeptidek

Az Ac-HXXHZH-NH₂ peptidek esetén a fémionok kötődése a C-terminális és a közbelső hisztidinhez különböző koordinációs módokat eredményez. A CD vizsgálatok segítségével a koordinációs izomerek aránya megbecsülhető (17. ábra és 8. táblázat).



8. táblázat: Három hisztidint tartalmazó hexapeptidek –HXZH–, illetve –HXH– részén koordinált Cu(II)-komplexek becsült aránya

	Ac-HGFHVH-NH ₂	Ac-HADHAH-NH ₂	Ac-HAAHVH-NH ₂ [120]
[CuH ₂ L]	50:50	60:40	10:90
[CuH ₃ L]	60:40	75:25	80:20

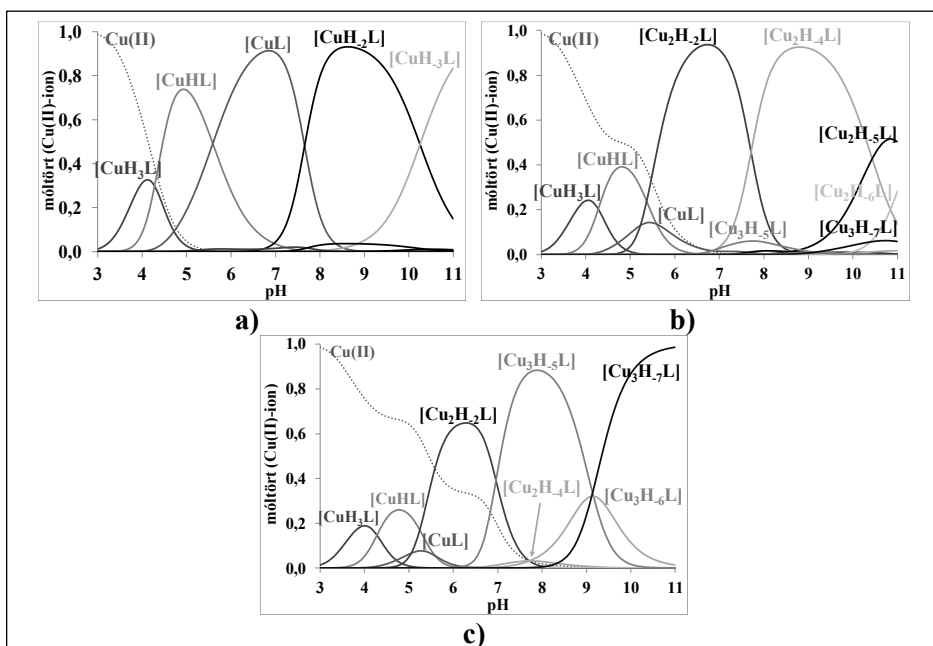
Az Ac-HGFHVH-NH₂ ligandumnál az izomerek arányát az Ac-HGGH-NH₂ [120] és az Ac-HVH-NH₂ [118] réz(II)komplexei CD spektrumainak összegzésével becsültük meg, míg az Ac-HADHAH-NH₂ esetén az Ac-HADH-NH₂ és az Ac-HVH-NH₂ [118] réz(II)komplexeire kapott spektrumokat használtuk. Minkét esetben a modellpeptidek eltérő szekvenciája miatt csak hozzávetőleges arányt tudtunk meghatározni.

A függelék F1. táblázatában összegyűjtött adatok jól tükrözik, hogy a közbelső hisztidint megelőző aszparaginsav és fenilalanin jelenléte növeli azon komplexek arányát, amelyekben a fémion a molekula közbelső részéhez koordinálódik. A fenilalanin esetén az irodalomból ismert aromás gyűrű és a Cu(II)-ion közötti „stacking” kölcsönhatás [163], valamint a pentapeptidekhez hasonlóan az aszparaginsav karboxilátcsoportjának axiális kölcsönhatása miatt a fémion ezt a koordinációs környezetet részesíti előnyben. Mindkét ligandum [CuH₃L] komplexénél, az Ac-HAAHVH-NH₂ [120] peptidhez hasonlóan,

tovább nő a réz(II)ionok közbenső hisztidinhez való koordinációjának aránya. Összességében megállapítható, hogy a –HXZH– szekvencia sztérikusan kedvezőbb pozíciót kínál az $[N^-, N^-, N^-, N_{lm}]$ koordinációs mód számára, mint a –HXH– szekvenciát tartalmazó C-terminális rész.

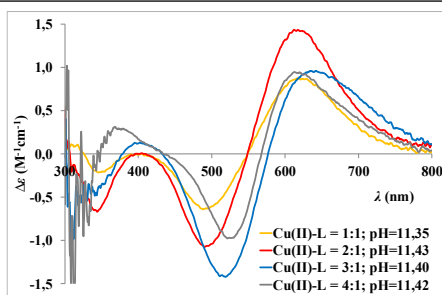
4.1.2.4. Négy hisztidint tartalmazó heptapeptidek

Az Ac-HDHAHDH-NH₂ heptapeptidnél a réz(II)ion-ligandum arányától függően egy-, két- és hárommagvú komplexek is keletkeztek. A hisztidinek, mint független horgonycsoportok akár három Cu(II)-iont is képesek megkötni. Ekvimoláris oldatban az egymagvú komplexek, 2:1 fémion-ligandum aránynál a kétmagvú, míg 3:1 fémion-ligandum arányú minta esetén már a hárommagvú komplexek a meghatározóak, amit a spektrális paraméterek is alátámasztanak (18. és a 19. ábrák).



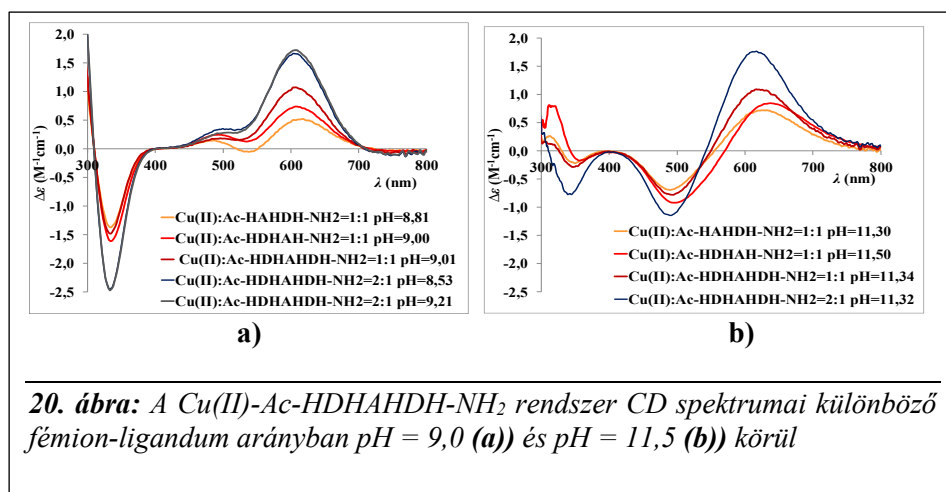
18. ábra: A Cu(II)-Ac-HDHAHDH-NH₂ 1:1 (a)), 2:1 (b)) és 3:1 (c)) arányú rendszereinek koncentráció eloszlás görbéi a pH-függvényében ($c_L = 2,21 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

Kétmagvú komplexek esetén koordinációs izomer szerkezetek kialakulása is várható. A pH ~ 9 körül képződő $[\text{Cu}_2\text{H}_4\text{L}]$ komplex CD spektruma hasonló az aszpraginsavat tartalmazó Ac-HXHZH-NH₂ pentapeptidekéhez (20. a) ábra). Az erősen lúgos közegben képződött $[\text{Cu}_2\text{H}_5\text{L}]$ komplex spektruma azonban az



19. ábra: A Cu(II)-Ac-HDHAHDH-NH₂ rendszer CD spektrumai a Cu(II)-L arány függvényében (pH = 11,0)

Ac-HAHDH-NH₂ ligandum spektrumára hasonlít és eltér a fent említett pentapeptid kétmagvú komplexeinek spektrumától (20. b) ábra). Ez megerősíti azt a következtetést, hogy a fémion számára (akár a C-, akár az N-terminális irányában van) a –HDH– szekvencia a fő kötőhely.

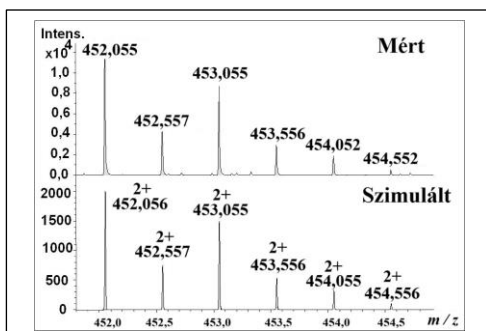


20. ábra: A Cu(II)-Ac-HDHAHDH-NH₂ rendszer CD spektrumai különböző fémion-ligandum arányban pH = 9,0 (a) és pH = 11,5 (b) körül

4.1.3. Cu(II)-hexapeptid komplexek ESI-MS vizsgálatai

A Cu(II)-Ac-HADHAH-NH₂ rendszer komplexei képződésének igazolására ESI-MS és ESI-MS/MS vizsgálatokat is végeztünk. A méréseknél

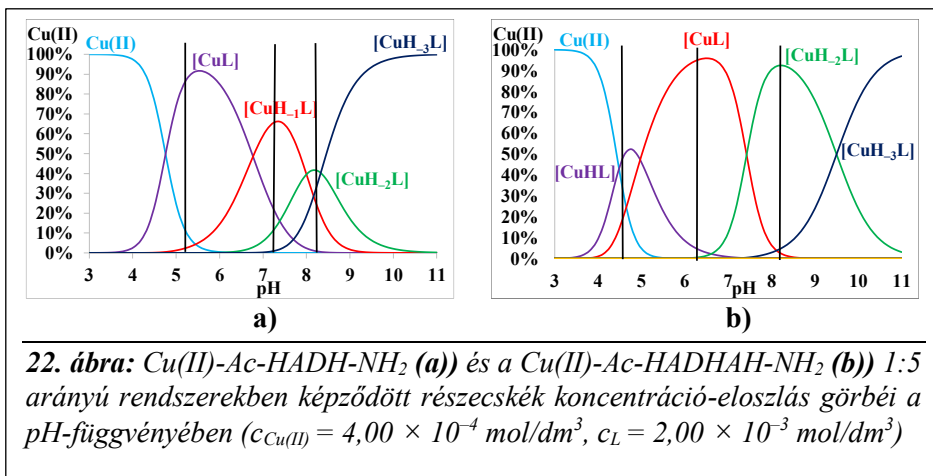
kapott tömegspektrumokból a $[\text{CuH}_2\text{L}]$ és $[\text{CuH}_3\text{L}]$ komplexeket is azonosítottuk. A 21. ábrán a $[\text{CuH}_2\text{L}]$ komplex 452,055 tömeg/töltés (m/z) értéknél jelentkező csúcsának mért és szimulált izotópeloszlását láthatjuk. Az ábra alapján megállapíthatjuk, hogy a mért molekulacsúcs megegyező lefutású a szimulált molekulacsúcsával, illetve a megfelelő m/z értékek is megegyeznek egymással.



21. ábra: A $\text{Cu(II)}\text{-Ac-HADHAH-NH}_2$ rendszer 452,055 m/z értéknél jelentkező $[\text{CuH}_2\text{L}]$ komplex – $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{K}_3\text{N}_{13}\text{O}_9\text{Cu}^{2+}$ – csúcsának mért (fent) és szimulált (lent) izotóp eloszlása

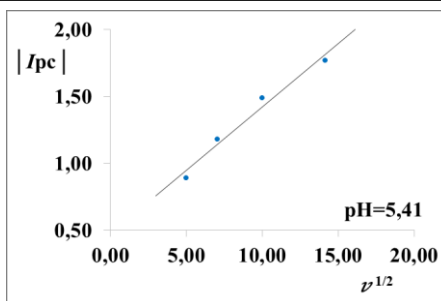
4.1.4. A Cu(II) -komplexek elektrokémiai tulajdonságai

Az elektrokémiai mérések során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az aszparaginsav oldallánc hogyan befolyásolja a réz(II)komplexek redoxi tulajdonságait. A vizsgálatokat 1:5 fémion-ligandum arányoknál végeztem, ennek megfelelően első lépésként a meghatározott stabilitási állandók ismeretében a rendszerekre jellemző koncentráció-eloszlás görbéket készítettem el a pH-függvényében. Két rendszer, a $\text{Cu(II)}\text{-Ac-HADH-NH}_2$ és a



Cu(II)-Ac-HADHAH-NH₂ rendszerek, koncentráció-eloszlás görbéit mutatja be a 22. a) és b) ábra, amelyeken függőleges vonal jelzi a ciklikus voltammetriás mérés során beállított pH-értékeket. A méréseket azokon a pH-értékeken végeztem, amelyeken az adott komplex az oldatban túlnyomó többségben van jelen. Minden esetben első lépésként a szabad ligandum ciklikus voltamogramját rögzítettem és azt tapasztaltam, hogy a peptidek nem vesznek részt redoxi folyamatban. A 100 mV/s pásztázási sebesség mellett rögzített pH-függő voltammogramot mutatom be a függelék F1. ábráján.

A mérések során beállított paramétereket, a primer adatokat és a számított eredményeket a függelék F3. táblázata tartalmazza a Cu(II)-Ac-HADH-NH₂ 1:5 arányú rendszerben. Az adatok alapján feltételezhető az egyelektronos kvázireverzibilis folyamat, hiszen a katódos és az anódos csúcsáram értékének aránya közel egy, illetve egyenessel jellemezhető, ha a katódos csúcsáram abszolút értékeit ábrázoljuk a pásztázási sebesség négyzetgyökének függvényében (23. ábra).



23. ábra: A katódos csúcsáram abszolút értékeinek változása a pásztázási sebesség négyzetgyökének függvényében.

A mérési eredmények alapján az anódos és a katódos csúcsokhoz tartozó két potenciál érték közötti különbség nagyobb, mint az irodalomban megtalálható 0,059 V érték, illetve a Cu(II)-komplexekre jellemző 0,180 V körüli érték [191]. Az eltérés adódhat abból, hogy az elektród felületén egy lassú elektrontranszfer folyamat játszódik le. Az elektród felületéhez sokkal lassabban történik egy nagyobb részecske diffúziója, mint egy kisebb komplexmolekuláé, valamint a fémion koordinációjával kialakuló komplexnek a geometriáját nehezebb megváltoztatnia a redukció során. Mivel a réz(II)komplexek geometriája általában tetragonálisan torzult oktaéderes, a réz(I)komplexek pedig torzult tetraéder,

lineáris vagy síkháromszöges szerkezetet képesek felvenni, ezért a geometriaváltás nehézségbe ütközik. Annak a megállapítására, hogy a méréseim során reverzibilis folyamat játszódik-e le, minden pH-n több pásztázási sebesség (25, 50, 100, 200 mV/s) alkalmazása mellett rögzítettem a voltammogramokat, melyet a Cu(II)-Ac-HADHAH-NH₂ rendszer esetében mutatok be a függelék F2. ábráján.

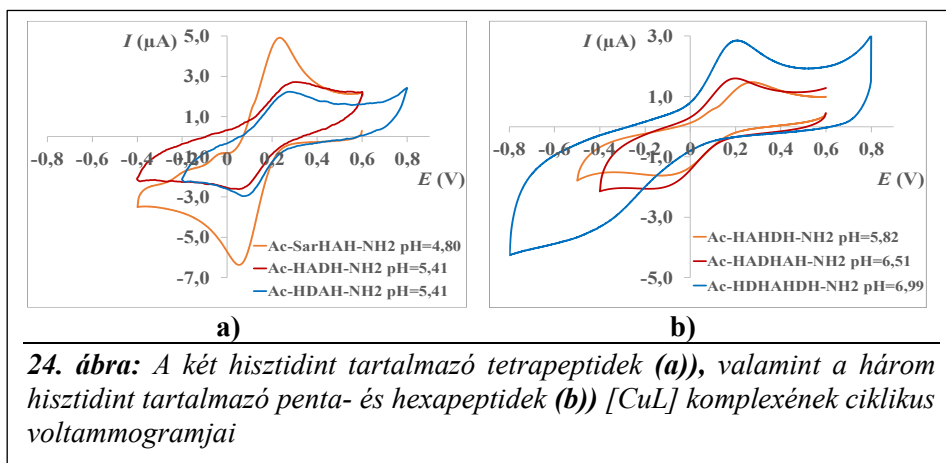
A különböző koordinációs móddal rendelkező részecskék elektrokémiai paramétereit a 9. táblázat, valamint a függelék F4. táblázata tartalmazza.

9. táblázat: *A ligandumok Cu(II)-komplexének redoxipotenciál értékei (NHE-hez viszonyítva)*

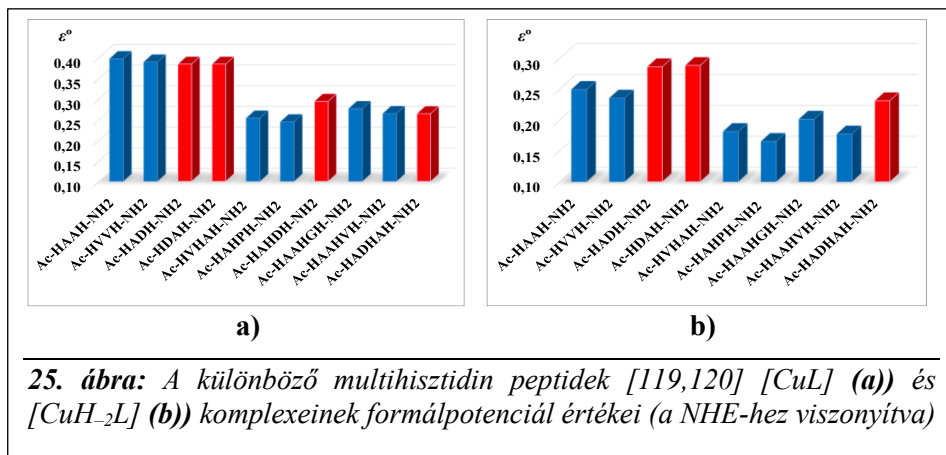
Koordinációs mód	2xN _{Im}	3xN _{Im}	4xN _{Im}	[N _{Im} ,N ⁻ ,N _{Im}]	[N _{Im} ,N ⁻ ,N ⁻ ,N _{Im}]
	[CuL]		[CuL ₂]		
Ac-SarHAH-NH ₂	0,353 V	–	0,297 V	–	0,243 V
Ac-HVVH-NH ₂ [119,163]	0,389 V	–	0,339 V	–	0,235 V
Ac-HAAH-NH ₂ [120,163]	0,397 V	–	0,323 V	–	0,267 V
Ac-HADH-NH ₂	0,384 V	–	–	–	0,286 V
Ac-HDAH-NH ₂	0,384 V	–	–	0,371 V	0,288 V
	[CuHL]	[CuL]		[CuH ₋₁ L]	[CuH ₋₂ L]
Ac-HVHAH-NH ₂ [119,163]	–	0,253 V	–	–	0,181 V
Ac-HAHPH-NH ₂ [119,163]	–	0,244 V	–	–	0,165 V
Ac-HAAHGH-NH ₂ [120,163]	0,334 V	0,276 V	–	0,214 V	0,201 V
Ac-HAAHVH-NH ₂ [120,163]	0,329 V	0,264 V	–	0,202 V	0,177 V
Ac-HAHDH-NH ₂	–	0,294 V	–	0,231 V	–
Ac-HADHAH-NH ₂	0,327 V	0,264 V	–	–	0,231 V
Ac-HDHAHDH-NH ₂	–	0,119 V	–	–	–

Az adatok és a mért voltammogramok (24. ábra) azt mutatják, hogy a 2xN_{Im} és 4xN_{Im} ([CuL] és [CuL₂]), valamint az amidkoordinált komplexek ([CuH₋₁L] és [CuH₋₂L]) CV görbéi a mérhető potenciáltartományban rögzíthetőek voltak.

Az imidazolkoordinált részecskék redoxipotenciál értékei a várt tendenciát követik [209], miszerint a koordinációs szférában lévő imidazolnitrogének számának, valamint a [CuL] komplexek stabilitásának növekedése a redoxipotenciál értékének csökkenésével jár (25. a) ábra).



24. ábra: A két hisztidint tartalmazó tetrapeptidek (a)), valamint a három hisztidint tartalmazó penta- és hexapeptidek (b)) [CuL] komplexének ciklikus voltammogramjai



25. ábra: A különböző multihisztidin peptidok [119,120] [CuL] (a)) és [CuH₂L] (b)) komplexeinek formálpotenciál értékei (a NHE-hez viszonyítva)

Az adatok azt is tükrözik, hogy az imidazolkoordinált komplexek redoxipotenciál értékei (a NHE-hez viszonyítva) hasonlóak a korábban vizsgált alifás oldalláncot tartalmazó peptidekéhez. Tehát kijelenthetjük, hogy az imidazolkoordinált komplexek redoxi tulajdonságait gyakorlatilag nem befolyásolja az aszparaginsav jelenléte a szekvenciában.

Ugyanakkor az [N_{Im}, N⁻, N⁻, N_{Im}] koordinációs környezettel rendelkező réz(II)komplexek esetén jelentősebb különbség figyelhető meg (25. b) ábra),

mert az aszparaginsavat tartalmazó peptidek $[\text{CuH}_2\text{L}]$ komplexének redoxipotenciál értéke megnövekedett a korábban vizsgált peptidekéhez képest.

A különböző típusú ligandumokkal alkotott Cu(II)-komplexek vizsgálatai azt mutatták, hogy a Cu(II)-komplex merev szerkezete nem tudja teljesíteni a Cu(I)-komplexek koordinációs követelményeit. Ez magyarázza, hogy azok a réz(II)komplexek, amelyekben a koordinálódó donorcsoportok egy síkban helyezkednek el, kis (negatív) redoxipotenciál értékekkel rendelkeznek. Ha a Cu(II)-komplexek geometriája ehhez képest torzul, akkor a redukciós folyamatban, a réz(II)iont tartalmazó részecskék redukciója során könnyen tetraéderes geometria alakulhat ki, nő a Cu(I)-komplexek stabilitása. Ezek alapján a redoxipotenciál értékek a multihisztidin peptidek $[\text{CuH}_2\text{L}]$ komplexének torzult geometriája miatt a pozitív tartományba esnek és a komplex geometriáját tovább torzítja a fémcentrum és az aszparaginsav karboxilátcsoportja közötti kölcsönhatás. [124,130-132]

4.1.5. Ni(II)-komplexek [202,204,205]

A nikkell(II)ionok jelenlétében bekövetkező komplexképződést is tanulmányoztuk. A kapott stabilitási állandó értékeit a 10. táblázat tartalmazza, kiegészítve korábban vizsgált hasonló szekvenciájú multihisztidin peptidek adataival. A vizsgált peptidek esetén a komplexképződés pH = 4 körül kezdődött és az imidazolnitrogén koordinált nikkell(II)komplexek széles pH-tartományban (pH = 4-8) vannak jelen, beleértve a fiziológiás pH-tartományt is.

