



1949

**Toxikus fémionok szelektív megkötésére alkalmas peptidek
tervezése, szintézise és fémkomplexeik vizsgálata**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Szunyog Györgyi

Témavezető: Dr. Várnagy Katalin, egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2019.

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai 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, 2019. 09.09.

a jelölt aláírása

*Tanúsítom, hogy **Szunyog Györgyi** doktorjelölt 2015 - 2018 év 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 javaslom.*

Debrecen, 2019. 09.09.

a témavezető aláírása

Toxikus fémionok szelektív megkötésére alkalmas peptidek tervezése, szintézise és fémkomplexeik vizsgálata

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

Írta: **Szunyog Györgyi** okleveles vegyész

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

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

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Nagy Noémi
tagok: Dr. Ósz Katalin
Dr. Lázár István

A doktori szigorlat időpontja: 2019. február 08.

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2019.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm *Dr. Fábíán István* volt és *Dr. Gáspár Attila* jelenlegi tanszékvezető egyetemi tanároknak, hogy lehetővé tették számomra a doktori munkám elvégzését a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken.

Őszinte hálámat fejezném ki témavezetőmnek, *Dr. Várnagy Katalin* egyetemi tanárnak, hogy egyetemi éveim alatt mellettem állt, és önzetlenül segített.

Külön köszönöm *Dr. Farkas Etelka* professzor emeritának, *Dr. Sóvágó Imre* professzor emeritusnak és *Dr. Buglyó Péter* egyetemi docensnek hasznos tanácsaikat, meglátásaikat.

Szeretném megköszönni *Dr. Kállay Csilla* egyetemi docensnek, hogy kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzá.

Hálás vagyok *Dr. Dávid Ágnesnek* és *Hőgyéné Dr. Grenács Ágnes Juditnak* támogató szavukért, illetve önzetlen szakmai segítségükért.

Köszönet illeti *Dr. Lihi Norbertet* az NMR mérések és kiértékelések során nyújtott segítségéért, illetve *Dr. Csire Gizellát* az MS mérésekért.

Szívből köszönöm a PhD szoba volt- és jelenlegi „lakóinak”, elsősorban *Ozsváth András, Kozsup Máté, Lukács Márton, Nagy Imre és Nagy Sándor* PhD hallgatóknak hogy a borús napokat is boldoggá varázsolták.

Szeretném megköszönni *Godó Attila* műszaki ügyintézőnek és *Fekete Orsolya* kutatási asszisztensnek az évek során nyújtott technikai segítséget.

Köszönettel tartozom *Nagyné Dombi Gizella* tanszéki irodavezetőnek a hivatalos ügyek intézése során nyújtott segítségét.

Köszönet illeti *Dr. Kurtán Tibor* egyetemi tanárt a cirkuláris dikroizmus mérésekben nyújtott segítségét, és *Dr. Nagy Zoltánt* az informatikai problémáim megoldásáért.

Hálásan köszönöm *Dr. Giuseppe Pappalardonak* (CNR Istituto di Biostrutture e Bioimmagini), hogy a hat hetes szicíliai tanulmányutam során segített elmélyíteni a szilárdfázisú peptidszintézis és a HPLC alapjait.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném kiemelni *szüleimet, testvéreimet és nagymamámat*, akik végig mellettem álltak és támogattak.

Hálásan köszönöm *Zsani, Edit, Bea és Enci* barátnőimnek mind szakmai, mind lelki támogatásukat is.

A kutatás az NKFIH K115480 számú pályázatának és a Campus Mundi Ösztöndíjnak a támogatásával, valamint a GINOP-2.3.-15-2016-00008 számú projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával készült.