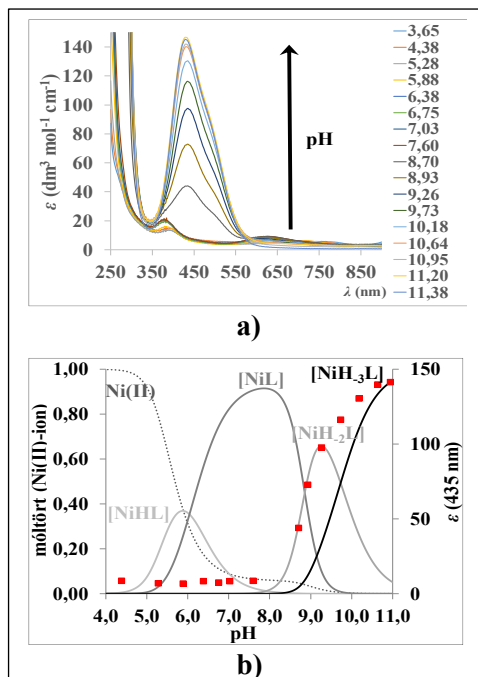
10. táblázat: A Ni(II)-peptid rendszerekben képződő komplexek stabilitási állandó ($\log\beta$) és származtatott állandó értékei

[I = 0,20 mol/dm³ (KCl) és T = 298 K]

$\log\beta$ [M _p H _q L _r]	Ac-SarHAH-NH ₂	Ac-HAANH-NH ₂ [120]	Ac-HADH-NH ₂	Ac-HDAH-NH ₂	Ac-HAHDH-NH ₂	Ac-HDHAH-NH ₂	Ac-HAAGH-NH ₂ [120]	Ac-HAAHVH-NH ₂ [120]	Ac-HGFVH-NH ₂	Ac-HADHAH-NH ₂	Ac-HDHAHDH-NH ₂
[NH ₂ L ₁]	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	18,22 (6)
[NiHL]	–	–	–	–	11,59 (3)	11,57 (8)	10,70	10,55	11,07 (3)	11,19 (4)	12,05 (9)
[NiL]	4,23 (4)	3,90	4,33(4)	4,11 (3)	5,55 (3)	5,67 (5)	4,79	4,57	5,14 (2)	5,15 (2)	6,30 (4)
[NiL ₂]	–	–	–	–	9,37 (5)	9,77 (7)	–	–	8,97 (4)	–	–
[NiH ₋₁ L]	–	–	–4,50(7)	–	–	–	–	–	–3,19 (4)	–	–2,23 (7)
[NiH ₋₂ L]	–13,06 (2)	–13,56	–	–13,71 (3)	–11,79 (3)	–11,83 (6)	–12,26	–12,91	–	–12,56 (3)	–
[NiH ₋₃ L]	–21,92 (4)	–22,48	–22,95(5)	–22,74 (3)	–21,89 (4)	–21,30 (6)	–21,21	–22,62	–20,21 (2)	–22,29 (3)	–21,51 (7)
$\log K(\text{Ni(II)}+2\text{N}_{\text{im}})$	4,23	3,90	4,33	4,11	4,41	4,43	3,70	3,74	4,11	4,08	4,39
$\log K(\text{Ni(II)}+3\text{N}_{\text{im}})$	–	–	–	–	5,55	5,67	4,79	4,57	5,14	5,15	4,88
$\log K(\text{Ni(II)}+4\text{N}_{\text{im}})$	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	6,27
pK(amid) ₁	8,65	8,73	8,83	8,91	8,67	8,75	8,52	8,74	8,33	8,85	8,53
pK(amid) ₂	–	8,92	9,27	9,03	10,10	9,47	8,95	9,71	8,51	9,73	9,64
pK(amid) ₃	8,86	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

A képzett állandók azt tükrözik, hogy hasonlóan a réz(II)ionhoz, a nikkel(II)ion esetén is kissé növeli az imidazol-koordinációjú komplexek stabilitását az aszparaginsav karboxilátcsoportjának jelenléte. Az egy-, két- és három peptidnitrogén fémion által indukált deprotonálódása és koordinációja pH = 8 felett megy végbe. Az első és a második amidnitrogének deprotonálódása jellemzően kooperatív módon játszódik le, míg a harmadik deprotonálódási lépés körülbelül egy pH-egységnél nagyobb pH-nál figyelhető meg. Az eredmények azt mutatják, hogy a peptidok a nikkel(II)ionnal egymagvú komplexeket képeznek és minden esetben a $[\text{NiH}_3\text{L}]$ komplex az uralkodó részecske pH = 9 felett. Az Ac-HAAH-NH₂ [120], Ac-HDAH-NH₂ és Ac-HGFHVH-NH₂ peptideknél a $[\text{NiL}]$ komplexből gyakorlatilag egy lépésben képződik a $[\text{NiH}_3\text{L}]$ komplex. Ez arra utal, hogy a nikkel(II)ion kötődése ezekben az esetekben a –HXZH– szekvenciához kedvezményezett. Az Ac-HADH-NH₂ peptid esetén az amid- és az imidazol donorcsoportokon kívül a karboxilátcsoport koordinációban való részvételét is feltételeztük, ezáltal egy (7,5)-tagú csatolt kelátgyűrűt kialakítva, ami a második és a harmadik amidnitrogén deprotonálódását a nagyobb pH-tartományba tolja.

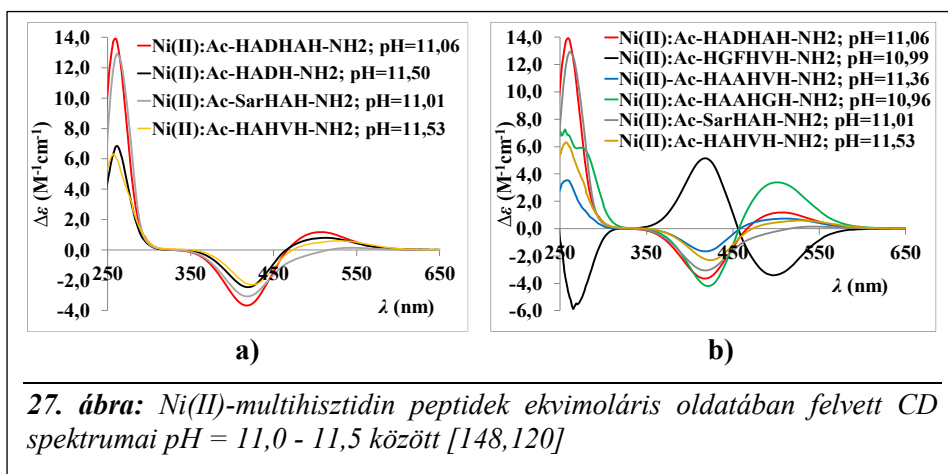
A spektroszkópai adatok alátámasztják ezeket a koordinációs módokat, azonban csak néhány esetben lehet következtetni a molekulák elsődleges fémkötési helyére. Az imidazolnitrogén koordinált komp-



26. ábra: A Ni(II)-Ac-HADHAH-NH₂ rendszer ekvimoláris oldatának UV-látható spektruma (a)) és koncentráció-eloszlás görbéje, valamint a 435 nm-en mért abszorpciós értékek a pH-függvényében (b)) ($c_L = 2,00 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

lexek geometriája oktaéderes, amit a kis intenzitású, de jellegzetes abszorpciós sávok támasztanak alá (F5. és F6. táblázat). Ezek a komplexek nem mutatnak CD aktivitást. Az amidnitrogének deprotonálódását egy intenzív sáv megjelenése kíséri 435 nm körül, melynek intenzitása a $[\text{NiH}_2\text{L}]$ és $[\text{NiH}_3\text{L}]$ komplexek képződésével párhuzamosan nő, ami a két és három amidnitrogén deprotonálódásának felel meg (26. ábra).

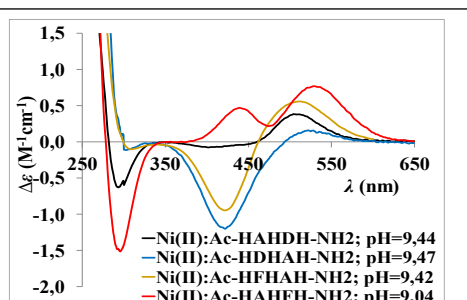
A két hisztidint tartalmazó tetrapeptidok esetén a C-terminális hisztidin imidazolnitrogén a fő horgonycsoport, az amidnitrogének deprotonálódása lúgos közegben történik. A tetrapeptidok CD spektrumai hasonlóak, azonban kisebb eltérés az Ac-SarHAH-NH₂ peptidnél figyelhető meg a hisztidinek eltérő helyzete miatt. Ugyanakkor ezen adatok alapján megállapítható, hogy a –HADH– szekvencia a fő kötőhelye az Ac-HADHAH-NH₂ peptidnek, hiszen a CD spektruma hasonló az Ac-HADH-NH₂ peptidéhez, de kismértékben különbözik az Ac-HAHVH-NH₂ [148] és az Ac-SarHAH-NH₂ peptidok spektrumától (27. a) ábra).



Hasonló következtetés vonható le a többi Ac-HXZHXH-NH₂ peptid Ni(II)-komplexére is, mely megállapításra az Ac-HGFHVH-NH₂ CD spektruma egyértelmű bizonyítékot szolgáltat (27. b) ábra). Ennek a peptidnek a spektruma eltér a többi peptidétől, hiszen a d-d tartományban a Cotton-effektus ellentétes előjelű, ami azt jelenti, hogy a Ni(II)-ion a –HGFH– részhez kötődik. A korábbi

vizsgálatokból ismert (2.3.2. fejezet), hogy a –GXH– szekvenciához való kötődés ellentétes Cotton-effektust eredményez, mint az –YXH– szekvenciához való kötődés (ahol Y egy glicintől eltérő aminosav) [158].

Az Ac-HXHZH-NH₂ peptidek a korábban vizsgált peptidekhez hasonlóan viselkednek. Ezekben az esetekben arra a következtetésre jutottak korábban, hogy ha a molekula C-terminális részében egy nagyobb térkitöltésű oldallánc van jelen (akár Val, Phe), akkor ezekben a komplexekben a fémion a C-terminális és a köztes



28. ábra: *Ni(II)*-multihisztidin peptidek rendszerének ekvimoláris oldatában rögzített CD spektrumok 9,0-9,6 pH-n [204,207]

hisztidinhez is koordinálódik, koordinációs izomer szerkezeteket létrehozva [157,163]. Ez jelentősen eltérő CD-spektrumokat eredményez, különösen a [NiH₂L] komplex esetében (28. ábra).

A CD spektrumokban ez a különbség megfigyelhető a C-terminális pozícióban aszparaginsavat tartalmazó peptidek [NiH₂L] komplexénél. Ez azt is jelenti, hogy az Ac-HAHDH-NH₂ [NiH₂L] komplexében a fő kötőhely az N-terminális részen van, míg az Ac-HDHAH-NH₂ [NiH₂L] komplexében a C-terminális végen kötődik a fémion.

Ezen ismeretekből az is következik, hogy az aszparaginsav oldalláncok stabilizáló hatásúak a –HXZH– szekvenciát tartalmazó peptidek komplexeiben, míg a –HDH– szekvenciák esetében az aszparaginsav oldalláncok jelenléte sztérikusan gátolja az amidnitrogén koordinált komplexek kialakulását.

4.1.6. Zn(II)-komplexek [202,204]

A cink(II)ionok jelenlétében bekövetkező komplexképződést is különböző fémion-ligandum arány mellett tanulmányoztuk.

Az eredmények azt mutatták, hogy a peptidek a fémionnal egy stabil $[ZnL]$ komplexet képeznek, amely komplex kialakulása a cink hidrolízisét eltolja a nagyobb pH-tartomány felé. A peptidek cink(II)komplexeinek stabilitási állandóit a 11. táblázatban gyűjtöttük össze.

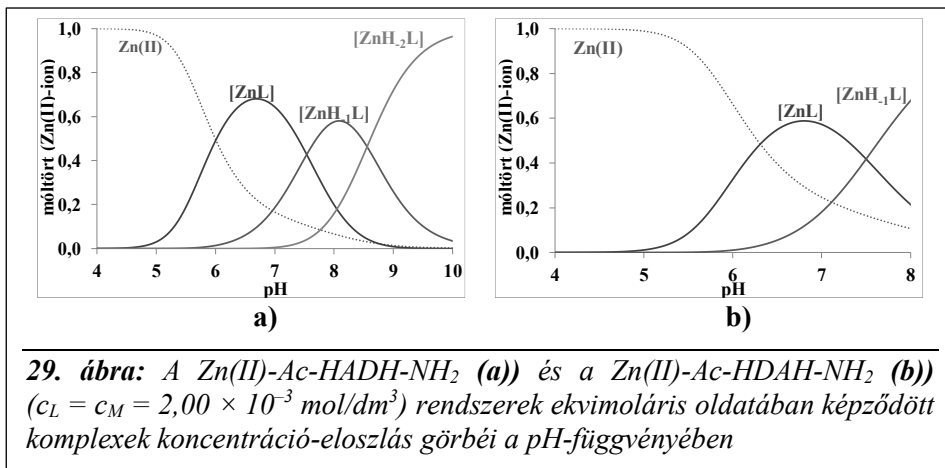
11. táblázat: A Zn(II)-ligandum rendszerekben képződő komplexek stabilitási állandó ($\log\beta$) értékei $[I = 0,20 \text{ mol/dm}^3 \text{ (KCl) és } T = 298 \text{ K}]$

$\log\beta [M_p H_q L_r]$	Ac-HADH-NH ₂	Ac-HDAH-NH ₂	Ac-HAHDH-NH ₂	Ac-HDHAH-NH ₂	Ac-HADHAH-NH ₂
$[ZnHL]$	–	–	–	10,84(8)	10,91(5)
$[ZnL]$	4,41(7)	4,01(3)	5,14(5)	5,38(3)	5,63(1)
$[ZnH_{-1}L]$	–3,13(12)	–3,49(5)	–	–	–2,40(6)
$[ZnH_{-2}L]$	–11,69(12)	–	–	–	–11,23(6)
$\log K(Zn(II)+2N_{im})$	4,41	4,01	–	3,70	3,80
$\log K(Zn(II)+3N_{im})$	–	–	5,14	5,38	5,63
$\log K([ZnL]/[ZnH_{-1}L])$	7,54	7,50	–	–	8,03
$\log K([ZnH_{-1}L]/[ZnH_{-2}L])$	8,56	–	–	–	8,83

A $[ZnHL]$ és $[ZnL]$ komplexekben a ligandum imidazolnitrogénekén keresztül koordinálódik a cink(II)ionhoz. Az imidazolkoordinált komplexekre jellemző képződési állandók valamivel nagyobbak, mint a korábban vizsgált peptideké (Ac-HVVDH-NH₂ peptid esetében: $\log\beta(ML) = 3,57$ [157], Ac-HVDHAH-NH₂: $\log\beta(ML) = 5,09$ [210]). A karboxiláts csoport kölcsönhatása a komplexek stabilitásának növekedését eredményezi. A pH emelésével általában vagy csapadékképződés, vagy vegyes hidroxidokomplexek kialakulása feltételezhető, mint a korábban vizsgált Ac-HXHZH-NH₂ peptidek esetében. A –HADH– szekvenciát tartalmazó peptideknél azonban más folyamatot figyeltünk meg, ahol az erősen lúgos tartományban sem volt megfigyelhető csapadékkiválás. Így az amidnitrogén deprotonálódását feltételeztük az extra lúgfogyasztó folyamattal párhuzamosan képződő $[ZnH_{-1}L]$ és $[ZnH_{-2}L]$ komplexekben (29. ábra).

A cink(II)ion által indukált amidnitrogén deprotonálódási folyamatokat korábban már publikálták néhány hisztidin tartalmú peptid esetén. Hasonló kölcsönhatásokat figyeltek meg az Ac-HHVGDNH₂ [210] ligandumnál, valamint

egy és két amidnitrogén deprotonálódást írtak le a HExxH és HxxEH motívummal rendelkező Ac-GHEITHG-NH_2 és az Ac-GHTIEHG-NH_2 peptidek $[\text{ZnH}_{-1}\text{L}]$ és $[\text{ZnH}_{-2}\text{L}]$ komplexekben is [211].



Az Ac-HADH-NH_2 [163] és az Ac-HADHAH-NH_2 ligandumok $[\text{ZnH}_{-1}\text{L}]$ és $[\text{ZnH}_{-2}\text{L}]$ komplexek feltételezett szerkezetének megerősítésére $^1\text{H-NMR}$ spektroszkópiai mérést végeztünk. A szabad ligandum és a $\text{Zn(II)-ligandum} = 1:3$ arányú $^1\text{H-NMR}$ spektrumait hasonló pH-értékek mellett rögzítettük.

Az aromás tartományban lévő hisztidinek imidazol H_δ és H_ϵ protonjainak jeleit követtük nyomon a $^1\text{H-NMR}$ spektrumokkal. A pH-függő $^1\text{H-NMR}$ spektrumok és a jelek hozzárendelése az Ac-HADHAH-NH_2 ligandum esetében a függelék F3. ábráján láthatók. Mindkét rendszerben a szabad ligandumokra, valamint a Zn(II)-ligandum rendszerekre rögzített spektrumok összehasonlítása azonos pH-n a függelék F4. ábráján láthatók.

A spektrális vizsgálatok megerősítették, hogy a fiziológias pH-tartományban kialakuló $[\text{ZnL}]$ komplexben a fémiont a ligandumban lévő hisztidin imidazolnitrogének koordinálják. A pH növekedésével a Zn(II)-komplexben a koordinált imidazol protonok jele mellett a szabad ligandum jelei is megjelentek (a függelék F4. ábrája). Ez azt jelenti, hogy $\text{pH} = 8$ felett az imidazolnitrogénatomok egyike a $[\text{ZnH}_{-1}\text{L}]$ komplexben egy amid-nitrogén-donorral helyettesítődik.

4.2. SOD modellpeptidek vizsgálata és eredményük

Munkám második részében olyan terminálisan védett multihisztidin peptideket szintetizáltam és vizsgáltam, amelyek a CuZnSOD enzim Cu(II)- és Zn(II)-kötőhelyeinek megfelelő aminosavszekvenciát tartalmazzák. Ezek a szekvenciárészek nevezetesen a Zn(II)-kötő HVGD (80-83. rész), a Cu(II)-kötő HVH szekvencia (46-48. rész), valamint a hisztidin (His63), amely imidazolátóhídként köti össze a két fémiont az enzim aktív centrumában:

Ac-FHVHEGPHFN-NH₂,

Ac-FHVVHAGPHFNGGHVG-NH₂,

Ac-FHVHEGPHFNGGHVGD-NH₂.

4.2.1. A peptidek sav-bázis tulajdonságai

A vizsgált peptidek protonálódási állandóit pH-potenciometriás titrálással határoztam meg, a számított deprotonálódási állandókat a 12. táblázatban gyűjtöttem össze.

12. táblázat: A ligandumok deprotonálódási állandó (pK) értékei irodalmi adatokkal kiegészítve ($I = 0,20 \text{ mol/dm}^3$ (KCl), $T = 298 \text{ K}$ és a zárójelben az adatok szórását tüntettem fel)

	$pK_1(\text{Asp})$	$pK_2(\text{Asp})$	$pK_2(\text{Glu})$	$pK_1(\text{His})$	$pK_2(\text{His})$	$pK_3(\text{His})$	$pK_4(\text{His})$
SOD-E5-N10	–	–	4,15 (3)	5,97 (2)	6,32 (1)	–	7,62 (7)
SOD-A5-G15	–	–	–	5,43 (1)	6,12 (1)	6,47 (1)	6,83 (2)
SOD-E5-D16	3,49 (1)	–	4,27 (1)	5,60 (1)	6,36 (1)	6,53 (1)	7,85 (3)
Ac-HADHAH-NH ₂	2,83		–	5,90	–	6,48	7,11
Ac-HDHAHDH-NH ₂	2,96	3,72	–	5,75	6,38	6,66	7,17

A vizsgált peptidek szerkezeti képleteit a 7. ábra mutatja be. A dekapeptid 3, míg a pentadeka- és hexadeka-peptid 4 hisztidin aminosavat tartalmaz, valamint a deka- és a hexadeka-peptid az imidazolcsoport mellett tartalmaz még aszparaginsav és glutaminsav karboxilát oldalláncokat is. A deprotonálódási állandó értékek azt mutatják, hogy savas pH-tartományban az aszparaginsav és

glutaminsav oldaláncaiban található karboxilcsoportok deprotonálódnak, amelyből a legkisebb pK értékek az aszparaginsav karboxilátcsoportjához rendelhetők. A közeg pH-jának emelésével a hisztidin oldalláncában található imidazoliumcsoportok deprotonálódása átfedő lépésekben történik, amire a $pK(\text{His})$ értékek közötti kis különbségek is utalnak, ezért a pK értékek a csoportokhoz nem rendelhetők hozzá. A SOD-E5-N10 pK értékeinek a SOD-A5-G15 és SOD-E5-D16 értékeivel való összehasonlítása azonban arra utal, hogy a SOD-A5-G15 és a SOD-E5-D16 peptidek C-terminális hisztidin imidazol-nitrogénje (HVG(D) szekvenciárész) deprotonálódása $pH = 6,5$ körül történik.

4.2.2. Cu(II)-komplexek

A réz(II)komplexek sztöchiometriai és stabilitási állandó értékeit a különböző fémion-ligandum arány mellett rögzített titrálási görbék számítógépes kiértékelésével határoztuk meg. A kapott stabilitási állandókat és a származtatott állandókat a 13. táblázat tartalmazza.

Az imidazolkoordinált komplexek a $pH = 4-7$ tartományban vannak jelen, ugyanakkor a 15-tagú peptidnél a 7-9 közötti pH-tartományban csapadékleválás volt megfigyelhető az ekvimoláris oldatban és fémion felesleg alkalmazása esetén is, ezért a komplexek stabilitási állandói csak nagyobb szórással számolhatók. A vizsgált peptidek esetén a $[\text{CuH}_x\text{L}]$ ($x = 0, 1, 2$) részecskék a két, három, illetve a négy imidazolkoordinált egységű komplexeknek felelnek meg, míg a többi hisztidin imidazolcsoport ($x = 1, 2$ esetén) protonált formában van jelen. Mivel az imidazolkoordinált részecskék stabilitási állandóinak közvetlen összehasonlítása nem lehetséges, ezért a koordinációs szférában két, három és négy imidazol-N donoratomot tartalmazó komplexekre a (16) és (17) egyenletek szerint számított származtatott egyensúlyi állandókat hasonlítom össze. Ezeket az egyensúlyi állandókat tartalmazza a 13. táblázat 15-17. sora ($\log K(M + z(N_{\text{Im}}))$).

Az értékek alapján általánosságban elmondható, hogy mind a most vizsgált peptidek és mind a korábban vizsgált aszparaginsavat is tartalmazó három

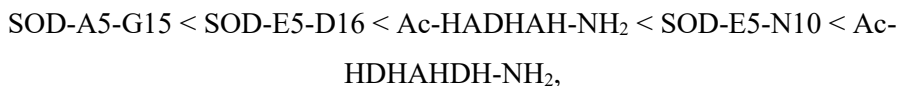
és négy hisztidin tartalmú peptidek esetén a két, három és négy imidazolkoordinált komplexek stabilitása közel azonos és az oldalláncokban lévő egy-, vagy két karboxilátcsoport jelenléte hozzájárul a komplexek stabilitásához.

13. táblázat: A különböző Cu(II)-ligandum rendszerben képződött komplexek stabilitási állandó értékei ($\log\beta$) [$T = 298\text{ K}$, $I = 0,20\text{ mol/dm}^3$ (KCl)]:

$\log\beta [\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r]$	SOD-E5-N10	SOD-A5-G15	SOD-E5-D16	Ac-HADHAH-NH ₂	Ac-HDHAHDH-NH ₂
[CuH ₃ L]	–	–	–	–	25,10
[CuH ₂ L]	–	19,21 (2)	21,18 (3)	–	–
[CuHL]	14,15 (2)	14,44 (2)	16,04 (7)	13,64	16,54
[CuL]	9,04 (2)	9,29 (2)	10,74 (6)	8,65	10,95
[CuH ₋₁ L]	1,34 (12)	2,10 (7)	2,97 (12)	–	–
[CuH ₋₂ L]	–6,56 (12)	–	–	–6,20	–4,36
[CuH ₋₃ L]	–15,58 (9)	–12,42 (18)	–13,55 (9)	–15,70	–14,61
[Cu ₂ L]	–	12,18 (8)	–	–	–
[Cu ₂ H ₋₁ L]	–	–	8,92 (12)	–	–
[Cu ₂ H ₋₂ L]	–	0,64 (3)	–	–1,02	3,26
[Cu ₂ H ₋₃ L]	–	–	–5,22 (43)	–7,54	–
[Cu ₂ H ₋₄ L]	–	–	–	–14,64	–12,16
[Cu ₂ H ₋₅ L]	–	–	–21,32 (33)	–23,64	–22,59
[Cu ₂ H ₋₆ L]	–	–28,39 (12)	–30,45 (26)	–34,54	–33,84
$\log K(\text{Cu(II)}+2\text{N}_{\text{Im}})$	6,53	5,91	6,80	6,53	–
$\log K(\text{Cu(II)}+3\text{N}_{\text{Im}})$	9,04	7,61	8,19	8,65	9,37
$\log K(\text{Cu(II)}+4\text{N}_{\text{Im}})$	–	9,29	10,74	–	10,95
$\text{p}K(\text{N}_{\text{Im}})$	5,11	4,77; 5,15	5,14; 5,30	4,99	4,28; 5,59
$\text{p}K(\text{amid})_1$	7,70	7,19	7,77	7,42 (átlag)	7,65 (átlag)
$\text{p}K(\text{amid})_2$	7,90	7,26 (átlag)	8,26 (átlag)		
$\text{p}K(\text{amid})_3$	9,02			9,50	10,25

Összehasonlítva a peptidekre kapott $\log K(\text{Cu(II)} + 3\text{N}_{\text{Im}})$ értékeket a glutaminsav karboxilátcsoporton kívül még két fenilalanint tartalmazó 10-tagú ligandumra kapott értékekkel, feltételezhető, hogy egy extra stabilizáló hatás érhető el a fémion és az aromás gyűrűk közötti “stacking” kölcsönhatásnak

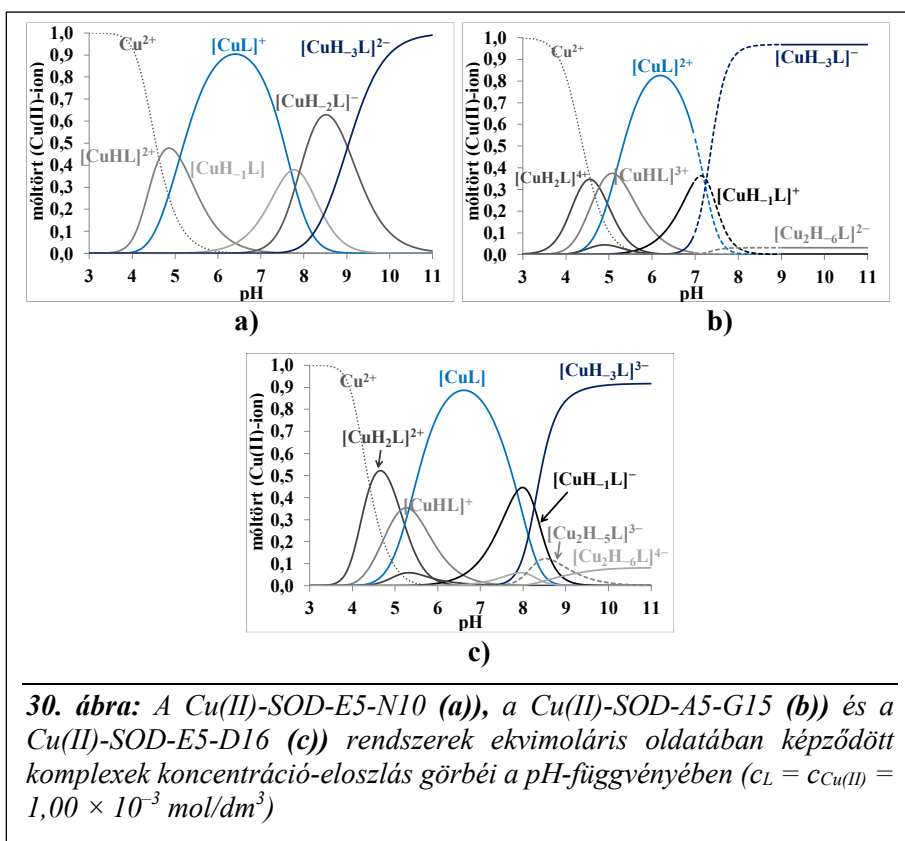
köszönhetően, ezáltal a három imidazolkoordinált komplex stabilitása az alábbi sorrendben növekszik:



míg a négy imidazolnitrogén által koordinált komplexek stabilitására a következő sorrend adható meg:



Ez a sorrend azt is mutatja, hogy az egymáshoz közel (egy vagy két aminosav távolságra) elhelyezkedő hisztidinek kötődésével létrejövő makrokelát szerkezetű komplexek kialakulása valamivel kedvezőbb, mint a távolabb elhelyezkedő hisztidineket tartalmazó peptid komplexek létrejötte. Ez az állítás összhangban van a korábbi megfigyelésekkel [148].