Tartalomjegyzék

| | |
|--|----|
| Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke | 1 |
| 1. BEVEZETÉS..... | 3 |
| 2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK..... | 6 |
| 2.1. A fémionok biológiai szerepe..... | 6 |
| 2.1.1. Az ólom koordinációs kémiája és élettani hatása | 6 |
| 2.1.2. A kadmium koordinációs kémiája és élettani hatása | 9 |
| 2.1.3. A nikkel koordinációs kémiája és biológiai szerepe | 12 |
| 2.1.4. A cink koordinációs kémiája és biológiai szerepe..... | 13 |
| 2.2. Az aminosavak és peptidek koordinációs kémiája | 15 |
| 2.2.1. Aszparaginsav-tartalmú peptidek komplexképző sajátosságai | 18 |
| 2.2.2. Cisztein-tartalmú peptidek komplexképző sajátosságai..... | 20 |
| 2.2.3. Vegyes kötőhelyű peptidek koordinációs kémiája | 23 |
| 3. KÍSÉLTETI MÓDSZEREK ÉS ALKALMAZOTT TECHNIKÁK..... | 27 |
| 3.1. Felhasznált vegyszerek..... | 27 |
| 3.2. Szilárdfázisú peptidszintézis | 31 |
| 3.3. pH-potenciometria..... | 33 |
| 3.4. UV-látható spektrofotometria..... | 36 |
| 3.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia | 38 |
| 3.6. NMR spektroszkópia | 40 |
| 3.7. Tömegspektrometria (ESI-TOF-MS) | 41 |
| 4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK..... | 42 |
| 4.1. Aszparaginsavat tartalmazó peptidek ólom(II)komplexei..... | 42 |
| 4.2. N-terminálisan védett egy, illetve két ciszteint tartalmazó peptidek..... | 46 |
| 4.2.1. Az ólom(II)komplexek | 47 |
| 4.2.2. A kadmium(II)komplexek | 54 |
| 4.2.3. A nikkel(II)komplexek | 58 |
| 4.2.4. A cink(II)komplexek | 60 |
| 4.3. N-terminálisan nem védett, két ciszteint tartalmazó peptidek..... | 62 |
| 4.3.1. A CSSACS-NH ₂ peptid..... | 63 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.1.1. A ligandum Pb(II)-komplexei | 63 |
| 4.3.1.2. A ligandum Ni(II)-komplexei..... | 66 |
| 4.3.2. Az ACSSACS-NH ₂ peptid..... | 70 |
| 4.3.2.1. A ligandum Pb(II)-komplexei | 70 |
| 4.3.2.2. A ligandum Ni(II)-komplexei..... | 75 |
| 4.3.3. Az SSCSSACS-NH ₂ peptid..... | 84 |
| 4.3.3.1. A ligandum Pb(II)-komplexei | 84 |
| 4.3.3.2. A ligandum Cd(II)- és Zn(II)-komplexei..... | 87 |
| 4.3.3.3. A ligandum Ni(II)-komplexei..... | 90 |
| 5. ÖSSZEFOGLALÁS | 95 |
| 6. SUMMARY | 100 |
| 7. IRODALOMJEGYZÉK..... | 104 |
| 8. FÜGGELÉK..... | 114 |

Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke

| | |
|---------------------------------|---|
| A, Ala | alanin |
| C, Cys | cisztein |
| D, Asp | aszparaginsav |
| F, Phe | fenil-alanin |
| G, Gly | glicin |
| H, His | hisztidin |
| K, Lys | lizin |
| S, Ser | szerin |
| Ac-Cys | Acetil-cisztein |
| Ac-Pen | Acetil-penicillamin |
| Ac | acetil |
| ALAD | aminolevulinsav dehidratáz |
| ATP | adenozin-trifoszfát |
| BAL | 2,3-dimerkaptó-1-propanol (British anti-Lewisite) |
| CaM | kalmodulin |
| CD | cirkuláris dikroizmus |
| CH ₂ Cl ₂ | diklórmetán |
| COSY | korrelációs spektroszkópia (Correlation Spectroscopy) |
| DIPEA | <i>N,N</i> -diizopropil-etilamin |
| DMF | <i>N,N</i> -dimetil-formamid |
| DMPS | 2,3-dimerkaptó-1-propánszulfonsav |
| DMSA | dimerkaptó-szukcinát |
| DNS | dezoxiribonukleinsav |
| DODT | 2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol |
| DTPA | dietilén-triamin-pentaecetsav |
| EDTA | etilén-diamin-tetraecetsav |
| ESI | elektroporlasztásos ionizáció (Electrospray Ionization) |
| Et ₂ O | dietil-éter |
| Fmoc | 9-fluorenil-metoxi-karbonil |
| HOBt | <i>N</i> -hidroxi-benztriazol |
| HPLC | nagynyomású folyadékkromatográfia (High Pressure Liquid Chromatography) |
| HSQC | különböző atomokon detektált egykötéses csatolás (Heteronuclear Single Quantum Coherence) |
| MeCN | acetonitril |
| MS | tömegspektrometria (Mass Spectrometry) |
| mTG | mikrobiális transzglutamináz |