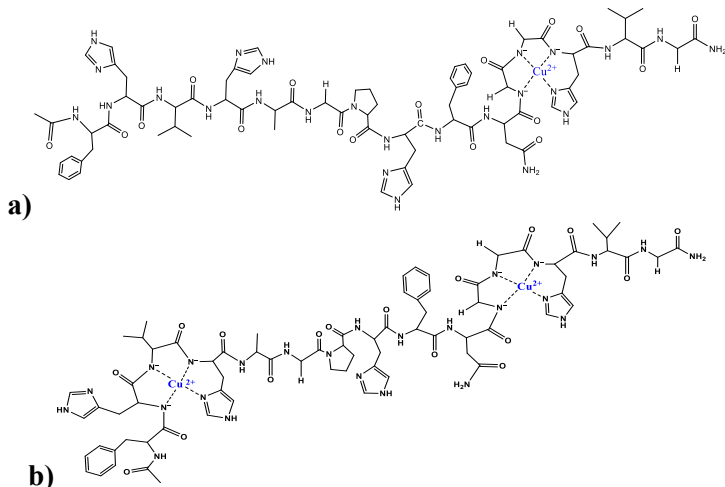


A 30. ábra a három ligandum ekvimoláris rendszerében képződött komplexek koncentráció-eloszlás görbéit ábrázolja a pH-függvényében. A 30. b) ábrán a szaggatott vonallal jelzett pH-tartományban az oldatban csapadék volt jelen. Ezeket a pH-potenciometriai adatokat a kiértékeléskor nem vettük figyelembe. Minden esetben a stabil három és/vagy négy imidazol-koordinációjú komplexek az uralkodó részecskék az enyhén savas és a fiziológias pH-tartományban.

A korábban vizsgált multihisztidin peptidekhez hasonlóan azonban az imidazolkoordinált komplexek kialakulása nem tudja megakadályozni az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját. Minden esetben a hisztidin imidazolcsoportja a horgonycsoport, amely az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját indukálja. A pH növelésével egy, két és három amidcsoport deprotonálódása és koordinációja megy végbe, ami $[\text{CuH}_{-1}\text{L}]$, $[\text{CuH}_{-2}\text{L}]$ és $[\text{CuH}_{-3}\text{L}]$ komplexek kialakulásához vezet. A 15-tagú- és a 16-tagú peptidek esetében a második és harmadik amidnitrogén deprotonálása kooperatív módon történik. E folyamatokra vonatkozó lépcsőzetes deprotonálási állandók a 13. táblázat utolsó négy sorában találhatók.

A kapott $pK(\text{amid})$ értékek azt mutatják, hogy a CuZnSOD enzim kötőhelyeit utánzó peptidek stabil $[\text{CuL}]$ komplexei a lúgos pH-tartományba tolják az amidcsoportok deprotonálódását, hiszen az első peptid nitrogénjének deprotonálódása nagyobb pH-n történik, mint például a terminálisan védett egy hisztidint tartalmazó Ac-GNGAHKPG-NH_2 peptid réz(II)komplexeinél ($pK(\text{amid})$ értéke 6,68 (5,38) és 7,18) [164]. Ezeket a hatásokat jól mutatják a réz(II)komplexek koncentráció-eloszlás görbéi (30. ábra).

A három vagy négy hisztidin jelenléte a szekvenciában egynél több kötőhelyet kínál a fémion számára. A 19. táblázatban összegyűjtött adatok mutatják, hogyha a réz(II)ion feleslegben van jelen, akkor kétmagvú komplexek is keletkeznek. Ezekben a részecskékben az egymagvú komplexekhez hasonlóan az imidazol és 1-3 deprotonált amidnitrogén koordinálódik a Cu(II)-ionhoz (31. b) ábra).



31. ábra: A Cu(II)-SOD-A5-G15 rendszerben képződő $[CuH_3L]$ (a) és a $[Cu_2H_6L]$ (b) komplexek szerkezeti képletei

A komplexekben kialakuló koordinációs módok megállapítására különböző spektroszkópai módszereket alkalmaztunk. Az ESR spektroszkópia módszerrel vizsgáltuk meg a Cu(II)-SOD-E5-D16 1:1 rendszerben – a koncentráció-eloszlás görbe alapján a fiziológiás pH-tartományban – jelenlévő imidazol-nitrogén koordinációjú $[CuL]$ komplexet. Az irodalmi adatokkal való összevetés (14. táblázat) alátámasztja az imidazol-koordinációjú $[CuL]$ komplex jelenlétét. A komplexre jellemző ESR paraméterek a multihisztidin peptidek 3 és 4 imidazolkoordinált réz(II)komplexeinek ESR paramétereivel egyeznek, és eltérnek az egy imidazol-N (Tau(9-16)), illetve a két imidazol-N (Ac-HVH-NH₂) által koordinált réz(II)komplexek adataitól.

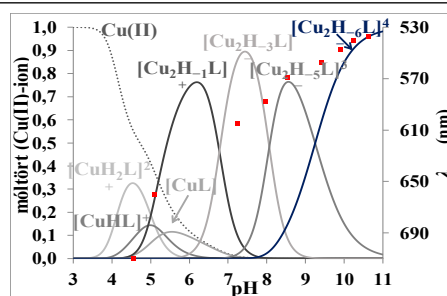
14. táblázat: Különböző peptidek CuL komplexeinek ESR paramétereit

	g_1	A_1 (G)
Cu(SOD-E5-D16), CuL (pH = 6,8)	2,265	168
Cu(S3H4), CuL [148]	2,250	197
Cu(S2H3), CuL [148]	2,270	177
Cu(Ac-HAHVH-NH₂), CuL [156]	2,253	183
Cu(Ac-HVHAH-NH₂), CuL [156]	2,263	180
Cu(Ac-HPHAH-NH₂), CuL [119]	2,283	166
Cu(Ac-HAHPH-NH₂), CuL [119]	2,286	166
Cu(Ac-HVH-NH₂), CuL [118]	2,310	170
Tau(9-16), Cu(Ac-EVMEDHAG-NH₂), CuL [164]	2,315	160

15. táblázat: A peptidek réz(II)komplexeinek UV-látható spektrális paraméterei ($\lambda_{\max}$ (nm), ε ($M^{-1} cm^{-1}$)), sz = széles

Komplex	Koordinációs mód	SOD-E5-N10	SOD-A5-G15	SOD-E5-D16	Ac-HADHAH-NH ₂	Ac-HDHAHDH-NH ₂
[CuL]	[3xN _{lm}] vagy [4xN _{lm}]	624 (52) sz	615 (97) sz	600 (108) sz	615 (85)	605 (60)
[CuH ₃ L]	[N _{lm} , N ⁻ , N ⁻ , N ⁻]	530 (102)	536 (166) sz	540 (147) sz	532 (132)	538 (103)
[Cu ₂ H ₆ L]	2 x [N _{lm} , N ⁻ , N ⁻ , N ⁻]	–	545 (191)	537 (163) sz	–	–

A réz(II)komplexek UV-látható spektrális paramétereit a 15. táblázat tartalmazza. A 32. ábra a Cu(II)-SOD-E5-D16 = 2:1 arányú rendszerben képződött koncentráció-eloszlás görbéjét ábrázolja az – UV-látható spektrofotometriai méréskor rögzített – abszorpciós maximumok változásával együtt a pH-függvényében. A pH növelésével az abszorpciós maximumok kék eltolódása figyel-



32. ábra: A Cu(II)-SOD-E5-D16 = 2:1 arányú rendszerének koncentráció-eloszlás görbéje az abszorpciós maximumok változásával (piros jelölők) együtt a pH-függvényében ábrázolva

hető meg párhuzamosan a fémion körül kialakuló koordinációs szféra változásával. A mért abszorpciós maximumok hullámhosszai összhangban vannak a más, azonos koordinációs móddal rendelkező multihisztidin peptideknél kapott értékekkel.

Ezek az adatok a három vagy négy imidazolkordinált komplexek ([CuL]) képződését támasztják alá a fiziológiás pH-tartományban, míg a négy nitrogén koordinált részecskék ([CuH₃L], [Cu₂H₆L]) erősen lúgos közegben képződnek. Mind ekvimoláris oldatban, mind a Cu(II)-L = 2:1 arányú rendszer oldatában nagy pH-nál 530-540 nm körül egy intenzív abszorpciós maximum jelenik meg. Ez azt jelenti, hogy az egy- és kétmagvú komplexekben a fémion koordinációs módja [N⁻, N⁻, N⁻, N_{lm}]. Az empirikus képlet ((21) egyenlet) alapján a [N⁻, N⁻, N⁻, N_{lm}] koordinációs környezetre számított $\lambda_{\max}$ értéke várhatóan

522 nm lenne, ami kissé eltér a mért értéktől. Ugyanakkor a megjelenő abszorpciós sávok meglehetősen szélesek, ami koordinációs izomer szerkezetek jelenlétére utal.

A komplexek feltételezett koordinációs módjainak megerősítésére és a koordinációs izomer szerkezetek arányának becslésére CD spektroszkópiai vizsgálatokat végeztünk. A réz(II)komplexek CD spektrális paramétereit a 16. táblázat tartalmazza.

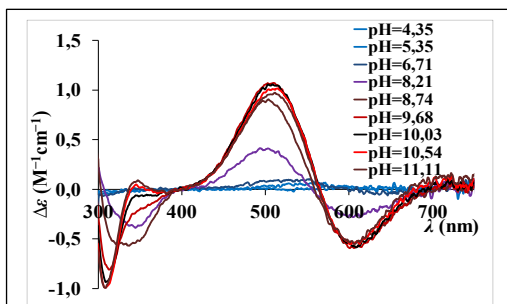
16. táblázat: A vizsgált peptidek réz(II)komplexei CD spektrális paramétereit (λ_{max} (nm), ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)) ; sz = széles

Komplex	Koordinációs mód	SOD-E5-N10	SOD-A5-G15	SOD-E5-D16
[CuH ₃ L]	[N _{Im} , N ⁻ , N ⁻ , N ⁻]	659 (+0,989)	748 (+0,064) sz	718 (+0,127)
		510 (-1,563)	606 (-0,684)	606 (-0,551)
		410 (-0,068)	511 (+1,191)	513 (+0,966)
		372 (-0,128)	348 (+0,097)	350 (+0,083)
		332 (+0,547)	309 (-1,012)	309 (-0,997)
		300 (-0,378)	278 (+1,309)	276 (+1,590)
		261 (+6,341) sz	256 (+0,677)	259 (+1,059)
[Cu ₂ H ₆ L]	2 x [N _{Im} , N ⁻ , N ⁻ , N ⁻]	-	686 (+0,328) sz	678 (+0,538)
			586 (-0,271)	576 (-0,235)
			516 (+0,144)	496 (-0,112)
			379 (-0,042)	446 (+0,024)
			339 (+0,286)	374 (-0,085)
			307 (-0,686)	336 (+0,262)
			266 (+3,060)	306 (-0,792)
			253 (+2,850)	263 (+4,195)

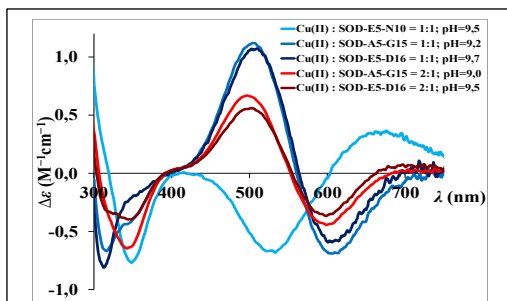
Az enyhén savas közegben nem volt mérhető CD-aktivitás, ami alátámasztja az imidazol oldalláncok kizárólagos koordinációját a [CuH_xL] és [CuL] komplexekben ($x = 1, 2$). A CD spektrumok UV-tartományában (250-300 nm között) pH = 8 felett egy intenzív pozitív Cotton-effektus jelenik meg, ami az $N^- \rightarrow Cu^{2+}$ töltésátviteli sávokra jellemző átmenet. Jelentős CD aktivitás az amidnitrogén koordinációjú komplexeknél figyelhető meg. Az amidnitrogének deprotonálódásának hatására a spektrumokban az abszorpciós maximumok a kisebb hullámhosszak felé tolódnak el és nagy intenzitású sávok jelennek meg 650 (negatív Cotton-effektus) és 520 nm körül

(pozitív Cotton-effektus). Ezt jól mutatja a 33. ábra, ahol a Cu(II)-SOD-E5-D16 = 1:1 rendszer CD spektrumsorozata látható a pH-függvényében. A 34. és 35. ábrákon a fémion-ligandum 1:1 és 2:1 arányok mellett felvett CD spektrumok összehasonlítását láthatjuk.

A CD spektrumokból az látható, hogy a réz(II)-SOD-A5-G15 és a réz(II)-SOD-E5-D16 rendszerek spektrumai hasonlóak pH = 8,0 és 9,5 körül, valamint a fémion-ligandum aránynak nincs jelentős hatása a CD-görbék alakjára (34. ábra). Ugyanígy a spektrumok hasonlósága figyelhető meg pH = 11-nél a réz(II)-SOD-A5-G15 és a réz(II)-SOD-E5-D16 ekvimoláris oldataiban és a réz(II)ion



33. ábra: A Cu(II)-SOD-E5-D16 rendszer ekvimoláris oldatában rögzített CD spektrumsorozat ($c_{\text{Cu(II)}} = c_L = 7 \times 10^{-4} \text{ M}$)



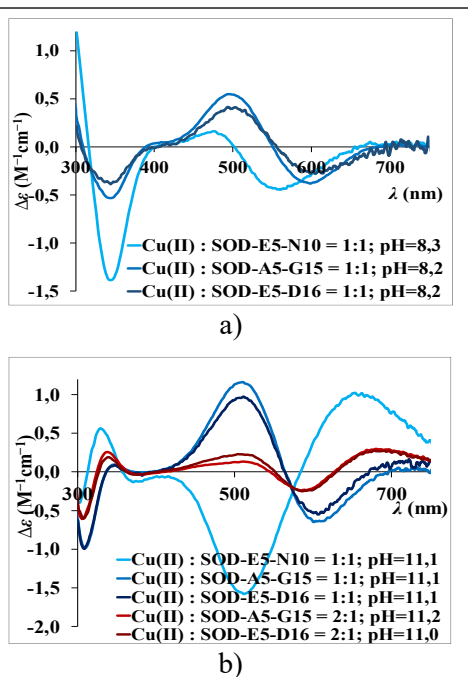
34. ábra: A SOD-E5-N10, SOD-A5-G15 és a SOD-E5-D16 réz(II)komplexek CD spektrumai 9-9,7 pH körül a Cu(II)-L = 1:1 és 2:1 arányok mellett ($c_L = 7 \times 10^{-4} \text{ M}$)

felesleg jelenlétében (34. ábra). A réz(II)-SOD-E5-N10 rendszerben rögzített CD spektrumok alakja azonban minden vizsgált pH-n eltér a hosszabb peptidékétől. Ez a megfigyelés azzal magyarázható, hogy a SOD-A5-G15 és a SOD-E5-D16 ligandumok több potenciális kötőhelyet kínálnak a réz(II)ionok számára, és a réz(II)ionok koordinációja különböző hisztidin tartalmú szekvencia részhez kissé eltérő lefutású CD spektrumokat eredményez. A SOD-A5-G15 és SOD-E5-D16 ligandumok két preferált kötőhelyet tartalmaznak, az N-terminális –HVH– szekvencia részt és a C-terminális –GGHVG(D)– szekvenciát. A negyedik hisztidin aminosav a –GPHFN– környezetében található, amely a fémion

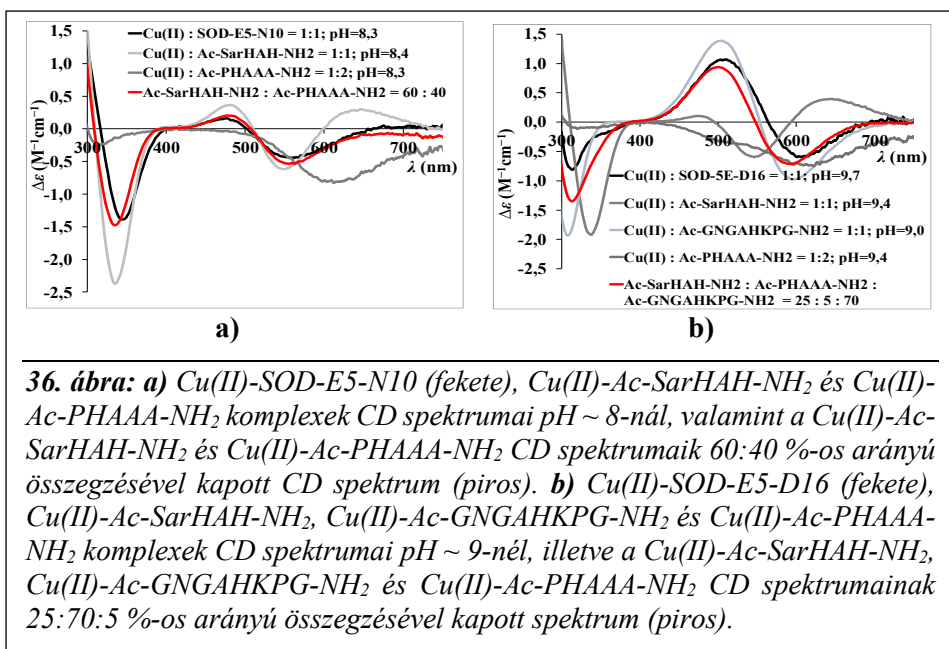
megkötése szempontjából kevésbé kedvező, mivel a hisztidin közelében egy prolin is jelen van. Ezzel szemben a SOD-E5-N10 peptidben csak az N-terminális –HVH– kötőhely lehet a fémion elsődleges kötőhelye. A három oligopeptid réz(II)komplexei CD-spektrumainak az összehasonlítása a korábban vizsgált peptidekével segít a ligandumok fő kötőhelyének megadásában.

A 650 nm körül megfigyelt pozitív Cotton-effektus a –HXH– szekvencia réz(II)-kötőhelyének felel meg [163], míg az 500 nm körüli pozitív sáv akkor figyelhető meg, amikor a fémion a –GXH– motívumhoz koordinálódik [164,212].

Ennek következtében a 15- és 16-tagú peptidek esetében a réz(II)ion elsősorban a C-terminális –GGHVG(D)– kötőhelyhez kötődik. Mivel ez a rész hiányzik a SOD-E5-N10 peptidből, ezért ebben a ligandumban a –FHVH– rész szolgálhat a réz(II)ion fő kötőhelyeként. Ez összhangban van azzal, hogy a Cu(II)-SOD-E5-N10 rendszer CD spektruma eltér a másik két peptidétől és alakja hasonló az Ac-SarHAH-NH₂ peptidéhez. Ezen peptid esetében a kötőhelyek arányának becslése a két kötőhelyet modellező két peptid (Ac-SarHAH-NH₂ és Ac-PHAAA-NH₂ [146]) megfelelő arányban történő összegzésével kapható. Ez alapján a Cu(II)-ion –FHVH– és –GPHFN– kötőhelyekhez való kötődésének aránya az SOD-E5-N10 peptid esetében körülbelül 60%:40% (36. a) ábra).

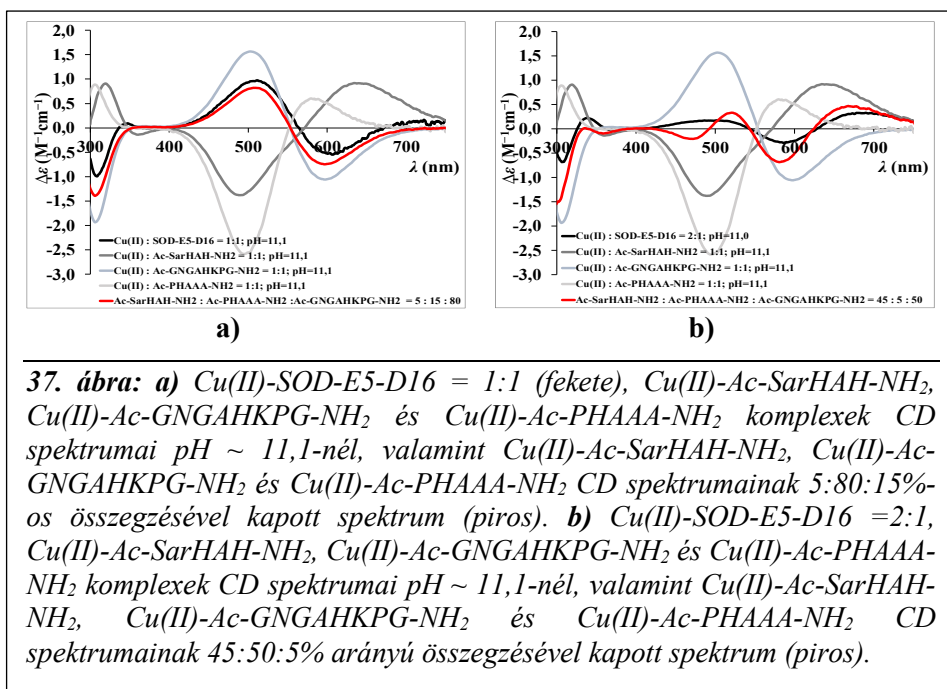


35. ábra: A SOD-E5-N10, SOD-A5-G15 és a SOD-E5-D16 réz(II)komplexei CD spektrumai pH = 8 (a) és pH = 11 (b) körül a Cu(II)-L = 1:1 és 2:1 arányok mellett ($c_L = 7 \times 10^{-4}$ M)

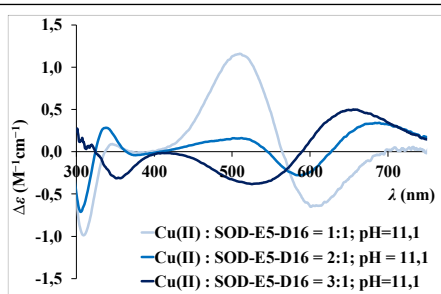


Hasonlóképpen, a SOD-A5-G15 és a SOD-E5-D16 ligandumok különböző fémkötőhelyekre koordinált réz(II)ionok aránya a modellpeptidek (Ac-SarHAH-NH₂, Ac-GNGAHKPG-NH₂ [213] és Ac-PHAAA-NH₂ [146]) Cu(II)-komplexei CD spektrumainak szuperpozíciója alapján becsülhető (36. b.) ábra és 37. a) ábra). Ezek a számítások azt mutatják, hogy ekvimoláris oldatokban, valamint a lúgos közegben a Cu(II)-ion nagy része a –GGHVG(D)– motívumhoz koordinálódik (31. a) ábra). Ha a fémiont kétszeres feleslegben alkalmazzuk, a réz(II)ion jelentős arányban kötődik a két fő kötőhelyhez, a –HVH– és –GGHVG(D)– szekvenciákhoz (37. b) és 31. b) ábra), ugyanakkor a közbelső hisztidin imidazolnitrogénhez való koordináció sem zárható ki.

Mivel mind az 15-tagú, mind a 16-tagú ligandumok legalább három potenciális fémion kötőhellyel rendelkeznek, ezért mindkét ligandum képes kettőnél több fémiont megkötni. Ezt szemlélteti a 38. ábra, ami a CD spektrumokat különböző Cu(II)-SOD-E5-D16 arányok mellett ábrázolja.



A 38. ábra tükrözi az 1:1, 2:1 és 3:1 fémion-ligandum arányok mellett felvett görbék közötti különbséget. Ekvimoláris oldatokban intenzív pozitív Cotton-effektus figyelhető meg 500 nm körül, ami a –GGH– szekvenciára jellemző. Ez alapján a réz(II)-iont az egymagvú komplexekben túlnyomórészt a C-terminális imidazolnitrogén koor-



dinálja. A 2:1 fémion-ligandum aránynál a CD spektrumokban egy új pozitív sáv jelenik meg 650 nm körül, ami arra utal, hogy az egyik fémiont az N-terminális hisztidilcsoport, míg a másik Cu(II) -iont a molekula C-terminális része köti meg.

Háromszoros fémionfelesleg esetén a ligandum három Cu(II) -iont képes megkötni. Az 520 nm körüli negatív Cotton-effektus az $[\text{N}_{\text{Im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-]$ koordinációs módra jellemző, ami alátámasztja, hogy nemcsak az N- és

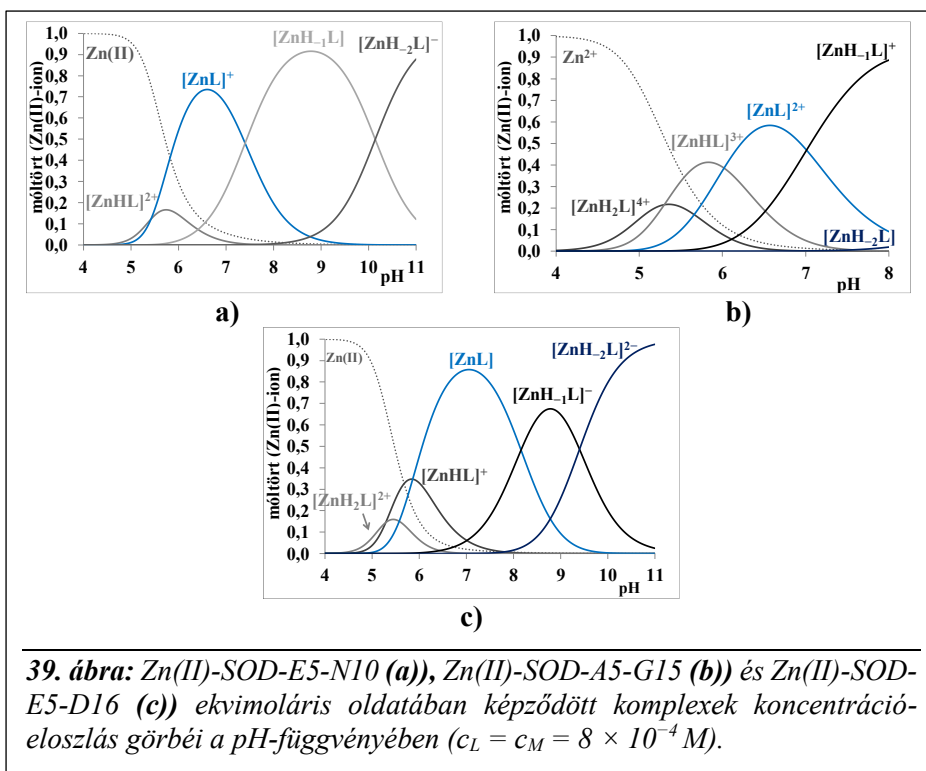
C-terminális imidazolnitrogének, hanem a közbenső hisztidin imidazolnitrogén is kötőhelyként szolgál a fémionok koordinációjához. Tehát a hárommagvú komplexek képződése is lehetséges az erősen lúgos tartományban, de pH-potenciometriás méréseket nem végeztünk a stabilitási állandóik kiszámítására, hiszen ez az arány nem releváns a biológiai rendszerek esetében, ahol a fémion-fehérje arány jóval kisebb, mint az 1:1 arány.

4.2.3. Zn(II)-komplexek

A vizsgált peptidek egymagvú Zn(II)-komplexeinek stabilitási állandóit a 17. táblázat tartalmazza, míg a három ligandum ekvimoláris oldatában képződött komplexek koncentráció-eloszlás görbéit a pH-függvényében ábrázolva a 39. ábra mutatja be.

17. táblázat: A különböző Zn(II)-multihisztidin peptid rendszerekben képződött komplexek stabilitási állandó értékei ($\log\beta$) ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,20\text{ M KCl}$)

$\log\beta [\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r]$	SOD-E5-N10	SOD-A5-G15	SOD-E5-D16	Ac-HADHAH-NH ₂	Ac-HDHAHDH-NH ₂
$[\text{ZnH}_2\text{L}]$	–	17,38 (6)	18,51 (16)	–	18,18 (3)
$[\text{ZnHL}]$	11,54 (8)	12,08 (2)	13,22 (6)	10,91	12,80 (2)
$[\text{ZnL}]$	6,12 (2)	6,06 (2)	7,36 (4)	5,63	6,97 (2)
$[\text{ZnH}_{-1}\text{L}]$	–1,28 (6)	–0,95 (2)	–0,80 (7)	–2,40	–0,72 (3)
$[\text{ZnH}_{-2}\text{L}]$	–11,42 (8)	–10,60 (3)	–10,20 (7)	–11,23	–
$\log K(\text{Zn(II)}+3\text{N}_{\text{Im}})$	6,12	5,25	5,37	5,63	5,63
$\log K(\text{Zn(II)}+4\text{N}_{\text{Im}})$	–	6,06	7,36	–	6,97
$\log K([\text{ZnL}]/[\text{ZnH}_{-1}\text{L}])$	7,40	7,01	8,16	8,03	7,69
$\log K([\text{ZnH}_{-1}\text{L}]/[\text{ZnH}_{-2}\text{L}])$	10,14	8,65	9,40	8,83	–



A $[ZnL]$ sztöchiometria minden esetben megfelel a hisztidil oldalláncokon keresztüli koordinációnak. Az imidazolnitrogén által koordinált részecskék $\log K(Zn(II)+3N_{Im})$ értékeinek összehasonlítása azt mutatja, hogy az aszparaginsavat és/vagy a glutaminsavat tartalmazó ligandumokkal alkotott komplexek képződési állandói nagyobbak, mint a karboxilát oldalláncokkal nem rendelkezőké (Ac-HVHAH-NH₂ $\log K(Zn(II)+3N_{Im}) = 5,09$; Ac-HHGH-NHMe $\log K(Zn(II)+3N_{Im}) = 4,70$) [210]. Ezek az információk arra utalnak, hogy a karboxiláts csoportok kölcsönhatása növeli az imidazol-N koordinált cink(II)komplexek stabilitását. Ugyanakkor a csak egy negatív töltésű oldalláncot tartalmazó 10-tagú peptid fémkomplexére kapott $\log K(Zn(II)+3N_{Im})$ érték körülbelül 0,5 log egységgel nagyobb, mint a Zn(II)-SOD-E5-D16 ligandumra számított képződési állandók. Ez azt jelzi, hogy a molekulák mérete és az említett oldalláncok helyzete hatással van az imidazolkoordinált komplexek stabilitására.

Ez a megállapítás összhangban van a 4.1. fejezetben összefoglalt eredményeinkkel és a kutatócsoportunk korábbi eredményeivel [148].

Enyhén lúgos oldatokban $[ZnH_{-1}L]$ és $[ZnH_{-2}L]$ komplexek képződnek, amelyek nem elég stabilak ahhoz, hogy megakadályozzák a fémion hidrolízisét és csapadékleválás történik. Ez azt mutatja, hogy ezek a részecskék vegyes hidroxidokomplexek és az amidnitrogénatomok fémionok által kiváltott deprotonálódása nem történik meg. Ugyanezt a jelenséget figyelhetjük meg a korábban vizsgált $Zn(II)$ -Ac-HXHZH-NH₂ rendszerekben is.

4.2.4. Vegyes Cu(II)-Zn(II)-komplexek

Az eddig említett eredmények egyértelműen tükrözik, hogy a SOD-A5-G15 és a SOD-E5-D16 peptidek Cu(II)-komplexeiben a C-terminális hisztidin a fő kötőhely a réz(II)ion számára a deprotonált amidnitrogénatomokkal együtt, míg a Zn(II)-ion esetében a fiziológias pH-tartományban a négy imidazol-koordinációjú komplexek a fő részecskék. Mivel a natív CuZnSOD enzimen mindkét fémion kötődik a specifikus peptidszekvenciák egyikéhez, érdemesnek találtuk megvizsgálni, hogy mindkét fémion jelenlétében változik-e a fémionok kötőhelypreferenciája. Ezért pH-potenciometriás és spektroszkópiai vizsgálatokat végeztünk a Cu(II)-, Zn(II)-ionokat és a SOD-A5-G15 vagy a SOD-E5-D16 peptideket ekvimoláris koncentrációban tartalmazó rendszereken.

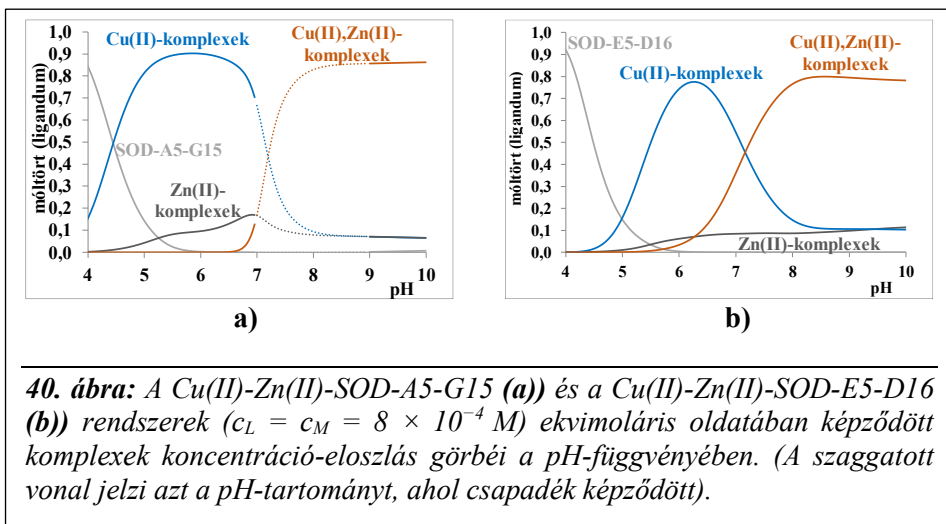
A SOD-A5-G15 peptid esetében csak egy, a lúgos tartományban képződött komplex stabilitási állandóját lehetett meghatározni, mert a 7 és 9 közötti pH-tartományban csapadék volt tapasztalható.

A SOD-E5-D16 peptid vegyes fémkomplexeit pH ~ 10 alatt lehetett vizsgálni, mivel ebben az esetben a csapadékleválás pH = 10 felett következett be. A csapadék csak erősen bázikus oldatban oldódott újra. A képződött vegyes fémkomplexek stabilitási állandó értékeit a 18. táblázatban gyűjtöttem össze.

18. táblázat: A különböző Cu(II)-Zn(II)-L rendszerekben képződött komplexek stabilitási állandói ($\log\beta$) ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,20\text{ M KCl}$)

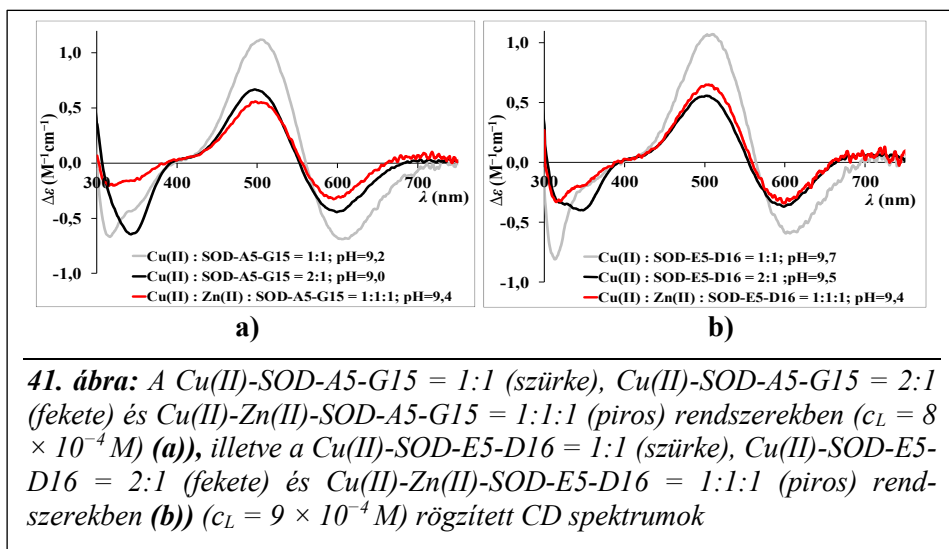
$\log\beta [\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r]$	SOD-A5-G15	SOD-E5-D16
$[\text{CuZnH}_{-1}\text{L}]$	–	6,6 (4)
$[\text{CuZnH}_{-2}\text{L}]$	–	0,11 (5)
$[\text{CuZnH}_{-3}\text{L}]$	–	–7,95 (7)
$[\text{CuZnH}_{-4}\text{L}]$	–	–17,15 (9)
$[\text{CuZnH}_{-5}\text{L}]$	–22,7 (5)	–

A vegyes fémkomplexekben a réz(II)ion a $[(\text{N}^-)_x, \text{N}_{\text{im}}]$ koordinációs móddal kötődik, míg a cink(II)ion az imidazolgyűrűk N-donoratomján keresztül. A $[\text{CuZnH}_{-5}\text{L}]$ komplexben a Zn(II)-ionhoz egy deprotonálódott vízmolekula koordinációját is feltételezzük. A 40. ábra az ekvimoláris vegyes Cu(II)-Zn(II)-L rendszerek ($L = \text{SOD-A5-G15}$ és SOD-E5-D16) koncentráció-eloszlás görbéit mutatja a pH-függvényében, ahol a Cu(II)- és Zn(II)-komplexek, illetve a vegyes fémkomplexek összesített molarányát ábrázoltam.

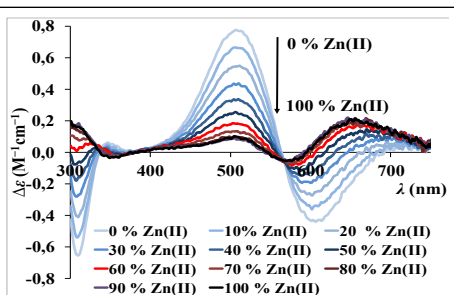


A koncentráció-eloszlás görbékből azt látjuk, hogy $\text{pH} = 6$ alatt mindkét ligandum nagy arányban Cu(II)-komplexben kötött, míg a fiziológiás és lúgos pH-tartományban a vegyes fémkomplexek dominálnak. A vegyes fémkomplexek képződése a fiziológiás és lúgos pH-tartományban módosíthatja a fémionok

eloszlását a potenciális kötőhelyek között. A CD spektroszkópiai vizsgálatok lehetőséget adtak e folyamatok követésére.



A 41. ábra szemlélteti, hogy az enyhén lúgos pH-tartományban a Zn(II) -ion jelenlétében megváltozik a CD spektrum a $\text{Cu(II)}\text{-L}$ ($\text{L} = \text{SOD-A5-G15}$ és SOD-E5-D16) ekvimoláris oldatában felvett spektrumhoz képest. Ezenkívül a $\text{Cu(II)}\text{-Zn(II)}\text{-L} = 1:1:1$ arányban tartalmazó rendszerek spektrumai hasonlóak a $\text{Cu(II)}\text{-L} = 2:1$ arányban ($\text{L} = \text{SOD-A5-G15}$ és SOD-E5-D16) felvett spektrumokhoz. Ezek megerősítik az előbbi feltételezést, miszerint a Zn(II) -ion hozzáadása a Cu(II) -ion újraeloszlását eredményezi a potenciális kötőhelyek között, illetve a Zn(II) -ion részben a peptidek C-terminális részéhez kötődik. Hasonló következtetés vonható le a 42. ábrából, ahol a $\text{Cu(II)}\text{-Zn(II)}\text{-SOD-E5-D16}$ CD spektrumát ábrázoltuk a $\text{Cu(II)}\text{-Zn(II)}$ arány függvényében pH ~ 11 -nél. Az ábrán az látható, hogy a $\text{Cu(II)}\text{-SOD-E5-D16}$



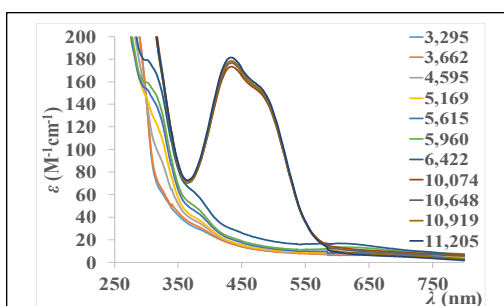
ekvimoláris rendszer CD spektruma lefutása módosul a Zn(II)-ionok hozzáadásával. Ez arra utal, hogy a réz(II)ion körüli koordinációs környezet megváltozik a másik fémion hatására. Egyúttal azt is alátámasztja, hogy vegyes Cu(II)-Zn(II)-ligandum rendszerben a Zn(II)-ion számára a C-terminális imidazolcsoport a fő kötőhely, ami megfelel a CuZnSOD enzim Zn(II)-kötőhelyének.

4.2.5. A SOD-A5-G15 peptid Ni(II)-komplexei

A nikkell(II)ionok jelenlétében bekövetkező komplexképződést is tanulmányoztam a SOD-A5-G15 peptid esetében. Az eredmények azért lehetnek érdekesek, mert az irodalomban találtunk arra hivatkozást, hogy a nikkell(II)ion képes a cink(II)ionok, de akár még a réz(II)ionok helyettesítésére is a CuZnSOD mimetikumokban [94].

A Ni(II)-SOD-A5-G15 rendszer titrálása során csapadék vált ki az oldatból már fiziológias pH-tartományban, mely a nagyobb pH-értékeken ($\text{pH} > 10$) visszaoldódott, ugyanakkor a jelentős csapadékképződés miatt a rendszer kvantitatív jellemzőit nem tudtuk meghatározni. Azonban az UV-látható és CD spektrumokból mégis nyerhetünk információkat arról, hogy erősen lúgos közegben milyen koordinációs környezet és szerkezet jellemzi ebben a rendszerben a nikkell(II)iont.

Az UV-látható spektrumok (43. ábra) megemelkedéséből láthatjuk, hogy már ~ 6 -os pH-n csapadék vált ki az oldatban, amely az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja következtében oldódott fel ismét. A spektrofotometriás vizsgálat alátámasztotta, hogy a csapadékképződés ellenére



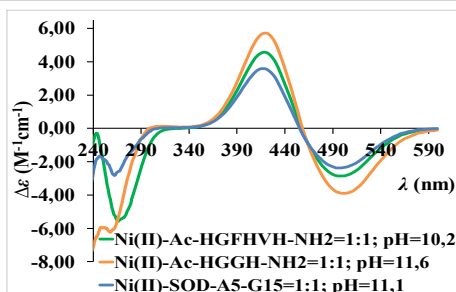
43. ábra: A Ni(II)-SOD-A5-G15 rendszer pH-függő UV-látható spektrumai ($c_{\text{Ni(II)}} = 1,32 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, $c_L = 1,35 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

a ~ 10 -es pH felett a Ni(II)-ionok kötődnek a ligandumhoz. A spektrumon ~ 435 nm, valamint a ~ 490 nm hullámhosszakon két abszorpciós maximum jelent meg és ezen abszorpciós maximumoknak a pH emelésével nem változik az intenzitása. Ez azt mutatja, hogy erősen lúgos közegben bekövetkezik az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja a fémionhoz és az uralkodó részecske, az eddigi ismereteink alapján, a $[\text{NiH}_3\text{L}]$ komplex. A jelentkező két abszorpciós maximum koordinációs izomer szerkezetek jelenlétére utalhat.

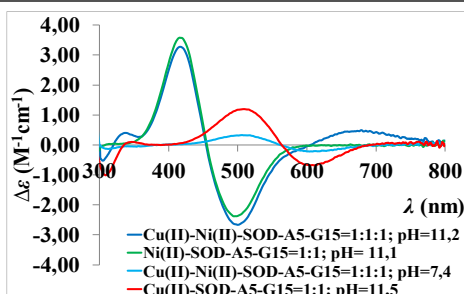
A spektrális paraméterek alapján Ni(II)-ionok jelenlétében keletkező $[\text{NiH}_3\text{L}]$ koordinációs módja a következőképpen írható le: $[\text{N}^-; \text{N}^-; \text{N}^-; \text{N}_{\text{Im}}]$ és az Ac-HGFHVVH-NH₂-hez hasonlóan a –GXH– szekvenciárész a Ni(II)-ion preferált kötőhelye. (44. ábra)

Ezután megvizsgáltuk a vegyes réz(II)-nikkel(II)-SOD-A5-G15 = 1:1:1 rendszert is. Ebben az esetben is a pH $\sim 7,4$ felett megjelenő csapadékképződés miatt cirkuláris dikroizmus vizsgálatok segítségével határoztuk meg a fémionok fő kötőhelyét. A fiziológiás pH-tartományban a Cu(II)-Ni(II)-SOD-A5-G15 és a Cu(II)-SOD-A5-G15 rendszerek CD spektrumainak lefutása hasonló (45. ábra), tehát a CD spektrumok alapján ezen a pH-tartományban

Cu(II)-komplexek jelennek meg az oldatban. A lúgos pH-tartományban a CD-spektroszkópiai mérések alapján, hasonlóan mint a Ni(II)-Ac-HGFHVVH-NH₂



44. ábra: Ni(II)-multihisztidin peptidek rendszerének ekvimoláris oldatában rögzített CD spektrumok 10,2-11,6 pH-n



45. ábra: A Cu(II)-Ni(II)-SOD-A5-G15 = 1:1:1 rendszer CD spektrumának összehasonlítása a Ni(II)-SOD-A5-G15 = 1:1 rendszer spektrumával pH ~ 11 -nél, valamint a Cu(II)-SOD-A5-G15 = 1:1 rendszer spektrumával pH ~ 8 körül

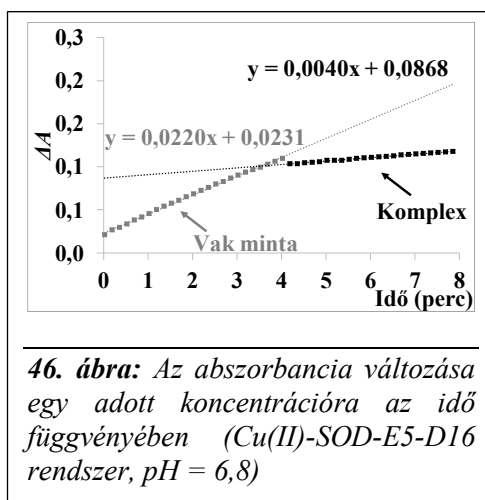
fém-ligandum rendszerben, a Cu(II)-Ni(II)-SOD-A5-G15 rendszerben képződő komplexekben a C-terminális –GXH–rész a Ni(II)-ion számára a preferált kötőhely, míg a 680 nm-nél megjelenő pozitív csúcs a Cu(II)-ion –HVH–szekvenciájához való kötődésére utal. Ez azt is jelenti, hogy a Ni(II)-jelenlétében a réz(II)ion a Cu(II)-kötőhelyet modellező szekvenciához kötődik, hasonlóan, mint a Cu(II)-Zn(II) vegyes rendszerben.