Toxikus fémionok szelektív megkötésére alkalmas peptidek tervezése, szintézise és fémkomplexeik vizsgálata

| | |
|-------------------|--|
| N ⁻ | amidnitrogén |
| NH ₂ | aminocsoport |
| NMP | N-metil-2-pirrolidon |
| NMR | mágneses rezonancia (Nuclear Magnetic Resonance) |
| O ^t BU | O-terc-butil |
| PD | poli- α,β -DL-aszparaginsav |
| PDC | poli- α,β -DL-aszpartil-L-cisztein |
| RP-HPLC | fordított fázisú HPLC (reversed phase HPLC) |
| S ⁻ | tiolátcsoport |
| SOD | szuperoxid dizmutáz |
| TBTU | 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium-tetrafluoroborát |
| TFA | trifluorecetsav |
| TFIIIA | transzkripció faktor III A |
| TG | transzglutamináz |
| TG2 | transzglutamináz 2 |
| TIS | triizopropil-szilán |
| TRI peptid | Ac-G (LKALEEK) ₄ G-CONH ₂ |
| TRIL12C | Ac-G LKALEEK LKACEEK (LKALEEK) ₂ G-CONH ₂ |
| TRIL16C | Ac-G (LKALEEK) ₂ CKALEEK LKALEEK G-CONH ₂ |
| Trt | tritol |
| TSP | trimetil-szilil-propánsav |
| UV-Vis | ultraibolya-látható |

1. BEVEZETÉS

A technológiai fejlődések ellenére, illetve egyes esetekben éppen a technológiai fejlődések miatt a mai napig igen gyakoriak a nehézfém-mérgezés okozta megbetegedések, rendellenességek. Ezek közül egyik leggyakoribb toxikusfém-mérgezés az ólom- valamint kadmiummérgezés, melyek különféle betegségek, szervi elváltozások okozói. Leggyakrabban az ázsiai országokban, azon belül is Kínában regisztráltak nehézfémmergezéses pácienseket, de a többi kontinensen, elsősorban Amerikában szintén jellemző az effajta mérgezés.

Az ólom(II)ion idegrendszeri, valamint fejlődési zavarok kialakulását eredményezi. Kiszorítva helyéről a kalcium(II)iont, beépül a csontokba, illetve fogakba, átjut a vér-agy gáton, ezáltal károsítva a központi idegrendszert, sőt bekerülhet az agyba, mellyel korai elbutulást okozhat. Enziminhibítorként gátolja a porfirin szintézisét, mely vérszegénységhez vezet. A kadmium(II)ion felelős az úgynevezett itai-itai kór kialakulásáért, mely a csontok törékenységéhez vezet, de lassú felezési ideje miatt veseelégtelenséget is előidéz.

Léteznek már kezelések az ólom(II)ion emberi szervezetből való eltávolítására, úgymint a 2,3-dimerkapto-1-propanol, a Ca-EDTA és különböző tiohidroxamátszármazékok, ám ezek toxikusfém szelektivitása még nem éri el a 100%-ot, így a terápia során a létfontosságú ionok egy részét is eltávolítják a toxikus fémionokkal együtt.