Összességében elmondható, hogy a Zn(II)-ligandum és a Cu(II)-Zn(II)-ligandum rendszerek vizsgálatai, illetve a Ni(II)-ligandum és a Cu(II)-Ni(II)-ligandum rendszereinek spektrális eredményei alapján azt tapasztaltuk, hogy a korábban közölt eredményekkel [94] összhangban, a nikkel(II)ion képes a cink(II)ionok helyettesítésére az általunk vizsgált CuZnSOD mimetikumban is.

4.2.6. SOD aktivitás vizsgálatok és eredményük

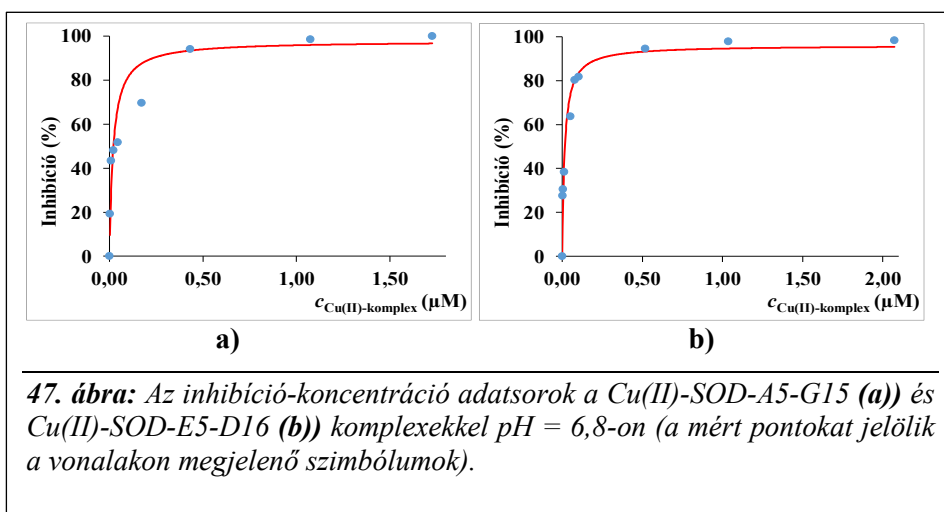
Munkám folytatásaként mértem a SOD-A5-G15 és SOD-E5-D16 ligandumok Cu(II)- és Cu(II)-Zn(II)-komplexeinek, valamint a négy hisztidint tartalmazó heptapeptid (Ac-HDHAHDH-NH₂) Cu(II)-komplexeinek SOD-aktivitását is. A mérésekhez az irodalomból ismert közvetett technikát használtam a kísérleti részben leírtak szerint (3.10. fejezet). A

vizsgálatokat Cu(II)-ligandum, illetve Cu(II)-Zn(II)-ligandum rendszer ekvimoláris mennyiséget tartalmazó mintáiban végeztem ($c_L = c_{Cu(II)} = 2 \mu\text{mol/dm}^3$ és $c_L = c_{Cu(II)} = c_{Zn(II)} = 2 \mu\text{mol/dm}^3$), a minták pH-ját pedig foszfátpufferrel ($c_{\text{foszfátion}} = 50 \text{ mol/dm}^3$) állítottam be 6,8-ra. A SOD aktivitás mérésekor 8 percig vizsgáltam az abszorbanciaváltozást. Az első 4 percen a vak minta (szürke négyzeteken áthaladó egyenes), majd a következő 4 percen a hozzáadott



46. ábra: Az abszorbancia változása egy adott koncentrációra az idő függvényében (Cu(II)-SOD-E5-D16 rendszer, pH = 6,8)

komplex (fekete négyzeteken áthaladó egyenes) abszorbanciaváltozásait követtem, mindezeket a 46. ábra mutatja. Az egyenesek meredeksége a vak mintánál a $\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)^{\text{vak}}$, míg komplex esetén a $\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)^{\text{komplex}}$ értékei. Ezen értékeket az inhibíciós egyenletbe ((31) egyenlet) behelyettesítve számítható ki a különböző Cu(II)-komplexek koncentrációihoz tartozó inhibíció. Ezeket az értékeket ábrázolva a Cu(II)-komplexek koncentrációjának függvényében jutunk a 47. ábrán feltüntetett inhibíciós görbékhez. Az ábrák a Cu(II)-SOD-A5-G15 és a Cu(II)-SOD-E5-D16 rendszerek esetében felvett inhibíciós görbéket szemléltetik.



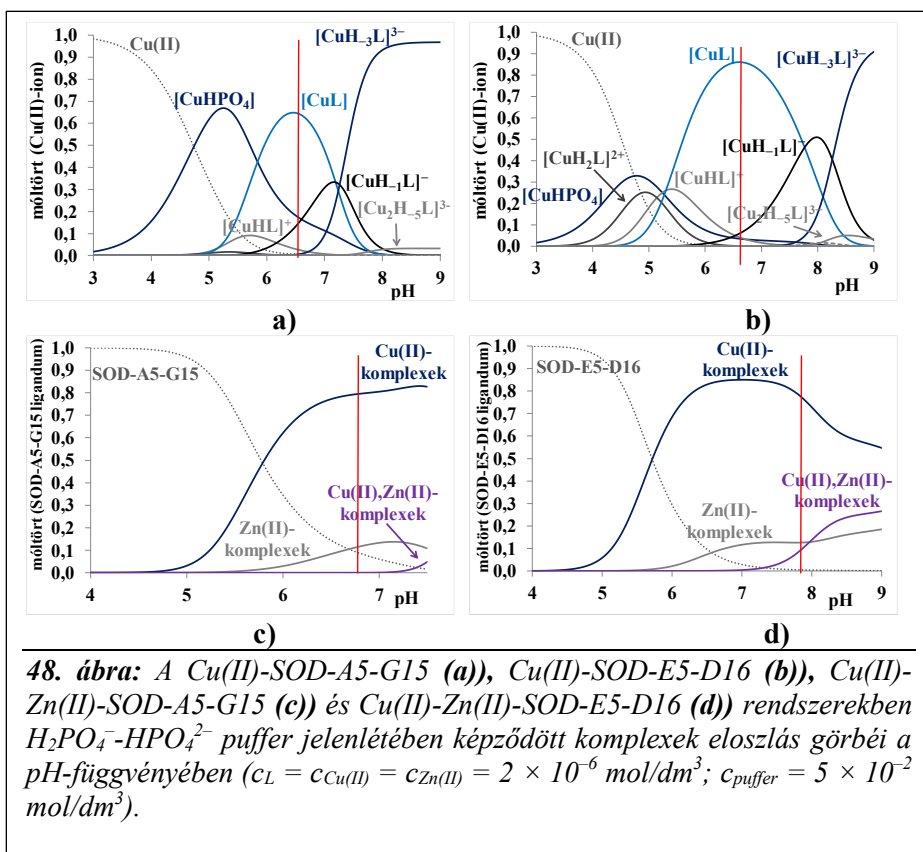
Az általam vizsgált rendszerekre meghatározott IC₅₀ értékeket a 19. táblázat tartalmazza. Ezen kívül a táblázatban szerepelnek a korábban vizsgált multihisztidin peptidekre és néhány más réz(II)- és mangán(III)komplexre vonatkozó adatok is. A jobb összehasonlítást megkönnyíti a relatív aktivitás kiszámítása ((32) egyenlet alapján), ahol a mért értékeket a SOD enzim azonos körülmények között mért IC₅₀ értékéhez viszonyítjuk.

19. táblázat: Az általam vizsgált Cu(II)-komplexekre jellemző IC_{50} és relatív aktivitás értékek, valamint a komplexek katalitikus SOD-aktivitása, kiegészítve néhány irodalmi adattal ($pH = 6,8$).

Komplex	pH	IC_{50} (μM)	Relatív aktivitás (%)	$k_{cat}/10^6$ ($M^{-1}s^{-1}$)
CuZnSOD [120]	6,8	0,0030	100	914
CuZnSOD [97]		0,010		430
Cu(II)-SOD-E5-D16	6,8	$0,017 \pm 0,004$	17,6	161
Cu(II)-Zn(II)-SOD-E5-D16	6,8	$0,014 \pm 0,002$	21,4	196
Cu(II)-SOD-A5-G15	6,8	$0,021 \pm 0,007$	14,3	131
Cu(II)-Zn(II)-SOD-A5-G15	6,8	$0,019 \pm 0,008$	15,8	144
Cu(II)-Ac-HDHAHDH-NH ₂	6,8	$0,020 \pm 0,006$	15,0	137
Cu(II)-Ac-HAAHGH-NH ₂ [120]	6,8	0,072	4,17	
Cu(II)-Ac-HGGHGH-NH ₂ [120]	6,8	0,071	4,22	
Cu(II)-PydiTyr [97]		0,028		96,2
[Mn(PI) ₂](PF ₆)(CH ₃ CN) [200]	7,0	0,87		6,6
[Mn(III)Cl ₄ TE-2-PyP] [214]		0,0065		400

Az adatok azt tükrözik, hogy a vizsgált 15- és 16-tagú peptidek réz(II)komplexeinek SOD-aktivitása kiemelkedően jó, és hasonlóan jó IC_{50} -értékeket kaptunk a négy hisztidint tartalmazó heptapeptid esetében is. Gyakorlatilag azonos aktivitás értékeket mértünk azonban az ekvimoláris Cu(II)-Zn(II)-SOD-A5-G15 és Cu(II)-Zn(II)-SODE5-D16 rendszerekben is. Bár várható volt, hogy a fémionok kötésének átrendeződése Zn(II)-ion jelenlétében hatással lesz a SOD aktivitására, a választ a mérési körülményekre számított eloszlás görbék adják meg (48. ábra).

A 48. ábra a Cu(II)-SOD-A5-G15, Cu(II)-SOD-E5-D16, illetve Cu(II)-Zn(II)-SOD-A5-G15, Cu(II)-Zn(II)-SOD-E5-D16 eloszlását mutatja a SOD aktivitás mérések során használt koncentrációkra. Az ábrák egyértelműen mutatják, hogy a Cu(II)-SOD-A5-G15 és a Cu(II)-SOD-E5-D16 rendszerekben a



48. ábra: A Cu(II)-SOD-A5-G15 (a)), Cu(II)-SOD-E5-D16 (b)), Cu(II)-Zn(II)-SOD-A5-G15 (c)) és Cu(II)-Zn(II)-SOD-E5-D16 (d)) rendszerekben H_2PO_4^- - HPO_4^{2-} puffer jelenlétében képződött komplexek eloszlás görbéi a pH-függvényében ($c_L = c_{\text{Cu(II)}} = c_{\text{Zn(II)}} = 2 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$; $c_{\text{puffer}} = 5 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$).

kizárólag imidazol-koordinációjú Cu(II)-komplexek (CuL) dominálnak ezen körülmények között, míg a Cu(II)-Zn(II) vegyes komplexek aránya sokkal kisebb a Cu(II)-Zn-L (L = SOD-A5-G15 vagy SOD-E5-D16) rendszerekben. Így a cink(II)ionok jelenléte pH = 6,8-nál nem befolyásolja a SOD-aktivitás értékeit. Bár a vizsgált komplexek relatív SOD-aktivitása kisebb, mint a natív CuZnSOD enzímé, fontos megjegyezni, hogy a komplexek nagyobb aktivitást mutattak a szuperoxid anion lebontásában, mint más SOD modellkomplexek. Így a CuZnSOD enzim aktív centrumát modellező specifikus aminosav szekvenciák beépítése növelheti a réz(II)-multihisztidin peptid komplexek hatékonyságát a szuperoxid anion katalitikus lebontásában.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A természetben előforduló metalloenzimek, köztük a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimek szerkezeti és funkcionális modelljeinek létrehozása a bioszervetlen kémia kiemelt kutatási területe. Doktori dolgozatom fő célja, olyan oligopeptid előállítása volt, amely mind szerkezetében és mind funkciójában is képes utánozni a CuZnSOD enzim aktív centrumát. Ezt megelőzően a munkám során részletes összehasonlító elemzést végeztem a hisztidin oldalláncok számának és térbeli elrendeződésének szerepére a réz(II)-, cink(II)- és nikkel(II)ionok komplexképződésének sajátásaiban.

A kutatási irány előzményei a kutatócsoportunk korábbi eredményeire vezethetők vissza, hiszen vizsgálták korábban a CuZnSOD enzim aktív centrumában a Cu(II)-ion kötőhelyének (Ac-HVH-NH₂ tripeptid), illetve a Zn(II)-ion kötőhelyének (Ac-HVGD-NH₂ tetrapeptid) modellezésére szolgáló különböző tagszámú és szekvenciájú multihisztidin peptideket. Ezt követően tanulmányozták a különböző oldalláncok jelenlétének hatását a –HXXH– és –HXYH– motívumot tartalmazó multihisztidin peptidek komplexképző sajátságaira a Cu(II)-, Zn(II)- és Ni(II)-ionokkal. A korábbi munkák során szerzett tapasztalatokra építve alakítottam ki a kutató munkám irányát, mely a fémionokhoz szelektíven kötődő, stabil és egyidejűleg nagy SOD aktivitást mutató modelleket célozta meg.

A vizsgált peptideket szilárdfázisú peptidszintetizátorral állítottam elő, majd ezek réz(II)-, cink(II)-, és nikkel(II)komplexeinek sztöchiometriáját, stabilitását és szerkezetét pH-potenciometria és különböző spektroszkópai módszerekkel (UV-látható, CD, szükség szerint ¹H-NMR, ESR és MS) vizsgáltuk. Néhány réz(II)komplex redoxipotenciál értékei meghatározását ciklikus voltammetriás mérésekkel végeztem, míg a szuperoxid-dizmutáz aktivitás mérését közvetett módszerrel, spektrofotométerrel határoztam meg. E módszerek kombinált alkalmazása lehetővé tette a különböző részecskék pontos szerkezeti és funkcionális jellemzését. Az eredményeinket két fő csoportra osztva foglalom össze a továbbiakban.

1. Aszparaginsavat tartalmazó peptidek: A két, három és négy hisztidint tartalmazó védett peptidek (Ac-SarHAH-NH₂, Ac-HADH-NH₂, Ac-HDAH-NH₂, Ac-HXHYH-NH₂ (X, Y = A, D), Ac-HADHAH-NH₂, Ac-HDHAHDH-NH₂) réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)komplexeire kapott eredmények megmutatták, hogy

az aszparaginsav oldallánca hogyan befolyásolja a komplexképződési folyamatokat és a réz(II)komplexek elektrokémiai paramétereit. Az eredmények lehetőséget adtak arra is, hogy összehasonlításokat végezzünk a korábban vizsgált, hasonló szekvenciájú peptidekkel, illetve hogy táblázatokba rendszerezzük az egyensúlyi, spektroszkópiai és elektrokémiai paramétereket. Ezen információk alapján megállapítottuk, hogy az aszparaginsav oldalláncának van a legnagyobb hatása a peptidláncban jelenlevő egyéb aminosav oldalláncokhoz (alanin, valin, fenilalanin, lizin) képest. A negatív töltésű oldallánc jelenléte és a karboxilátcsoport gyenge axiális koordinációja növeli a mindhárom vizsgált fémionnal képződött imidazolkoordinált komplexek stabilitását. A karboxilátcsoport koordinációja az amidnitrogén koordinált Cu(II)-komplexekben is feltételezhető volt. Ez a $[\text{CuH}_{-1}\text{L}]$ és $[\text{CuH}_{-2}\text{L}]$ komplexek redoxipotenciál értékeinek növekedését és a nagyobb mértékű torzult geometria miatt nagyobb redukálhatóságot eredményezi. Az aszparaginsavat tartalmazó peptidek esetében a $[\text{CuH}_{-x}\text{L}]$ ($x = 1-3$) komplexek koordinációs izomerjei képződnek, amelyek arányát befolyásolja az aszparaginsav aminosav helyzete. Az aszparaginsav karboxilátcsoportjának axiális kölcsönhatása miatt az Ac-HADHAH-NH₂ hexapeptid esetén a réz(II)ion kötődése a közbenső hisztidinhez kedvezményezett, míg a heptapeptid (Ac-HDHAHDH-NH₂) esetében a –HDH– motívumok a fémion fő kötőhelyei. Emellett az aszparaginsav jelenléte jelentős hatással van a cink(II)ionok jelenlétében lejátszódó komplexképződési folyamatokra. A –HADH– és –HDAH– szekvenciákat tartalmazó peptidek esetében a karboxilátcsoport koordinációja stabilizálja a cink(II)komplexeket a fiziológiás pH-tartományban, illetve elősegíti a cink(II)ion által kiváltott amidnitrogén deprotonálódást és koordinációt.

2. *SOD modellpeptidek vizsgálata és eredményük:* A CuZnSOD enzim réz(II)- és cink(II)kötőhelyeit egyaránt tartalmazó 10-, 15- és 16-tagú modell-peptidek vizsgálata azt mutatta, hogy az összes hisztidin-imidazolgyűrű képes horgonycsoportként viselkedni a Cu(II)-ion számára. A fiziológiás pH-tartományban az imidazolkoordinált komplexek dominálnak, míg a lúgos pH-tartományban bekövetkezik az amidnitrogének deprotonálódása, ahol $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}]$ donortomokkal telítődik a Cu(II)-ion koordinációs szférája. Az UV-látható és CD spektroszkópiai vizsgálatok alapján az ekvimoláris oldatban a peptidek –GGHVG(D)– szekvenciája a preferált kötőhely, amely a natív enzim Zn(II)-kötőhelyét modellezi. A több hisztidin jelenléte miatt azonban a peptidek

egynél több Cu(II)-iont is képesek megkötni. Ezáltal a Cu(II)-ionok feleslegét tartalmazó oldatokban kétmagvú komplexek képződését figyeltük meg, amelyekben a réz(II)ion közel ekvimoláris arányban kötődik az –FHVH– és a –GGHVG(D)– szekvenciákhoz.

A Ni(II)-SOD-A5-G15 rendszerben lúgos pH-tartományban a spektrális paraméterek alapján kialakul a $[\text{NiH}_3\text{L}]$ komplex, amelyben a fémion preferált kötőhelye a C-terminális –GXH– szekvenciárész.

A Cu(II)-Zn(II)-L (L = SOD-A5-G15 vagy SOD-E5-D16) vegyes rendszerekben a Cu(II)-Zn(II)-komplexek jelenlétét csak a lúgos tartományban lehetett kimutatni. A spektroszkópiai mérések azonban megerősítik, hogy a cink(II)ion koncentrációjának növelése a réz(II)ion átrendeződését eredményezi a potenciális kötőhelyek között és a cink(II)ion a peptidek C-terminális részéhez kötődik, ami megfelel a CuZnSOD enzim Zn(II)-kötőhelyének.

A Cu(II)-Ni(II)-SOD-A5-G15 vegyes rendszer CD spektroszkópiás vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy fiziológiás pH-tartományban a Cu(II)-komplexek a meghatározó részecskék, míg lúgos oldatban a réz(II)ion a Cu(II)-kötőhelyet modellező szekvenciához, a nikkel(II)ion pedig a Zn(II)-kötőhelyet modellező szekvenciához kötődik.

A vizsgálatokat kiegészítettük a Cu(II)- és Cu(II)-Zn(II) vegyes rendszerében kialakuló komplexek SOD aktivitásának mérésével pH = 6,8-on. A 15- és 16-tagú peptidek Cu(II)-komplexei kiemelkedően jó SOD-aktivitás értéket mutattak. A Zn(II)-ion jelenléte azonban nem befolyásolta az aktivitást, mivel a mérések során alkalmazott koncentrációkban a koncentráció-eloszlás görbék alapján pH = 6,8-nál a Cu(II)-komplexek az uralkodó részecskék.

A kutatás egyik legjelentősebb eredménye, hogy a szintetizált multihisztidin peptidek alkalmasak lehetnek a CuZnSOD enzim aktív centrumának modellezésére. Olyan multihisztidin peptideket sikerült előállítani, amelyek imidazolkoordinált $[\text{CuL}]$ komplexe kiemelkedő SOD aktivitást mutatott. Az aktivitás értékek több esetben meghaladták az irodalomban közölt hasonló modellek eredményeit, amelyek jelentős előrelépést jelenthetnek a mesterséges antioxidáns rendszerek fejlesztésében. A vizsgálatok hozzájárulnak a peptidalapú metalloenzimek modellezésével kapcsolatos ismeretek pontosabb megértéséhez, új lehetőséget nyitnak meg a bioaktív komplexek kutatásában és potenciális alapot szolgáltatnak a jövőbeni terápiás célokra is alkalmazható antioxidáns anyagok kifejlesztéséhez.

6. SUMMARY

The design of structural and functional models of naturally occurring metalloenzymes, including superoxide dismutase (SOD) enzymes, represents an important area of research in bioinorganic chemistry. The primary objective of my doctoral work was to develop an oligopeptide capable of mimicking the active site of the CuZnSOD enzyme both structurally and functionally. As a preparatory step, I conducted a detailed comparative analysis of how the number and spatial arrangement of histidine side chains influence the complex formation characteristics of copper(II), zinc(II), and nickel(II) ions.

This research direction builds upon the earlier findings of our research group. Before the present study, multihistidine peptides with varying lengths and sequences had been investigated as models of the Cu(II)-binding site (Ac-HVH-NH₂ tripeptide) and the Zn(II)-binding site (Ac-HVGD-NH₂ tetrapeptide) of the CuZnSOD enzyme's active center. In subsequent studies, the influence of additional side chains on the complex formation behavior of multihistidine peptides bearing –HXH– and –HXYH– motifs was examined with Cu(II), Zn(II), and Ni(II) ions. Building upon these findings, I directed my research toward the development of selective and stable metal-binding peptide models exhibiting high superoxide dismutase activity.

The synthesized peptides were produced using a solid-phase peptide synthesizer. The stoichiometry, stability, and structure of their copper(II), zinc(II), and nickel(II) complexes were investigated using pH potentiometry and various spectroscopic techniques (UV-Vis, CD, and – when necessary – ¹H NMR, ESR, and MS). The redox potentials of selected copper(II) complexes were determined via cyclic voltammetry, while SOD activity was measured by an indirect method using spectrophotometry. The combination of these techniques allowed for the precise structural and functional characterization of the resulting species. The findings are summarized in two major groups as follows.

1. Peptides containing aspartic acid: The results obtained for the copper(II), nickel(II), and zinc(II) complexes of the protected peptides containing two, three, or four histidine residues (Ac-SarHAH-NH₂, Ac-HADH-NH₂, Ac-HDAH-NH₂, Ac-HXHYH-NH₂ [X, Y = A, D], Ac-HADHAH-NH₂, Ac-HDHAHDH-NH₂) revealed how the side chain of aspartic acid influences complex formation processes and the electrochemical parameters of copper(II)

complexes. These findings provided an opportunity to compare the studied systems with previously investigated peptides of similar sequence, and to systematically present the equilibrium, spectroscopic, and electrochemical parameters in tabular format. These results clearly indicate that the side chain of aspartic acid has a significantly stronger impact than those of other amino acids present in the peptide backbone (alanine, valine, phenylalanine, lysine). The presence of the negatively charged side chain and the weak axial coordination ability of the carboxylate group increase the stability of the imidazole-coordinated complexes formed with all three studied metal ions. Coordination of the carboxylate group was also presumed in amide nitrogen-coordinated Cu(II) complexes. This interaction results in higher redox potentials for the $[\text{CuH}_{-1}\text{L}]$ and $[\text{CuH}_{-2}\text{L}]$ complexes, and due to the more pronounced distorted geometry, these species exhibit greater reducibility. In the case of aspartic acid-containing peptides, coordination isomers of the $[\text{CuH}_{-x}\text{L}]$ ($x = 1-3$) complex were observed, and the ratio of these isomers was influenced by the position of the aspartic acid residue within the peptide sequence. Due to the axial interaction of the aspartic acid carboxylate group, Cu(II) binding is favored at the central histidine in the hexapeptide Ac-HADHAH-NH₂, whereas in the heptapeptide Ac-HDHAHDH-NH₂, the –HDH– motifs serve as the primary binding sites. Additionally, the presence of aspartic acid significantly affected the complex formation processes in the presence of Zn(II) ions. In peptides containing the –HADH– and –HDAH– motifs, coordination of the carboxylate group stabilized the zinc(II) complexes at physiological pH and facilitated the deprotonation and coordination of the amide nitrogen induced by Zn(II).