A *Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének Bioszervetlen Kutatócsoportjában* már régóta foglalkoznak az ólom(II)- és kadmium(II)ionok koordinációs kémiájának kutatásával. A vizsgálatok kiterjedtek az aminosavakra és különböző donorcsoportot tartalmazó, kis tagszámú peptidekre is, melyek alátámasztották, hogy ezen fémionok számára az elsődleges kötőhely a tiolátcsoport kén donoratomja, de nagy stabilitással kötődnek a karboxilátcsoport oxigén donoratomjához is. A létfontosságú fémionokkal, köztük például a cink(II)ionnal szemben viszont ezekkel a ligandumokkal sem érhető el nagymértékű szelektivitás. Ám az már a korábbi vizsgálatokból egyértelművé vált, hogy a donorcsoportok számának, minőségének és pozíciójának is nagy szerepe van a ligandumok

fémionkötő képességében. A peptidek változatos aminosavszekvenciájának köszönhetően lehetőség nyílik ezen donorcsoportok fémionért való versengésének vizsgálatára, mely során különféle koordinációs módú komplexek képződnek. A komplexek kialakulását nagymértékben befolyásolják a horgonycsoportok, melynek szerepét legtöbbször a szabad N-terminusú aminocsoport tölti be. Egyes fémionok, köztük a nikkel(II)ion képesek az amidnitrogének deprotonálódásának indukálására is, mely még változatosabbá teszi a kialakuló komplexek szerkezetét.

Így célul tűztük ki olyan kistagszámú, változatos donorcsoportokat tartalmazó peptidek ólom(II)-, kadmium(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionot tartalmazó rendszerek szisztematikus vizsgálatát, mely során bővítjük ismereteinket a toxikus, a létfontosságú, és a biológiailag „semleges” fémionok koordinációs kémijáról, ami hozzájárulhat olyan speciálisabb aminosavszekvenciájú peptidek tervezéséhez, amelyek nagy szelektivitással képesek az Pb(II)-, illetve a Cd(II)-ion megkötésére **(1. ábra)**.

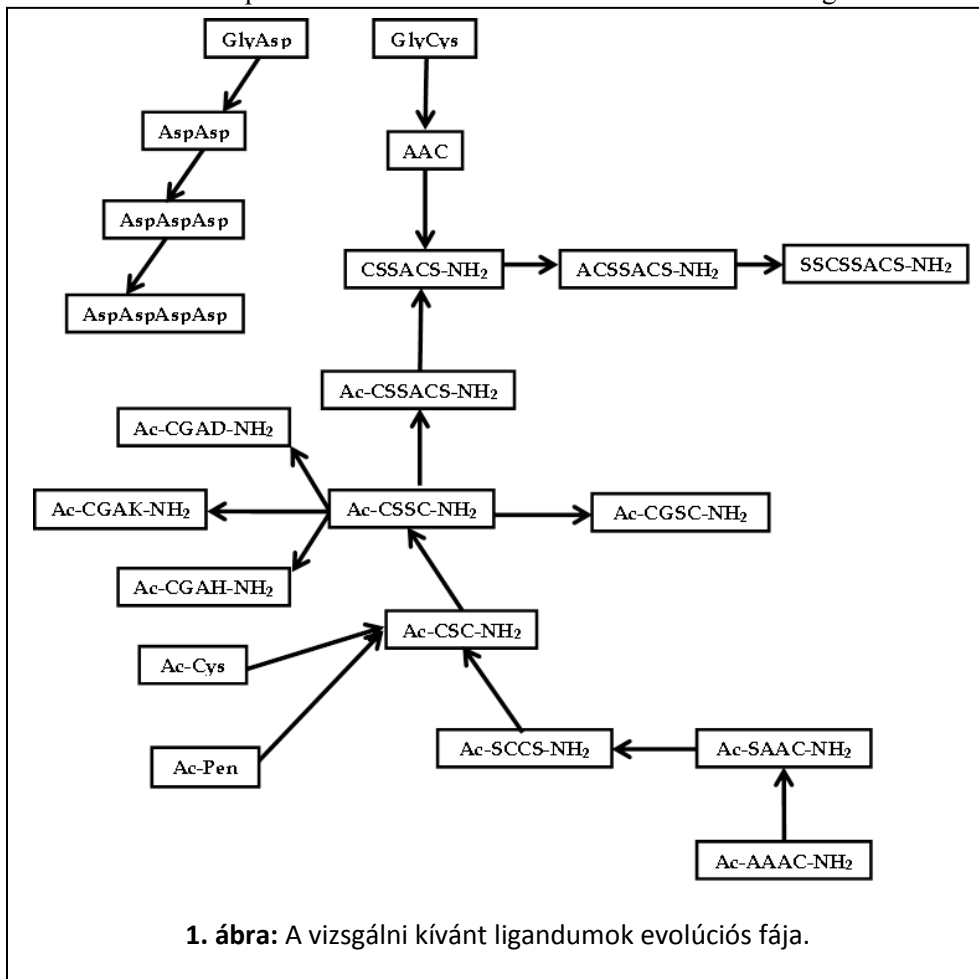
A peptidek tervezése során törekedtünk egyrészt arra, hogy vízzoldható ligandumokat állítsunk elő (szerin aminosavak beépítése révén), illetve arra, hogy a CD spektroszkópiás módszerrel is vizsgálni tudjuk a komplexeket (glicin helyett a királis aszparaginsav által).