2. Investigation of SOD model peptides and their results: The study of model peptides containing both the copper(II)- and zinc(II)-binding sites of the CuZnSOD enzyme – specifically the 10-, 15-, and 16-residue sequences – demonstrated that all histidine imidazole rings are capable of acting as anchoring groups for the Cu(II) ion. At physiological pH, imidazole-coordinated complexes dominate, while under alkaline conditions, deprotonation of the amide nitrogens occurs, resulting in the coordination sphere of Cu(II) being saturated with $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}]$ donor atoms. In equimolar solutions, the –GGHVG(D)– sequence of the peptides serves as the preferred binding site according to UV-Vis and CD spectroscopic data, modeling the Zn(II)-binding site of the native enzyme. However, due to the presence of multiple histidine residues, the peptides are able

to bind more than one Cu(II) ion. Consequently, in solutions with an excess of Cu(II), the formation of dinuclear complexes was observed, in which the Cu(II) ions bind in approximately equimolar ratios to the –FHVH– and –GGHVG(D)– motifs.

In the Ni(II)-SOD-A5-G15 system, spectral parameters indicated the formation of the $[\text{NiH}_3\text{L}]$ complex under alkaline conditions, where the preferred binding site is located in the C-terminal –GXH– segment.

In the mixed Cu(II)-Zn(II)-L systems (L = SOD-A5-G15 or SOD-E5-D16), Cu(II)-Zn(II) complexes were detected only at alkaline pH. Spectroscopic measurements confirmed that increasing the concentration of Zn(II) induced rearrangement of the Cu(II) ion between potential binding sites, and that Zn(II) binds preferentially to the C-terminal region of the peptides, which corresponds to with the Zn(II)-binding site of the CuZnSOD enzyme.

CD spectroscopic studies of the Cu(II)-Ni(II)-SOD-A5-G15 mixed system showed that Cu(II) complexes are the dominant species at physiological pH. However, under alkaline conditions, the Cu(II) ion binds to the sequence that models its own binding site, while Ni(II) binds to the sequence that mimics the Zn(II)-binding site.

The investigations were complemented by measuring the SOD activity of the Cu(II) and Cu(II)-Zn(II) complexes at pH 6.8. The Cu(II) complexes of the 15- and 16-membered peptides showed exceptionally high SOD activity. The presence of Zn(II), however, did not affect this activity, since, based on the concentration distribution curves and the conditions used in the measurements, the Cu(II) complexes remained the dominant species at pH 6.8.

One of the most significant outcomes of this research is the demonstration that the synthesized multihistidine peptides may serve as suitable models for the active site of the CuZnSOD enzyme. Multihistidine peptides were successfully developed whose imidazole nitrogen-coordinated $[\text{CuL}]$ complexes showed outstanding SOD activity. In several cases, the observed activity values exceeded those reported in the literature for similar models, representing a potential advancement in the development of artificial antioxidant systems. These studies contribute to a deeper understanding of the modeling of the peptide-based metalloenzymes, open new avenues in the study of bioactive metal complexes, and may provide a basis for the development of antioxidant agents with potential therapeutic applications in the future.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] J. M. McCord, Free Radicals and Inflammation: Protection of Synovial Fluid by Superoxide Dismutase, *Science*, **1974**, *185*, 529-531.
- [2] L. W. Oberley, G. R. Buettner, Role of Superoxide Dismutase in Cancer: A Review, *Cancer Res.*, **1979**, *39*, 1141-1149.
- [3] T. C. Pederson, S. D. Aust, The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation promoted by xanthine oxidase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1973**, *52*, 1071-1078.
- [4] S. Suman, D. Bagal, D. Jain, R. Singh, I. K. Singh, A. Singh, Biotic stresses on plants: reactive oxygen species generation and antioxidant mechanism, *Frontiers in Plant-Soil Interaction*, **2021**, 381-411.
- [5] A. Bafana, S. Dutt, A. Kumar, S. Kumar, P.S. Ahuja, The basic and applied aspects of superoxide dismutase, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2011**, *68*, 129-138.
- [6] M. L. Corvo, J. C. S. Jorge, R. van't Hof, M. E. M. Cruz, D. J. A. Crommelin, G. Storm, Superoxide dismutase entrapped in long-circulating liposomes: formulation design and therapeutic activity in rat adjuvant arthritis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2002**, *1564*, 227-236.
- [7] K. Morikawa, S. Morikawa, Immunomodulatory effect of recombinant human superoxide dismutase (SOD) on human B lymphocyte function in vitro, *Cell Immunol.*, **1996**, *172*, 70-76.
- [8] B. Mohan, A. Jana, N. Das, S. Bharti, M. Choudhary, Syntheses, crystal structures, antioxidant SOD-like properties and in-vitro antimicrobial studies of Cu(II) and Ni (II) complexes with 2-((E)-(4-bromo-2-chlorophenylimino)methyl)-6-bromo-4-nitrophenol and (E)-1-(3,5-dichloro-2-hydroxybenzylidene)-4,4-dimethylthiosemicarbazide, *J. Mol. Struct.*, **2018**, *1171*, 94-109.
- [9] H. D. Youn, E. J. Kim, J. H. Roe, Y. C. Hah, S. O. Kang, A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp, *Biochem. J.*, **1996**, *318*, 889-896.
- [10] H. D. Youn, H. Youn, J. W. Lee, Y. I. Yim, J. K. Lee, Y. C. Hah, S. O. Kang, Unique Isozymes of Superoxide Dismutase in *Streptomyces griseus*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1996**, *334*, 341-348.
- [11] Y. Sheng, I. A. Abreu, D. E. Cabelli, M. J. Maroney, A.-F. Miller, M. Teixeira, J. S. Valentine, Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases, *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, 7, 3854-3918.
- [12] M. S. Lah, M. M. Dixon, K. A. Patridge, W. C. Stallings, J. A. Fee, M. L. Ludwig, Structure-function in *Escherichia coli* iron superoxide dismutase: comparisons with the manganese enzyme from *Thermus thermophilus*, *Biochem.*, **1995**, *34*, 1646-1660.
- [13] R. A. Edwards, H. M. Baker, M. M. Whittaker, J. W. Whittaker, G. B. Jameson, E. N. Baker, Crystal structure of *Escherichia coli* manganese superoxide dismutase at 2.1-Å resolution, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1998**, *3*, 161-171.
- [14] M. L. Ludwig, A. L. Metzger, K. A. Patridge, W. C. Stallings, Manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*. A structural model refined at 1.8 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **1991**, *219*, 335-358.
- [15] C. L. Dupont, K. Neupane, J. Shearer, B. Palenik, Diversity, function and evolution of genes coding for putative Ni-containing superoxide dismutases. *Environ. Microbiol.*, **2008**, *10*, 7, 1831-1843.
- [16] J. M. McCord, I. Fridovich, Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, **1969**, *244*, 6049-6055.
- [17] R. J. Carrico, H. F. Deutsch, The Presence of Zinc in Human Cytochrome c and Some Properties of the Apoprotein, *J. Biol. Chem.*, **1970**, *245*, 723-727.
- [18] J. A. Tainer, E. D. Getzoff, K. M. Beem, J. S. Richardson, D. C. Richardson, Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase, *J. Mol. Biol.*, **1982**, *160*, 181-217.
- [19] K. Hjalmarsson, S. L. Marklund, A. Engström, T. Edlund, Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, *84*, 6340-6344.

- [20] T. D. Oury, J. D. Crapo, Z. Valnickova, J. J. Enghild, Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers: a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase, *J. Biochem.*, **1996**, 317, 51-57.
- [21] Y. Furukawa, A. S. Torres, T. V. O'Halloran, Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS, *EMBO J.*, **2004**, 23, 14 2872-2881.
- [22] R. G. Alscher, N. Erturk, L. S. Heath, Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, *J. Exp. Botany*, **2002**, 53, 1331-1341.
- [23] S. A. Goscini, I. Fridovich, The purification and properties of superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1972**, 289, 276-283.
- [24] O. Bermingham-McDonogh, E. B. Gralla, J. S. Valentine, The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and biological activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, 85, 4789-4793.
- [25] K. Puget, A. M. Michelson, Isolation of a new copper - Containing superoxide dismutase bacteriocuprein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1974**, 58, 830-838.
- [26] L. T. Benov, I. Fridovich, *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 41, 25310-25314.
- [27] I. Fridovich, Superoxide Anion Radical ($O_2^{\cdot-}$), Superoxide Dismutases, and Related Matters, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 30, 18515-18517.
- [28] J. S. Valentine, P. A. Doucette, S. Z. Potter, Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis, *Annu. Rev. Biochem.*, **2005**, 74, 563-593.
- [29] D. Barra, F. Martini, J. V. Bannister, M. E. Schininà, G. Rotilio, W. H. Bannister, F. Bossa, The complete amino acid sequence of human Cu/Zn superoxide dismutase, *FEBS Letters*, **1980**, 120, 1, 53-56.
- [30] J. A. Tainer, E. D. Getzoff, J. S. Richardson, D. C. Richardson, Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase, *Nature*, **1983**, 306, 5940, 284-287.
- [31] L. Banci, I. Bertini, F. Cramaro, R. Del Conte, M. S. Viezzoli, The solution structure of reduced dimeric copper zinc superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.*, **2002**, 269, 7, 1905-1915.
- [32] L. Banci, I. Bertini, F. Cramaro, R. Del Conte, M. S. Viezzoli, Solution Structure of Apo Cu,Zn Superoxide Dismutase: Role of Metal Ions in Protein Folding, *Biochem.*, **2003**, 42, 32, 9543-9553.
- [33] C.L. Borders Jr., J. T. Johansen, Identification of ARG-143 as the essential arginyl residue in yeast Cu,Zn superoxide dismutase by use of a chromophoric arginine reagent, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1980**, 96, 3, 1071-1078.
- [34] Y. Furukawa, I. Anzai, S. Akiyama, M. Imai, F. J. C. Cruz, T. Saio, K. Nagasawa, T. Nomura, K. Ishimori Conformational Disorder of the Most Immature Cu, Zn-Superoxide Dismutase Leading to Amyotrophic Lateral Sclerosis, *J. Biol. Chem.*, **2016**, 291, 8, 4144-4155.
- [35] L. J. Hayward, J. A. Rodriguez, Ji W. Kim, A. Tiwari, J. J. Goto, D. E. Cabello, J. S. Valentine, R. H. Brown Jr., Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 18, 15923-15931.
- [36] M. J. Lindberg, L. Tibell, M. Oliveberg, Common denominator of Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis: Decreased stability of the apo state, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 26, 16607-16612.
- [37] P. B. Stathopoulos, J. A. O. Rumfeldt, G. A. Scholz, R. A. Irani, H. E. Frey, R. A. Hallewell, J. R. Lepock, E. M. Meiering, Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis show enhanced formation of aggregates in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 12, 7021-7026.
- [38] F. Arnesano, L. Banci, I. Bertini, M. Martinelli, Y. Furukawa, T. V. O'Halloran, The Unusually Stable Quaternary Structure of Human Cu,Zn-Superoxide Dismutase 1 Is Controlled by Both Metal Occupancy and Disulfide Status, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 46, 47998-48003.

- [39] P. A. Doucette, L. J. Whitson, X. Cao, V. Schirf, B. Demeler, J. S. Valentine, J. C. Hansen, P. J. Hart, Dissociation of Human Copper-Zinc Superoxide Dismutase Dimers Using Chaotrope and Reductant: INSIGHTS INTO THE MOLECULAR BASIS FOR DIMER STABILITY, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 52, 54558-54566.
- [40] S. M. Lynch, S. A. Boswell, W. Colon, Kinetic stability of Cu/Zn superoxide dismutase is dependent on its metal ligands: implications for ALS, *Biochem.*, **2004**, 43, 51, 16525-16531.
- [41] R. W. Strange, S. V. Antonyuk, M. A. Hough, P. A. Doucette, J. S. Valentine, S. S. Hasnain, Variable metallation of human superoxide dismutase: atomic resolution crystal structures of Cu-Zn, Zn-Zn and as-isolated wild-type enzymes, *J. Mol. Biol.*, **2006**, 356, 5, 1152-1162.
- [42] P. C. Wong, D. Waggoner, J. R. Subramaniam, L. Tessarollo, T. B. Bartnikas, V. C. Culotta, D. L. Price, J. Rothstein, J. D. Gitlin, Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, 6, 2886-2891.
- [43] N. M. Brown, A. S. Torres, P. E. Doan, T. V. O'Halloran, Oxygen and the copper chaperone CCS regulate posttranslational activation of Cu,Zn superoxide dismutase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, 101, 15, 5518-5523.
- [44] J. M. Leitch, L. T. Jensen, S. D. Bouldin, C. E. Outten, P. J. Hart, V. C. Culotta, Activation of Cu,Zn-Superoxide Dismutase in the Absence of Oxygen and the Copper Chaperone CCS *J. Biol. Chem.*, **2009**, 284, 33, 21863-21871.
- [45] R. L. B. Casareno, D. Waggoner, J. D. Gitlin, The Copper Chaperone CCS Directly Interacts with Copper/Zinc Superoxide Dismutase, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 37, 23625-23628.
- [46] P. J. Schmidt, M. Ramos-Gomez, V. C. Culotta, A Gain of Superoxide Dismutase (SOD) Activity Obtained with CCS, the Copper Metallochaperone for SOD1, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 52, 36952-36956.
- [47] L. T. Hall, R. J. Sanchez, S. P. Holloway, H. Zhu, J. E. Stine, T. J. Lyons, B. Demeler, V. Schirf, J. C. Hansen, A. M. Nersissian, J. S. Valentine, P. J. Hart, X-ray Crystallographic and Analytical Ultracentrifugation Analyses of Truncated and Full-Length Yeast Copper Chaperones for SOD (LYS7): A Dimer-Dimer Model of LYS7-SOD Association and Copper Delivery, *Biochem.*, **2000**, 39, 13, 3611-3623.
- [48] A. L. Lamb, A. S. Torres, T. V. O'Halloran, A. C. Rosenzweig, Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone, *Nat. Struct. Biol.*, **2001**, 8, 9, 751-755.
- [49] L. Banci, I. Bertini, F. Cantini, T. Kozyreva, C. Massagni, P. Palumaa, J. T. Rubino, K. Zovo, Human superoxide dismutase 1 (hSOD1) maturation through interaction with human copper chaperone for SOD1 (hCCS), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, 109, 34, 13555-13560.
- [50] R. H. Holm, P. Kennepohl, E. I. Solomon, Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology, *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 7, 2239-2314.
- [51] I. Bertini, H. B. Gray, E. I. Stiefel, J. S. Valentine, Biological Inorganic Chemistry: Structure and Reactivity, in *University Science Books (ed. Ivano Bertini), Sausalito, California*, **2007**, 331-337.
- [52] L. M. Ellerby, D. E. Cabelli, J. A. Graden, J. S. Valentine, Copper - Zinc Superoxide Dismutase: Why Not pH-Dependent?, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 6556-6561.
- [53] A. C. Rosa, D. Corsi, N. Cavi, N. Bruni, F. Dosio, Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses, *Molecules*, **2021**, 26, 7, 1844.
- [54] S. Kubota, J.-T. Yang, Bis[Cyclo(Histidylhistidine)]copper(II) complex that mimics the active-center of superoxide-dismutase has its catalytic activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, 81, 3283-3286.
- [55] R. P. Bonomo, E. Conte, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, R. Purrello, E. Rizzarelli, Copper(II) complexes with cyclo(L-aspartyl-L-aspartyl) and cyclo(L-glutamyl-L-glutamyl) derivatives and their antioxidant properties, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1996**, 14, 3093-3099.

- [56] J. Muller, K. Felix, C. Maichle, E. Lengfelder, J. Strahle, U. Weser, Phenyl-substituted copper di-Schiff base, a potent Cu₂Zn₂ superoxide dismutase mimic surviving competitive biochelation, *Inorg. Chim. Acta*, **1995**, 233, 11-19.
- [57] Q. Luo, Q. Lu, A. Dai, L. Huang, A study on the structure and properties of a new model compound of Cu(II) Zn(II)-superoxide dismutase, *J. Inorg. Biochem.*, **1993**, 51, 655-662.
- [58] C.-M. Liu, R.-G. Xiong, X.-Z. You, Y.-J. Liu, K.-K. Cheung, Crystal structure and some properties of a novel potent Cu₂Zn₂SOD model Schiff base copper(II) complex {[Cu(bppn)](ClO₄)₂·2H₂O}, *Polyhedron*, **1996**, 15, 4565-4571.
- [59] C.-M. Liu, R.-G. Xiong, X.-Z. You, H.-K. Fun, K. Sivakumar, A novel, more vivid Cu₂Zn₂SOD model: crystal structure and some properties of the Schiff base copper(II) complex [Cu(appn)](ClO₄)₂·H₂O, *Polyhedron*, **1997**, 16, 119-123.
- [60] M. L. Pires dos Santos, A. Faljoni-Alário, A. S. Mangrich, A. M da Costa Ferreira, Antioxidant and prooxidant properties of some di-Schiff base copper(II) complexes, *J. Inorg. Biochem.*, **1998**, 71, 71-78.
- [61] H. A. Özbek, S. Çinar, M. Oskay, T. Aydemir, F. Demirhan, Antimicrobial and sod-like activities of N,N'-bis(ferrocenylmethylene)ethylenediamine schiff base and its metal complexes, *J. Chil. Chem. Soc.*, **2021**, 66, 3, 5237-5241.
- [62] V. A. Daier, E. Rivière, S. Mallet-Ladeira, D. M. Moreno, C. Hureau, D. R. Signorella, Synthesis, characterization and activity of imidazolate-bridged and Schiff-base dinuclear complexes as models of Cu,Zn-SOD. A comparative study, *J. Inorg. Biochem.*, **2016**, 163, 162-175.
- [63] R. G. Bhirud, T. S. Srivastava, Synthesis, characterization and superoxide dismutase activity of some ternary copper(II) dipeptide-2,2'-bipyridine, 1,10-phenanthroline and 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline complexes, *Inorg. Chim. Acta*, **1991**, 179, 1, 125-131.
- [64] J. Casanova, G. Alzuet, J. Borrás, O. Carugo, Crystal structures and superoxide dismutase mimetic activity of [CuL₂(Him)₂]·MeOH and [CuL₂(mim)₂]·H₂O [HL = 4-amino-N-(thiazol-2-yl)benzenesulfonamide, Him = imidazole, mim = N-methylimidazole], *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1996**, 2239-2244.
- [65] R. N. Patel, S. Kumar, K. B. Pandeya, E.s.r., visible and SOD studies of imidazolate bridged Cu₂^{II,II}, Cu^{II}Zn^{II} and Cu^{II}Ni^{II} complexes with pentamethyldiethylenetriamine as capping ligand: a plausible model for superoxide dismutase, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 89, 61-68.
- [66] R. N. Patel, S. Kumar, K. B. Pandeya, Paramagnetic resonance and visible spectroscopic properties of binuclear Cu-Cu and Cu-Zn imidazolate-bridged complexes: effective model for active site of superoxide dismutase, *Spectrochimica Acta Part A*, **2000**, 56, 2791-2797.
- [67] M. G. B. Drew, C. Cairns, A. Lavery, S. M. Nelson, Binuclear copper(II) complexes of a 24-membered macrocyclic Schiff base ligand containing intramolecularly bound substrate molecules and ions: X-ray structure of a μ-imidazolate complex, *J. Chem. Soc.: Chem Commun.*, **1980**, 23, 1122-1124.
- [68] P. K. Coughlin, A. E. Martin, J. C. Dewan, E. I. Watanabe, J. E. Bulkowski, J. M. Lehn, S. J. Lippard, Synthesis and structure of the imidazolate-bridged dicopper(II) ion in two binucleating macrocycles, *Inorg. Chem.*, **1984**, 23, 1004-1009.
- [69] P. K. Coughlin, S. J. Lippard, Magnetic, ESR, electrochemical, and potentiometric titration studies of the imidazolate-bridged dicopper(II) ion in a binucleating macrocycle, *Inorg. Chem.*, **1984**, 23, 1446-1451.
- [70] K. G. Strothkamp, S. J. Lippard, Chemistry of the imidazolate-bridged bimetallic center in the copper-zinc superoxide dismutase and its model compounds, *Acc. Chem. Res.*, **1982**, 15, 318-326.
- [71] J. L. Pierre, P. Chautemps, S. Refaif, C. Beguin, A. E. Marzuoki, G. Serratrice, E. Saint-Aman, P. Rey, Imidazolate-bridged dicopper(II) and copper-zinc complexes of a macrobicyclic ligand (cryptand). A possible model for the chemistry of Cu-Zn superoxide dismutase, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 1965-1973.
- [72] H. L. Zhu, L. M. Zheng, D. G. Fu, X. Y. Huang, M. F. Wu, W. X. Tang, The synthesis, structure and SOD-like behaviors of a μ-imidazolato-dicopper(II) complex with a binucleating hexaazamacrocyclic, *J. Inorg. Biochem.*, **1998**, 70, 211-218.

- [73] G. Kolks, S.J. Lippard, J.V. Wasczak, H.R. Lilienthal, Magnetic exchange in imidazolate-bridged copper(II) complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 717-725.
- [74] A. E. Martin, S. J. Lippard, Thiocyanate cleaves the imidazolate-bridged dicopper(II) center in a binucleating macrocycle to form the copper(II) thiocyanate complex $[\text{Cu}_2(\text{SCN})_4\text{C}^*]$. Model chemistry for superoxide dismutase, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 9, 2579-2583.
- [75] P. K. Coughlin, S. J. Lippard, Magnetic, ESR, electrochemical, and potentiometric titration studies of the imidazolate-bridged dicopper(II) ion in a binucleating macrocycle, *Inorg. Chem.*, **1984**, *23*, 10, 1446-1451.
- [76] M. Sato, S. Nagae, K. Ohmae, J.-I. Nakaya, K. Miki, N. Kasai, Preparation and crystal structure of an imidazolate-bridged polynuclear complex $[\{\text{Cu}(\text{im})(\text{dien})\}_n][\text{ClO}_4]_n$ (dien = diethylenetriamine), and its properties in dimethyl sulfoxide solution, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1986**, 1949-1953.
- [77] R.N. Patel, X-band electron paramagnetic resonance, optical spectra and some biological (SOD and antimicrobial activity) studies of the copper(II) complexes: a plausible model for superoxide dismutase, *Spectrochim. Acta Part A*, **2004**, *60*, 2201-2208.
- [78] R. N. Patel, N. Singh, K. K. Shukla, U. K. Chauhan, Novel copper(II)-dien-imidazole/imidazolate-bridged copper(II) complexes: Crystal structure of $[\text{Cu}(\text{dien})(\text{Him})](\text{ClO}_4)_2$ and of $[(\text{dien})\text{Cu}(\mu\text{-im})\text{Cu}(\text{dien})](\text{ClO}_4)_3$, a homobinuclear model for the copper(II) site of the CuZn-superoxide dismutase, *Spectrochim. Acta Part A*, **2005**, *61*, 287-297.
- [79] Q. Yuan, K. Cai, Z.-P. Qi, Z.-S. Bai, Z. Su, W.-Y. Sun, Imidazolate-bridged dicopper(II) and copper(II)-zinc(II) complexes of macrocyclic ligand with methylimidazol pendant: Model study of copper(II)-zinc(II) superoxide dismutase, *J. Inorg. Biochem.*, **2009**, *103*, 8, 1156-1161.
- [80] H.-L. Zhu, L.-M. Zheng, D.-G. Fu, X.-Y. Huang, M.-F. Wu, W.-X. Tang, The synthesis, structure and SOD-like behaviors of a μ -imidazolato-dicopper(II) complex with a binucleating hexaazamacrocyclic, *J. Inorg. Biochem.*, **1998**, *70*, 3-4, 211-218.
- [81] S. Li, D. Li, D. Yang, Y. Li, J. Huang, K. Yu, W. Tang, A novel imidazolate-bridged heterodinuclear Cu(II)/Zn(II) complex derived from a unique macrocyclic ligand with two hydroxyethyl pendants, *Chem. Commun.*, **2003**, 880-881.
- [82] Q. Tang, J.-Q. Wu, H.-Y. Li, Y.-F. Feng, Z. Zhang, Y.-N. Liang, Dinuclear Cu(II) complexes based on p-xylylene-bridged bis(1,4,7-triazacyclononane) ligands: Synthesis, characterization, DNA cleavage abilities and evaluation of superoxide dismutase- and catalase-like activities, *Appl. Organometal Chem.*, **2018**, *32*, 5, 4297.
- [83] D. Li, S. Li, D. Yang, J. Yu, J. Huang, Y. Li, W. Tang, Syntheses, Structures, and Properties of Imidazolate-Bridged Cu(II)–Cu(II) and Cu(II)–Zn(II) Dinuclear Complexes of a Single Macrocyclic Ligand with Two Hydroxyethyl Pendants, *Inorg. Chem.*, **2003**, *42*, 6071-6081.
- [84] H. Ohtsu, Y. Shimazaki, A. Odani, O. Yamauchi, W. Mori, S. Itoh, S. Fukuzumi, Synthesis and Characterization of Imidazolate-Bridged Dinuclear Complexes as Active Site Models of Cu,Zn-SOD, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 5733-5741.
- [85] M. Sato, S. Nagae, M. Uehara, J.-I. Nakaya, Properties of imidzolate bridged copper(II)-zinc(II) complexes, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1984**, *24*, 1661-1663.
- [86] J.-L. Pierre, P. Chautemps, S. Refaif, C. Beguin, A. E. Marzouki, G. Serratrice, E. Saint-Aman, P. Rey, Imidazolate-bridged dicopper(II) and copper-zinc complexes of a macrobicyclic ligand (cryptand). A possible model for the chemistry of Cu-Zn superoxide dismutase, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 1965-1973.
- [87] W. Mao, M.-Q. Chen, X.-S. Tan, J. Liu, W.-X. Tang, Synthesis, Crystal Structure, and Properties of a New Imidazolate-Bridged Copper-Zinc Heterobinuclear Complex with Triethylenetetramine Ligands, *Inorg. Chem.*, **1995**, *34*, 2889-2893.
- [88] R. N. Patel, N. Singh, K. K. Shukla, V. L. N. Gundla, U. K. Chauhan, Synthesis, structure and biomimetic properties of Cu(II)-Cu(II) and Cu(II)-Zn(II) binuclear complexes: possible models for the chemistry of Cu-Zn superoxide dismutase, *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, *99*, 651-663.

- [89] I. Szilágyi, I. Labádi, K. Hernadi, I. Pálkó, N. V. Nagy, L. Korecz, A. Rockenbauer, Z. Kele, T. Kiss, Speciation study of an imidazolate-bridged copper(II)–zinc(II) complex in aqueous solution, *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, *99*, 1619-1629.
- [90] T. U. da Silva, E. T. da Silva, C. H. da S. Lima, S. de P. Machado, Theoretical study of binuclear Cu-M complexes (M = Zn, Cu, Ni) with p-xylylene-bridged-bis(1,4,7-triaza-cyclononane) ligands: Possible CuZnSOD mimics, *Inorg. Chim. Acta*, **2020**, *501*, 119232.
- [91] D.-X. Yang, S.-A. Li, D.-F. Li, M. Cheng, J. Huang, W.-X. Tang, Synthesis, structure and properties of an imidazolato-bridged dicopper complex of a novel macrocycle with two alcohol-pendants as an active site model of Cu,Zn-SOD, *Polyhedron*, **2003**, *22*, 925-932.
- [92] R. N. Patel, N. Singh, K. K. Shukla, U. K. Chauhan, Novel copper(II)-dien-imidazole/imidazolate-bridged copper(II) complexes: Crystal structure of [Cu(dien)(Him)](ClO₄)₂ and of [(dien)Cu(μ-im)Cu(dien)](ClO₄)₃, a homobinuclear model for the copper(II) site of the CuZn-superoxide dismutase, *Spectrochim. Acta Part A*, **2005**, *61*, 287-297.
- [93] S. Nedd, R. L. Redler, E. A. Proctor, N. V. Dokholyan, A. N. Alexandrova, Cu,Zn-Superoxide Dismutase without Zn is Folded but Catalytically Inactive, *J. Mol. Biol.*, **2014**, *426* 4112-4124.
- [94] L. J. Ming, J. S. Valentine, Chem. Insights into SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis from NMR studies of Ni²⁺- and other metal-ion-substituted wild-type copper-zinc superoxide dismutases, *J. Biol. Inorg.*, **2014**, *19*, 647-657.
- [95] R. N. Patel, N. Singh, K. K. Shukla, V. L. N. Gundla, U. K. Chauhan, Synthesis, structure and biomimetic properties of Cu(II)-Cu(II) and Cu(II)-Zn(II) binuclear complexes: possible models for the chemistry of Cu-Zn superoxide dismutase, *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, *44*, 31-35.
- [96] K. Jitsukawa, M. Harata, H. Arai, H. Sakurai, H. Masuda, SOD activities of the copper complexes with tripodal polypyridylamine ligands having a hydrogen bonding site, *Inorg. Chim. Acta*, **2001**, *324*, 108-116.
- [97] R. Diószegi, D. Bonczidai-Kelemen, A. Cs. Bényei, N. V. May, I. Fábián, N. Lihi, Copper(II) Complexes of Pyridine-2,6-dicarboxamide Ligands with High SOD Activity, *Inorg. Chem.*, **2022**, *61*, 4, 2319-2332.
- [98] M. A. Mekhail, K. J. Smith, D. M. Freire, K. Pota, N. Nguyen, M. E. Burnett, K. N. Green, Increased Efficiency of a Functional SOD Mimic Achieved with Pyridine Modification on a Pycen-Based Copper(II) Complex, *Inorg. Chem.*, **2023**, *62*, 14, 5415-5425.
- [99] J. Labuda, L. Fenikova, Z. Durackova, Cyclic voltammetry and bioassay of some superoxide dismutase mimetic copper complex compound, *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, **1997**, *44*, 31-35.
- [100] R. G. Bhirud, T. S. Srivastava, Superoxide dismutase activity of Cu(II)₂(aspirinate)₄ and its adducts with nitrogen and oxygen donors, *Inorg. Chim. Acta*, **1990**, *173*, 121-125.
- [101] A. L. Aduhijleh, C. Woods, Synthesis, crystal structure and superoxide dismutase mimetic activity of hexakis (N-methylimidazole) copper(II) salicylate, *Inorg. Chem. Comm.*, **2002**, *5*, 269-273.
- [102] N. T. M. Thao, H. D. K. Do, N. N. Nam, N. K. S. Tran, T. T. Dan, Antioxidant Nanozymes: Mechanisms, Activity Manipulation, and Applications, *Micromachines*, **2023**, *14*, 5, 1017.
- [103] J. Casanova, G. Alzueta, S. Ferrer, J. Latorre, J. Antonio Ramírez, J. N. Borrás, Superoxide dismutase activity of ternary copper complexes of sulfathiazole and imidazole derivatives. Synthesis and properties of [CuL₂(R-Him)₂] [HL=4-amino-N-(thiazol-2-yl)benzenesulfonamide, R-Him=4-methylimidazole, 4,4-dimethylimidazoline or 1,2-dimethylimidazole]. Crystal structure of [CuL₂(4,4-dimethylimidazoline)₂], *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, *304*, 2, 170-177.
- [104] E. Bienvenue, S. Choua, M. A. Lobo-Recio, C. Marzin, P. Pacheco, P. Seta, G. Tarrago, Structure and superoxide dismutase activity of Ru(II), Cu(II), and Mn(II) macrocyclic complexes, *J. Inorg. Biochem.*, **1995**, *57*, 3, 157-168.
- [105] I. Bertini, S. Mangani, M. S. Viezzoli, *Structure and Properties of Copper-Zinc Superoxide Dismutases*, in *Adv. Inorg. Chem.*, ed.: A. G. Sykes, Academic Press, **1998**, 127-250.

- [106] L. L. Costanzo, G. De Guidi, S. Giuffrida, E. Rizzarelli, G. Vecchio, Determination of superoxide dismutase-like activity of copper(II) complexes. Relevance of the speciation for the correct interpretation of in vitro $O_2^{\cdot -}$ scavenger activity, *J. Inorg. Biochem.*, **1993**, *50*, 4, 273-281.
- [107] Z. Ďuračková, M. A. Mendiola, M. T. Sevilla, A. Valent, Thiohydrazone copper(II) complexes. The relationship between redox properties and superoxide dismutase mimetic activity, *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, **1999**, *48*, 1, 109-116.
- [108] G. Condorelli, L. L. Costanzo, G. De Guidi, S. Giuffrida, E. Rizzarelli, G. Vecchio, E. Rizzarelli, Inhibition of photohemolysis by copper(II) complexes with Sod-like activity, *J. Inorg. Biochem.*, **1994**, *54*, 4, 257-265.
- [109] R. P. Bonomo, V. Bruno, E. Conte, G. De Guidi, D. L. Mendola, G. Maccarrone, F. Nicoletti, E. Rizzarelli, S. Sortino, G. Vecchio, Potentiometric, spectroscopic and antioxidant activity studies of SOD mimics containing carnosine, *Dalton Trans.*, **2003**, *23*, 4406-4415.
- [110] G. Csire, J. Demjén, S. Timári, K. Várnagy, Electrochemical and SOD activity studies of copper(II) complexes of bis(imidazol-2-yl) derivatives, *Polyhedron*, **2013**, *61*, 202-212.
- [111] G. Arena, D. La Mendola, G. Pappalardo, I. Sóvágó, E. Rizzarelli, Interactions of Cu^{2+} with prion family peptide fragments: Considerations on affinity, speciation and coordination, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, *256*, 19-20, 2202-2218.
- [112] D. R. Brown, B. S. Wong, F. Hafiz, C. Clive, S. J. Haswell, I. M. Jones, Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase, *Biochem. J.*, **2000**, *345*, 3, 767.
- [113] P. Stanczak, H. Kozłowski, Can chicken and human PrPs possess SOD-like activity after β -cleavage?, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2007**, *352*, 198-202.
- [114] R. Pogni, M. C. Baratto, E. Busi, R. Basosi, EPR and $O_2^{\cdot -}$ scavenger activity: Cu(II)-peptide complexes as superoxide dismutase models, *J. Inorg. Biochem.*, **1999**, *73*, 3, 157-165.
- [115] M. Casolaro, M. Chelli, M. Ginanneschi, F. Laschi, L. Messori, M. Muniz-Miranda, A. M. Papini, T. Kowalik-Jankowska, H. Kozłowski, Spectroscopic and potentiometric study of the SOD mimic system copper(II)/acetyl-L-histidylglycyl-L-histidylglycine, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, *89*, 181-190.
- [116] A. Jancsó, Z. Paksi, N. Jakab, B. Gyuresik, A. Rockenbauer, T. Gajda, Solution chemical properties and catecholase-like activity of the copper(II)-Ac-His-His-Gly-His-OH system, a relevant functional model for copper containing oxidases, *Dalton Trans.*, **2005**, *19*, 3187-3194.
- [117] N. I. Jakab, A. Jancsó, T. Gajda, B. Gyuresik, A. Rockenbauer, Copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of N-acetyl-His-Pro-His-His-NH₂: equilibria, solution structure and enzyme mimicking, *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, *102*, 1438-1448.
- [118] B. Bóka, A. Myari, I. Sóvágó, N. Hadjiladis, Copper(II) and zinc(II) complexes of the peptides Ac-HisValHis-NH₂ and Ac-HisValGlyAsp-NH₂ related to the active site of the enzyme CuZnSOD, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, *98*, 1, 113-122.
- [119] S. Timári, R. Cerea, K. Várnagy, Characterization of CuZnSOD model complexes from a redox point of view: redox properties of copper(II) complexes of imidazole containing ligands, *J. Inorg. Biochem.*, **2011**, *105*, 8, 1009-1017.
- [120] G. Csire, S. Timári, J. Asztalos, J. M. Király, M. Kiss, K. Várnagy, Coordination, redox properties and SOD activity of Cu(II) complexes of multihistidine peptides, *J. Inorg. Biochem.*, **2017**, *177*, 198-210.
- [121] A. J. Bard, R. Parsons, J. Jordan, *Standard Potentials in Aqueous Solution*, Marcel Dekker Inc., New York, **1985**.
- [122] N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements 2ed.*, Butterworth-Heinemann, **1997**.
- [123] J. M. Fernández-G., F. A. López-Durán, S. Hernández-Ortega, V. Góez-Vidales, N. Marcías-Ruvalcaba, M. Aguilar-Martínez, The structures and cyclic voltammetry of three copper(II) complexes derived from bulky ortho-hydroxy Schiff bases, *J. Mol. Struct.*, **2002**, *612*, 69-79.
- [124] K. Miyoshi, H. Tanaka, E. Kimura, S. Tsuboyama, S. Murata, H. Shimizu, K. Ishizu, Electrochemical and spectroscopic studies on copper(II) complexes of macrocyclic ligands

- as models for square-pyramidal metal active sites of copper(II) complexes of bleomycin and glutathione, *Inorg. Chim. Acta*, **1983**, 78, 23-30.
- [125] P. V. Robandt, R. R. Schroeder, D. B. Rorabacher, Cyclic voltammetric characterization of rate constants for conformational change in an electron-transfer square scheme involving a copper(II)/copper(I) macrocyclic tetrathiaether complex, *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 3957-3963.
- [126] N. M. Villeneuve, R. R. Schroeder, L. A. Ochrymowycz, D. B. Rorabacher, Cyclic voltammetric evaluation of rate constants for conformational transitions accompanying electron transfer. Effect of varying structural constraints in copper(II/I) complexes with dicyclohexanediyl-substituted macrocyclic tetrathiaethers, *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 4475-4483.
- [127] R. P. Bonomo, G. Di Natale, E. Rizzarelli, G. Tabbí, L. I. Vagliasindi, Copper(II) complexes of prion protein PEG11-tetraoctarepeat fragment: spectroscopic and voltammetric studies, *Dalton Trans.*, **2009**, 2637-2646.
- [128] B. R. James, R. J. P. Williams, 383. The oxidation-reduction potentials of some copper complexes, *J. Chem. Soc.*, **1961**, 2007-2019.
- [129] R. P. Bonomo, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, R. Purrello, E. Rizzarelli, G. Tabbi, Coordinating properties of cyclopeptides. Thermodynamic and spectroscopic study on the formation of copper(II) complexes with cyclo(Gly-His)₄ and cyclo(Gly-His-Gly)₂ and their superoxide dismutase-like activity, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1998**, 22, 3851-3858.
- [130] K. Takehara, Y. Ide, Electrochemistry of Cu(II)-peptide complexes containing histidine residues II. Anomalous current fluctuation in the reduction process of Cu(II)-GGH, *Inorg. Chim. Acta*, **1991**, 186, 1, 73-78.
- [131] K. Takehara, Y. Ide, Electrochemistry of copper(II)-peptide complexes containing histidine residues, *Inorg. Chim. Acta*, **1991**, 183, 2, 195-202.
- [132] R. P. Bonomo, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, G. Tabbí, Copper(II) Binding Modes in the Prion Octapeptide PHGGGWGQ: A Spectroscopic and Voltammetric Study, *Chemistry - A Eur. J.*, **2000**, 6, 22, 4195-4202.
- [133] R. P. Bonomo, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, G. Tabbi, L. I. Vagliasindi, Studies of nitric oxide interaction with mono- and dinuclear copper(II) complexes of prion protein bis-octarepeat fragments, *Dalton Trans.*, **2008**, 29, 3805-3816.
- [134] D. T. Sawyer, J. S. Valentine, How super is superoxide? *Acc. Chem. Res.*, **1981**, 14, 12, 393-400.
- [135] I. Sóvágó, K. Ősz, Metal ion selectivity of oligopeptides, *Dalton Trans.*, **2006**, 3841-3854.
- [136] E. Farkas, I. Sóvágó, Metal complexes of amino acids and peptides, in *Amino Acids, Peptides and Proteins: Volume 41, The Royal Society of Chemistry*, **2017**, 100-151.
- [137] H. Sigel, R. B. Martin, Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands, *Chemical Rev.*, **1982**, 82, 4, 385-426.
- [138] I. Sóvágó, *Coordination equilibria in biologically active systems*, in Biocoordination Chemistry, (ed.: K. Burger), Ellis Horwood, New York **1990**, 4, 135-184.
- [139] L. D. Pettit, J. E. Gregor, H. Kozłowski, *Complex formation between metal ions and peptides*, in Perspectives on Bioinorganic Chemistry, (eds.: R. W. Hay, J. R. Dilworth, K. B. Nolan) Jai Press Ltd., London, **1991**, 1, 1-41.
- [140] L. D. Pettit, R. A. Robinson, *Metal-peptide complex formation*, in Handbook of metal-ligand interaction in biological fluids, (ed.: G. Berthon) Marcel Dekker Inc., New York, **1995**, 1, 636-647.
- [141] H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, Specific structure-stability relations in metalloptides, *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, 184, 1, 319-346.
- [142] I. Sóvágó, C. Kállay, K. Várnagy, Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, 256, 19-20, 2225-2233.
- [143] T. Kowalik-Jankowska, H. Kozłowski, E. Farkas, I. Sóvágó, *Nickel ion complexes of amino acids and peptides*, In Nickel and Its Surprising Impact in Nature, H. Sigel, A. Sigel, R. K. O. Sigel, Eds. Wiley: **2007**, Ch. 3, Vol. 2, 63-107.

- [144] H. Kozłowski, T. Kowalik-Jankowska, M. Jezowska-Bojczuk, Chemical and biological aspects of Cu^{2+} interactions with peptides and aminoglycosides, *Coord. Chem. Rev.*, **2005**, 249, 2323-2334.
- [145] M. Orfei, M. C. Alcaro, G. Marcon, M. Chelli, M. Ginanneschi, H. Kozłowski, J. Brasuń, L. Messori, Modeling of copper(II) sites in proteins based on histidyl and glycyl residues, *J. Inorg. Biochem.*, **2003**, 97, 3, 299-307.
- [146] G. Csire, I. Turi, I. Sóvágó, E. Kárpáti, Cs. Kállay, Complex formation processes and metal ion catalyzed oxidation of model peptides related to the metal binding site of the human prion protein, *J. Inorg. Biochem.*, **2020**, 203, 110927.
- [147] Zs. Kastal, A. Balabán, Sz. Vida, Cs. Kállay, L. Nagy, K. Várnagy, I. Sóvágó, Copper(II), Nickel(II) and Zinc(II) Complexes of Peptide Fragments of Tau Protein, *Molecules*, **2024**, 29, 10, 2171.
- [148] C. Kállay, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, Thermodynamic and structural characterization of the macrochelates formed in the reactions of copper(II) and zinc(II) ions with peptides of histidine, *Inorg. Chim. Acta*, **2009**, 362, 935-945.
- [149] A. E. Martell, R. M. Smith, *Critical stability constants* in Biochemical Education, Plenum Press, New York and London, **1982**, 5, 604.
- [150] C. Damante, K. Ósz, Z. Nagy, G. Pappalardo, G. Grasso, G. Impellizzeri, E. Rizzarelli és I. Sóvágó, „Metal ion interactions within the 1-16 N-terminal region of β -amyloid” *J. Pept. Science*, **2008**, 14, 87-87.
- [151] D. R. Brown és H. Kozłowski, „Biological inorganic and bioinorganic chemistry of neurodegeneration based on prion and Alzheimer diseases” *Dalton Trans.*, **2004**, 13, 1907-1917.
- [152] P. Stanczak, D. Valensin, P. Juszczak, Z. Grzonka, C. Migliorini, E. Molteni, G. Valensin, E. Gaggelli és H. Kozłowski, Structure and stability of the Cu^{II} complexes with tandem repeats of the chicken prion, *Biochem.*, **2005**, 44, 12940-12954.
- [153] A. Myari, G. Malandrinos, Y. Deligiannakis, J. C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, Z. Nagy, I. Sóvágó, Interaction of $\text{Cu}(2+)$ with His-Val-His and of $\text{Zn}(2+)$ with His-Val-Gly-Asp, two peptides surrounding metal ions in Cu,Zn-superoxide dismutase enzyme, *J. Inorg. Biochem.*, **2001**, 85, 4, 253-261.
- [154] A. Myari, G. Malandrinos, J. Plakatouras, N. Hadjiliadis, I. Sóvágó, Interaction of $\text{Cu}(\text{II})$ with His-Val-Gly-Asp and of $\text{Zn}(\text{II})$ with His-Val-His, two peptides at the active site of Cu,Zn-superoxide dismutase, *Bioinorg. Chem. Appl.*, **2003**, 1, 1, 99-112.
- [155] S. Rajkovic, C. Kállay, R. Serényi, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, Complex formation processes of terminally protected peptides containing two or three histidyl residues. Characterization of the mixed metal complexes of peptides, *Dalton Trans.*, **2008**, 37, 5059-5071.
- [156] C. Kállay, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, Copper(II) complexes of terminally protected pentapeptides containing three histidyl residues in alternating positions, Ac-His-Xaa-His-Yaa-His- NH_2 , *Dalton Trans.*, **2006**, 38, 4545-4552.
- [157] S. Timári, C. Kállay, K. Ósz, I. Sóvágó, K. Várnagy, Transition metal complexes of short multihistidine peptides, *Dalton Trans.*, **2009**, 11, 1962-1971.
- [158] M. Klewpatinond, J. H. Viles, Empirical rules for rationalising visible circular dichroism of Cu^{2+} and Ni^{2+} histidine complexes: Applications to the prion protein, *FEBS Letters*, **2007**, 581, 7, 1430-1434.
- [159] N. M. Chiera, M. Rowinska-Zyrek, R. Wiczorek, R. Guerrini, D. Witkowska, M. Remelli, H. Kozłowski, Unexpected impact of the number of glutamine residues on metal complex stability, *Metallomics*, **2013**, 5, 3, 214-221.
- [160] T. Kiss, *Coordination equilibria in biologically active systems*, in Biocoordination Chemistry, (ed. K. Burger), Ellis Horwood, New York, **1990**, 46-116.
- [161] E. Kamysz, A. Kotynia, Z. Czyżnikowska, M. Jaremko, L. Jaremko, M. Nowakowski, J. Brasun, Sialorphin and its analog as ligands for copper(II) ions, *Polyhedron*, **2013**, 55, 216-224.

- [162] C. Kállay, Á. Dávid, S. Timári, E. M. Nagy, D. Sanna, E. Garribba, G. Micera, P. De Bona, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, I. Sovago, Copper(II) complexes of rat amylin fragments, *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 9711-9721.
- [163] E. Székely, G. Csire, B. D. Balogh, J. Z. Erdei, J. M. Király, J. Kocsi, J. Pinkóczy, K. Várnagy, The Role of Side Chains in the Fine-Tuning of the Metal-Binding Ability of Multihistidine Peptides, *Molecules*, **2022**, 27, 3435.
- [164] M. Lukács, Gy. Szunyog, Á. Grenács, N. Lihi, Cs. Kállay, G. Di Natale, T. Campagna, V. Lanza, G. Tabbi, G. Pappalardo et al, Copper(II) Coordination Abilities of the Tau Protein's N-Terminus Peptide Fragments: A Combined Potentiometric, Spectroscopic and Mass Spectrometric Study, *Chempluschem*, **2019**, 84, 11, 1697-1708.
- [165] R. Qing, S. Hao, E. Smorodina, D. Jin, A. Zalevsky, S. Zhang, Protein design: From the aspect of water solubility and stability, *Chem. Rev.*, **2022**, 122, 18, 14085-14179.
- [166] R. B. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 14, 2149-2154.
- [167] S. L. Pedersen, K. J. Jensen, Instruments for automated peptide synthesis. *Methods Mol. Biol.*, **2013**, 544-615.
- [168] E. Atherton, D. L. J. Clive, R. C. Sheppard, Polyamide supports for polypeptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97 (22), 6584-6585.
- [169] G. Barany, N. Kneib-Cordonier és D. G. Mullen, Solid-phase peptide synthesis: a silver anniversary report, *Int. J. Pept. and Prot. Res.*, **1987**, 30, 705-739.
- [170] L. A. Carpino, G. Y. Han, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group, *J. Org. Chem.*, **1972**, 37 (22), 3404-3409.
- [171] H. Rink, Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin, *Tetrahedron Letters*, **1987**, 28 (33), 3787-3790.
- [172] P. Gans, A. Sabatini és A. Vacca, SUPERQUAD - an improved general program for computation of formation-constants from potentiometric data, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1985**, 6, 1195-1200.
- [173] L. Zékány és I. Nagypál, PSEQUAD: A comprehensive program for the evaluation of potentiometric and/or spectrophotometric equilibrium data using analytical derivatives, in Computational methods for the determination of formation constants (ed.: D. Leggett), New York, Plenum Press, **1985**, 291-353.
- [174] G. Eriksson, Algorithm for the computation of aqueous multicomponent, multiphase equilibria, *Anal. Chim. Acta - Comp. Techn. and Opt.*, **1979**, 3, 375-383.
- [175] G. Gran, Determination of the equivalent point in potentiometric titrations, *Acta Chem. Scand.*, **1950**, 4, 559-577.
- [176] H. M. Irving, M. G. Miles, L. D. Pettit, A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode, *Anal. Chim. Acta*, **1967**, 38, 475-488.
- [177] D. L. Nguyen, R. Seyer, A. Heitz, B. Castro, Renin substrates. Part 1. Liquid-phase synthesis of the equine sequence with benzotriazolylxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP), *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1985**, 1025-1031.
- [178] E. Prenesti, P. G. Daniele, S. Berto, S. Toso, Spectrum-structure correlation for visible absorption spectra of copper(II) complexes showing axial co-ordination in aqueous solution, *Polyhedron*, **2006**, 25, 2815-2823.
- [179] H. Kozłowski, G. Micera, *Biological fluids in bioinorganic chemistry*, in Handbook of metal-ligand interactions (ed.: G. Berthoin), Marcel Dekker Inc., New York, **1995**, 1, 566-582.
- [180] A. Cotton, Absorption inégale des rayons circulaires droit et gauche dans certains corps actifs, *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences*, **1895**, 120, 989-991.
- [181] J. H. Viles, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, D. B. Goodin, P. E. Wright, H. J. Dyson, Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 5, 2042-2047.
- [182] R. B. Martin, J. M. Tsangaris, J. W. Chang, Double octant rule for planar transition metal ion complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 90, 3, 821-823.

- [183] J. M. Tsangaris, R. B. Martin, Visible circular dichroism of copper(II) complexes of amino acids and peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 14, 4255-4260.
- [184] N. Berova, K. Nakanishi, R. Woody, *Circular Dichroism: Principles and Applications (Second Edition)*, Ed Wiley, **2000**.
- [185] M. Mylonas, A. Krężel, J. Plakatouras, N. Hadjiliadis, W. Bal, Interactions of Transition Metal Ions with His-Containing Peptide Models of Histone H₂A, *J. Mol. Liq.*, **2005**, 118, 119-129.
- [186] C. Conato, H. Kozłowski, J. Swiatek-Kozłowska, P. Młynarz, M. Remelli, S. Silvestri, Formation equilibria of nickel complexes with glycyl-histidyl-lysine and two synthetic analogues, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, 98, 1, 153-160.
- [187] J. W. Chang, R. B. Martin, Visible circular dichroism of planar nickel ion complexes of peptides and cysteine and derivatives, *J. Phys. Chem.*, **1969**, 73, 4277-4283.
- [188] J. M. Tsangaris, J. W. Chang, R. B. Martin, Ultraviolet circular dichroism of cupric and nickel ion complexes of amino acids and peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, 91, 726-731.
- [189] D. H. Evans, K. M. O'Connell, R. A. Petersen, M. J. Kelly, Cyclic Voltammetry, *J. Chem. Educ.*, **1983**, 60, 4, 290-293.
- [190] G. A. Mabbott, An introduction to cyclic voltammetry, *J. Chem. Educ.*, **1983**, 60, 9, 697-702.
- [191] P. T. Kissinger, W. R. Heineman, Cyclic voltammetry, *J. Chem. Educ.*, **1983**, 60, 9, 702-706.
- [192] N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, J. L. Dempsey, A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry, *J. Chem. Educ.*, **2018**, 95, 2, 197-206.
- [193] E. Farkas, P. Buglyó, É. A. Enyedy, M. A. Santos, Factors affecting the metal ion-hydroxamate interactions II: Effect of the length of the connecting chain on the Fe(III), Mo(VI) and V(V) complexation of some new desferrioxamine B (DFB) model dihydroxamic acids, *Inorg. Chim. Acta*, **2004**, 357, 2451-2461.
- [194] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 21, 7512-7515.
- [195] K. Ősz, G. Lente, C. Kállay, New protonation microequilibrium treatment in the case of some amino acid and peptide derivatives containing a bis(imidazolyl)methyl group, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 1039-1047.
- [196] C. S. Ho, C. W. K. Lam, M. H. M. Chan, R. C. K. Cheung, L. K. Law, L. C. W. Lit, K. F. Ng, M. W. M. Suen, H. L. Tai, Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications, *Clin. Biochem. Rev.*, **2003**, 24, 1, 3-12.
- [197] V. H. Wysocki, K. A. Resing, Q. Zhang, G. Cheng, Mass spectrometry of peptides and proteins, *Methods*, **2005**, 35, 3, 211-222.
- [198] S. Goldstein, C. Michel, W. Bors, M. Saran, G. Czapski, A critical reevaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity, *Free Radical Biology and Medicine*, **1988**, 4, 5, 295-303.
- [199] M.-A. Takahashi, K. Asada, A Flash-Photometric Method for Determination of Reactivity of Superoxide: Application to Superoxide Dismutase Assay, *J. Biochem.*, **1982**, 91, 3, 889-896.
- [200] J. Y. Zhou, P. Prognon, Raw material enzymatic activity determination: A specific case for validation and comparison of analytical methods - The example of superoxide dismutase (SOD), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**, 40, 1143-1148.
- [201] S. Durot, C. Polcar, F. Cisnetti, F. Lambert, G. Renault Pelosi, G. Blain, H. Korri-Yousseoufi, J.-P. Mahy, Series of Mn complexes based on N-centered ligands and superoxide - reactivity in an anhydrous medium and SOD-like activity in an aqueous medium correlated to Mn^{II}/Mn^{III} redox potentials, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2005**, 17, 3513-3523.
- [202] Erdei Judit Zsuzsa, Diplomamunka, Debreceni Egyetem, Debrecen, **2016**.
- [203] Solymosi Orsolya, Szakdolgozat, Debreceni Egyetem, Debrecen, **2015**.
- [204] Erdei Judit, TDK dolgozat, Debreceni Egyetem, Debrecen, **2014**.
- [205] Kocsi Judit, Szakdolgozat, Debreceni Egyetem, Debrecen, **2014**.
- [206] Kocsi Judit, Diplomamunka, Debreceni Egyetem, Debrecen, **2017**.

- [207] Király Judit Mária, Diplomamunka, Debreceni Egyetem, Debrecen, **2015**.
- [208] Pinkóczy Júlia, Szakdolgozat, Debreceni Egyetem, Debrecen, **2016**.
- [209] T. Kiss, Z. Szűcs, Studies on transition-metal–peptide complexes. Part 12. Copper(II) complexes of dipeptides containing phenylalanine and tyrosine, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1986**, *11*, 2443-2447.
- [210] C. Kállay, K. Ósz, A. Dávid, Z. Valastyán, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, I. Sóvágó, Zinc(II) binding ability of tri-, tetra- and penta-peptides containing two or three histidyl residues, *Dalton Trans.*, **2007**, *36*, 4040-4047.
- [211] G. Grasso, A. Magri, F. Bellia, A. Pietropaolo, D. La Mendola, E. Rizzarelli, The copper(II) and zinc(II) coordination mode of HExxH and HxxEH motif in small peptides: The role of carboxylate location and hydrogen bonding network, *J. Inorg. Biochem.*, **2014**, *130*, 92-102.
- [212] V. Józai, Z. Nagy, K. Ósz, D. Sanna, G. Di Natale, D. La Mendola, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, Transition metal complexes of terminally protected peptides containing histidyl residues, *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, *100*, 1399-1409.
- [213] B. D. Balogh, B. Szakács, G. Di Natale, G. Tabbi, G. Pappalardo, I. Sóvágó, K. Várnagy, Copper (II) binding properties of an octapeptide fragment from the R3 region of tau protein: A combined potentiometric, spectroscopic and mass spectrometric study, *J. Inorg. Biochem.*, **2021**, *217*, 111358.
- [214] R. Kachadourian, I. Batinic-Haberle, I. Fridovich, Syntheses and superoxide dismuting activities of partially (1–4) β -chlorinated derivatives of manganese(III) meso-tetrakis(N-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin, *Inorg. Chem.*, **1999**, *38*, 391-396.

8. FÜGGELÉK

Tudományos publikációk

Az értekezés alapját képző közlemények:

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények:

1. E. Székely, G. Csire, B.D. Balogh, J. Z. Erdei, J. M. Király, J. Kocsi, J. Pinkóczy, K. Várnagy, **The Role of Side Chains in the Fine-Tuning of the Metal-Binding Ability of Multihistidine Peptides**, *Molecules*, **2022**, *27*, 3435.
2. E. Székely, M. Molnár, N. Lihi, K. Várnagy, **Characterization of Copper(II) and Zinc(II) Complexes of Peptides Mimicking the CuZnSOD Enzyme**, *Molecules*, **2024**, *29*, 795.

Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások:

1. Székely Enikő, Várnagy Katalin: **Az oldalláncok szerepe a SOD enzimet modellező peptidek komplexképző sajátságaira**, Komplexkémiái Kollokvium, Debrecen, 2022. 05. 25-27
2. Székely Enikő: **Az oldalláncok szerepe a peptidek fémionkötő képességének finomszabályozásában**, Kárpát-medencei Fiatal Magyar Kutatók Konferenciája, 2021. 03. 30-31.
3. Székely Enikő: **Az oldalláncok szerepe a peptidek fémionkötő képességének finomszabályozásában**, XXIII. Tavaszi Szél Konferencia, Budapest (online), 2020. 10. 16.
4. Székely Enikő: **Aszparaginsav hatása a multihisztidin peptidek réz(II)-komplexei egyensúlyi és redoxi sajátságaira**, XXII. Tavaszi Szél Konferencia, Debrecen, 2019. 05. 03-05.

5. Székely Enikő: **Oldallánc hatása a multihisztidin peptidek réz(II)-komplexei redoxi sajátosságaira**, XXXIV. Országos Diákköri Konferencia, Budapest, 2019. 03. 21-23.

Az értekezés alapját képező poszterek:

1. Várnagy Katalin, Székely Enikő, Csire Gizella: **The role of side chains in the fine tuning of metal binding ability of peptides**, Advanced workshop on Solution Chemistry of TCEs, Białystok, 2019. 01. 22-23.
2. Székely Enikő, Csire Gizella, Várnagy Katalin: **Az oldalláncok szerepe a peptidek fémionkötő képességének finomszabályozásában**, I. FKF Szimpózium, Debrecen, 2019. 04. 03-05.
3. Székely E., Csire G., Erdei J. Zs., Király J. M., Pinkóczy J., Várnagy K.: **Fine-tuning the metal ion-binding abilities of bio mimicking peptides by altering the side chains**, International Symposium on Thermodynamics of Metal Complexes (ISMEC 2021), Białystok (Poland), 2021. 06. 16-18.
4. Székely Enikő, Molnár Mariann, Várnagy Katalin: **Investigation of transition metal complexes of biomimetic peptides**, International Symposium on Thermodynamics of Metal Complexes (ISMEC 2022), Valencia (Spain), 2022. 06. 05-08.

Az értekezés alapját képező egyéb publikációk:

1. Székely Enikő, Várnagy Katalin: **Az oldalláncok szerepe a peptidek fémionkötő képességének finomszabályozásában**, XXIII. Tavasz Szél Tanulmánykötet, ISBN 9786155586729, 2020, 626-642.

F1. táblázat: A két hisztidint tartalmazó peptidek Cu(II)-komplexeinek UV-látható és CD spektrális paramétereit ($\lambda_{\max}$ (nm), ε ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$); ν = váll, sz = széles)

	[CuL]		[CuH ₂ L]		[CuH ₃ L]	
	UV	CD	UV	CD	UV	CD
Ac-HVH-NH₂ [118]	690 (35)	–	530 (126)	585 (–0,82) 480 (+1,15) 340 (–2,20)	530 (126)	560 (–0,60) 470 (+0,30) 335 (–0,90)
Ac-SarHAH-NH₂	680 (44)	621 (+0,07) 325 (–0,07) 234 (–2,29)	560 (118)	646 (+0,27) 550 (–0,59) 482 (+0,39) 337 (–2,34) 246 (+6,75) ν	525 (126)	635 (+0,91) 491 (–1,38) 362 (–0,14) 320 (+0,91) 294 (–0,14) 259 (+5,67) 241 (+2,83)
Ac-HAAH-NH₂ [120]	720 (38)	–	610 (87)	625 (–0,15) 535 (+0,63) 335 (–0,92)	510 (115)	615 (+1,06) 490 (–1,61) 355 (–0,17) 315 (+1,33)
Ac-HADH-NH₂	679 (40)	–	610 (87)	646 (+0,30) ν 483 (–0,22) 374 (+0,05) ν 307 (–0,25) 252 (+5,86)	516 (125)	628 (+0,92) 497 (–1,34) 320 (–0,88) 295 (–0,67) 260 (+6,76)
Ac-HDAH-NH₂	673 (63)	251 (+0,31) 229 (–1,62)	606 (131)	605 (–0,24) 521 (+0,43) 334 (–0,54) 243 (+5,06)	517 (158)	609 (+1,21) 487 (–1,74) 318 (+1,74) 288 (–0,26) 257 (+7,65)

F2. táblázat: A három és négy hisztidint tartalmazó peptidek Cu(II)-komplexeinek UV-látható és CD spektrális paramétereit ($\lambda_{\max}$ (nm), ϵ (dm³ mol⁻¹ cm⁻¹); ν = váll, sz = széles)

	[CuL]		[CuH ₂ L]		[CuH ₃ L]	
	UV	CD	UV	CD	UV	CD
Ac- HAHVH- NH₂ [156]	655 (69)	–	550 (131)	670 (+0,15) 560 (–0,79) 480 (+0,60) 340 (–2,88)	530 (121)	640 (+0,75) 500 (–0,81) 350 (–0,45)
Ac- HVHAH- NH₂ [156]	655 (65)	–	560 (123)	680 (+0,06) 560 (–0,61) 480 (+0,56) 340 (–2,12)	520 (116)	630 (+0,97) 490 (–1,38) 360 (–0,17) 320 (+0,95)
Ac- HAHDH- NH₂	640 (71)	255 (+0,43) ν 228 (–4,09)	576 (91)	614 (+0,51) 539 (–0,05) 489 (+0,14) 336 (–1,37) 246 (+5,82) ν	503 (116)	627 (+0,72) 492 (–0,69) 351 (–0,22) 315 (+0,25) 259 (+4,28) ν
Ac- HDHAH- NH₂	631 (73)	696 (+0,10) 498 (+0,03) 376 (+0,09) 265 (+0,94) 229 (–5,59)	560 (91)	609 (+0,74) 537 (+0,13) 493 (+0,24) 334 (–1,61) 247 (+7,20) ν	547 (103)	641 (+0,84) 499 (–0,92) 358 (+0,17) 313 (+0,80) 257 (+6,20) ν
Ac- HAAHVH- NH₂ [120]	640 (63)	–	530 (118)	580 (–0,78) 485 (+1,03) 345 (–2,74)	515 (115)	495 (–1,25) 360 (–0,17) 315 (+0,91)
Ac- HAAHGH- NH₂ [120]	626 (71)	591 (–0,29) 325 (+0,30) 245 (+2,80)	565 (117)	756 (–0,13) 586 (+0,48) 505 (+0,17) ν 349 (+1,57) 300 (–1,30) 263 (+0,54)	524 (116) 561 ν	605 (+1,31) 482 (–1,16) 321 (+1,86) 288 (–0,48) 253 (+5,93)
Ac- HGFHVH- NH₂	605 (57)	623 (–0,07) 529 (+0,05) 233 (–3,74)	529 (100)	676 (+0,07) 578 (–0,30) 484 (+0,44) 341 (–0,97) 248 (+4,06)	518 (120)	677 (+0,21) 586 (–0,33) 506 (+0,54) 309 (–1,72) 264 (+1,31) sz
Ac- HADHAH- NH₂	615 (85)	620 (–0,09) 517 (+0,09) 262 (+0,29) 231 (–9,07)	575 (108)	645 (+0,22) 553 (–0,32) 489 (+0,36) 337 (–2,13) 248 (+6,08) ν	532 (132)	636 (+1,04) 496 (–1,33) 319 (+1,13) 294 (–0,19) 258 (+7,50)
Ac-S3H4- NH₂ [148]	585 (68)	–	–	–	–	–
Ac- HDHAHDH -NH₂	605 (60)	664 (+0,05) 372 (+0,05) 255 (+1,04)	570 (72)	609 (+0,85) 533 (+0,17) 494 (+0,18) 334 (–1,19) 251 (+5,88) ν	538 (103)	623 (+1,00) 491 (–0,71) 347 (–0,26) 317 (+0,11) 256 (+6,15) 240 (+4,82)

F3. táblázat: A Cu(II)-Ac-HADH-NH₂ 1:5 arányú rendszerben képződő Cu(II)-komplexek elektrokémiai paraméterei

pH	Tartomány (V)	Pásztázási sebesség (mV/s)	E_{pc} (V)	E_{pa} (V)	ΔE (V)	I_{pc} (A)	I_{pa} (A)	I_{pa}/I_{pc}	$E_{1/2}$ (V)	E° (V)
5,41	600-(−400)	200	0,028	0,333	0,305	−1,768	1,574	0,890	0,181	0,390
	600-(−400)	100	0,052	0,297	0,245	−1,492	1,355	0,908	0,175	0,384
	600-(−400)	50	0,072	0,289	0,216	−1,182	0,995	0,842	0,180	0,389
	600-(−400)	25	0,088	0,285	0,196	−0,889	0,738	0,830	0,187	0,396
7,40	700-(−600)	200	−0,118	0,355	0,472	0,954	1,070	0,903	0,118	0,327
	700-(−600)	100	−0,045	0,335	0,380	−0,999	1,050	1,051	0,145	0,354
	700-(−600)	50	−0,037	0,286	0,324	−0,890	0,840	0,944	0,125	0,334
	700-(−600)	25	0,003	0,298	0,295	−0,789	0,645	0,818	0,151	0,360
8,35	800-(−800)	200	−0,260	0,356	0,616	−0,520	0,779	1,498	0,048	0,257
	800-(−800)	100	−0,223	0,288	0,511	−0,506	0,794	1,569	0,032	0,241
	800-(−800)	50	−0,102	0,304	0,406	−0,609	0,857	1,407	0,101	0,310
	800-(−800)	25	−0,054	0,268	0,322	−0,536	0,520	0,969	0,107	0,316

F4. táblázat: A Cu(II)-ligandum 1:5 arányú rendszerekben képződő Cu(II)-komplexek redoxi paraméterei

Ligandum	Komplex	pH	I_k (μA)	I_a (μA)	E_k (V)	E_a (V)	ΔE (V)	I_a/I_k	$E_{1/2}$ (V)	$E^{\circ'}$ (V)
Ac-SarHAH-NH ₂	[CuL]	4,80	-5,90	4,45	0,053	0,234	0,181	0,75	0,144	0,353
	[CuL ₂]	6,00	-3,51	3,28	-0,057	0,232	0,289	0,94	0,088	0,297
	[CuH ₂ L]	8,70	-0,36	0,39	-0,081	0,149	0,230	1,09	0,034	0,243
Ac-HADH-NH ₂	[CuL]	5,41	-1,49	1,36	0,052	0,297	0,245	0,91	0,175	0,384
	[CuH ₂ L]	8,35	-0,63	0,67	-0,123	0,276	0,399	1,07	0,077	0,286
Ac-HDAH-NH ₂	[CuL]	5,41	-2,05	1,31	0,079	0,271	0,192	0,64	0,175	0,384
	[CuH ₁ L]	6,90	-1,37	1,00	0,064	0,259	0,191	0,73	0,162	0,371
	[CuH ₂ L]	8,33	-0,30	0,38	-0,078	0,235	0,313	1,29	0,079	0,288
Ac-HAHDH-NH ₂	[CuL]	5,82	-1,23	1,01	-0,099	0,268	0,367	0,82	0,047	0,294
	[CuH ₁ L]	7,20	-1,22	1,17	-0,142	0,186	0,328	0,96	0,022	0,231
Ac-HADHAH-NH ₂	[CuHL]	4,69	-2,12	1,54	0,023	0,212	0,189	0,73	0,118	0,327
	[CuL]	6,51	-1,33	0,85	-0,090	0,199	0,289	0,64	0,055	0,264
	[CuH ₂ L]	8,40	-0,45	0,19	-0,108	0,151	0,259	0,42	0,022	0,231
Ac-HDHAHDH-NH ₂	[CuL]	8,67	-2,53	1,738	-0,390	0,209	0,599	0,69	-0,091	0,119

F5. táblázat: A két hisztidint tartalmazó peptidek Ni(II)-komplexeinek UV-látható és CD spektrális paramétereit ($\lambda_{\max}$ (nm), ε ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$); v = váll, sz = széles

	[NiL]		[NiH ₂ L]		[NiH ₃ L]	
	UV	CD	UV	CD	UV	CD
Ac-HGH-NHMe [157]	635 (12)	–	470 (166)	–	445 (208) 485(176) v	499 (+3,69) 422 (–2,85) 278 (+4,44))
Ac-SarHAH-NH₂	645(5) v 386 (10)	481 (–0,02) 420 (+0,02) 259 (+0,09) 233 (–0,93)	410(22) v	512 (+0,22) 407 (–0,75) 295 (–0,41) 260 (+4,21) 237 (+1,00)	429(150) v	539 (+0,14) 419 (–3,06) 261 (+12,87) 232 (–5,50)
Ac-HAAH-NH₂	631 (31) 449 (40) 372 (46)	231 (–1,44)	435 (165)	505 (+1,22) 419 (–2,68) 260 (+5,53) 244 (+3,08) 231 (+6,84)	433 (235)	505 (+0,93) 419 (–2,68) 261 (+6,94) 241 (+2,10) 233(+2,76) v
Ac-HADH-NH₂	641 (11) 384 (26)	230 (–1,66)	–	–	440 (120)	513 (+0,79) 420 (–2,46) 262 (+6,83) 241 (+2,55) 234 (+2,87)
Ac-HDAH-NH₂	647 (4) 388 (11)	230 (–1,45)	435(80) v	500 (+3,66) 420 (–1,10) 264 (+1,45) 221 (–8,11)	437(135) v	504 (+0,95) 420 (–3,05) 262 (+5,31) 243 (+2,38) 235 (+3,45)

F6. táblázat: A három és négy hisztidint tartalmazó peptidek Ni(II)-komplexeinek UV-látható és CD spektrális paraméterei ($\lambda_{\max}$ (nm), ϵ (dm³ mol⁻¹ cm⁻¹); v = váll

	[NiL]		[NiH ₂ L]		[NiH ₃ L]	
	UV	CD	UV	CD	UV	CD
Ac- HAHVH- NH₂ [157]	615 (25) 365 (61)	–	450 (121)	505 (+1,24) 425 (+0,40) 295 (–3,82) 255 (+11,5)	440 (196)	535 (+0,41) 425 (–2,19) 260 (+7,83)
Ac- HFHAH- NH₂ [163]	626 (6) 383 (15)	348 (–0,03) 254 (+0,08) v	447 (107)	510 (+0,50) 421 (–0,84) 258 (+3,33)	436(124) v	520 (+0,32) 418 (–2,10) 259 (+7,88)
Ac- HAHFH- NH₂ [163]	639 (26) 382 (55)	561 (–0,20) 487 (+0,07) 343 (–0,29) 249 (+1,88) v	479 (126)	530 (+0,77) 476 (+0,22) 442 (+0,46) 297 (–1,50) 231 (+1,24) v	456 (29)	540 (+0,54) 426 (–2,84) 261 (–7,67) 245 (+6,52) 239 (+8,70) v
Ac- HAHDH- NH₂	634 (10) 383 (27)	257 (+0,09) v 232 (–1,20) 215 (+2,65)	445 (89)	508 (+0,38) v 291 (–0,60) 257 (+2,88) 239 (+2,09) 221 (+4,41) 213 (–5,14)	442 (129)	507 (+0,38) 423 (–1,07) 259 (+3,31) 224 (+2,59) 216 (+6,63) v
Ac- HDHAH- NH₂	627 (8) 386 (20)	275 (+0,30) sz 233 (–1,70) 212 (+3,94)	439(77) v	520 (+0,17) 421 (+0,90) 262 (+6,80) 233 (–1,30)	434(132) v	546 (+0,10) 421 (–1,91) 263 (+9,66) 236 (+1,97) 219 (+9,52)
Ac- HAAHVH- NH₂ [120]	631 380	487 (–0,04) 418 (+0,02) 261 (+0,08) v 230 (–3,46)	441 v	526 (+0,19) 417 (–3,84) 308 (–0,06) 259 (+1,38) 233 (+0,15) 226(+2,82)	441 v	511 (+0,74) 419 (–1,66) 260 (+3,53) 244 (+2,42) 231 (+4,02)
Ac- HAAHGH- NH₂ [120]	630 (14) 380 (38)	513 (+0,05) 416 (–0,09) 259 (+0,20) v 234(–1,16) 216 (+9,08) v	–	–	440 (220) v	501 (+3,42) 421 (–4,29) 277 (5,78) 230 (13,35) v
Ac- HGFHVH- NH₂	618 (5) 379 (11)	233 (–1,60)	–	–	483 (46) 435 (52)	499 (–3,41) 421 (+5,05) 269 (–5,57) 245 (+0,79)
Ac- HADHAH- NH₂	630 (9) 380 (21)	231 (–2,93)	438(97) v	551 (+0,04) 421 (–0,73) v 300 (–0,33) 263 (+4,99) 235 (–0,94) 221 (+8,01)	433(147) v	509 (+1,15) 420 (–3,78) 260 (+14,23) 230 (–1,98) 221 (+10,73)
Ac- HDHAHDH -NH₂	620 (20) 380 (39)	482 (–0,06) 418 (+0,03) 261 (+0,09) v 228 (–6,48)	–	–	445(136) v	512 (+1,03) 426 (–2,27) 260 (+7,23) 250 (+6,98) 225(+11,94) v