Így célunk volt vizsgálni egyrészt azt, hogy az aszparaginsavak, vagyis a β -karboxilát csoportok számának növelése hogyan befolyásolja a keletkező ólom(II)-komplexek stabilitását.

Kerestük a választ arra is, hogy a kistagszámú, egy, illetve két ciszteint tartalmazó terminálisan védett peptidek mutatnak-e szelektivitást az ólom(II), illetve kadmium(II) megkötésében.

További célunk volt feltérképezni azt, hogy az N-terminálisan védett peptidek fémionmegkötő képességét hogyan befolyásolja a cisztein száma, illetve helyzete a szekvencián belül, valamint az egyéb donorcsoportok jelenléte/hiánya.

Célunk volt vizsgálni, hogy az N-terminálisan szabad, két ciszteint tartalmazó oligopeptidek ólom(II)- és nikkel(II)komplexei esetén hogyan befolyásolja a koordinációs kémiai viselkedést és a peptid fémionmegkötő képességét az N-terminális aminos csoport és az N-terminálishoz közeli cisztein távolsága.



Kutatásunk során pH-potenciometriás módszert alkalmazva meghatároztuk a fent felsorolt négy fémion többféle donorcsoportot tartalmazó peptidekkel képzett komplexeinek összetételét, és azok stabilitási állandóit, majd különböző spektroszkópai módszereket (UV-Vis spektrofotometria, CD- és ¹H NMR spektroszkópia) alkalmazva meghatároztuk a keletkező komplexek lehetséges szerkezeteit, megadva a koordinációs módokat.

2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

2.1. A fémionok biológiai szerepe

2.1.1. Az ólom koordinációs kémiája és élettani hatása

Az ólom [Xe] $4f^{14}5d^{10}6s^26p^2$ elektronszerkezetű, mely komplexeinek szerkezetére hatással van a 6s elektronok viselkedése azáltal, hogy részt vesznek-e a koordinációs kötés kialakításában. Abban az esetben, ha a $6s^2$ elektronok nem vesznek részt a koordinatív kötés kialakításában, p pálya jellegű nemkötő elektronként viselkednek (sztereokémiailag aktív magányos pár). Ezáltal torzult, tetraédes geometriájú komplexek alakulnak ki, ahol a nemkötő elektronpár a tetraéder csúcsán helyezkedik el. Ebben az esetben kisebb koordinációs számmal (<6), legtöbbször hard karakterű (O) donoratomokkal létesít kölcsönhatást az ólom(II)ion. Amennyiben a $6s^2$ elektronok is részt vesznek a kötés kialakításában, a 6s és 6p pályák keverednek (sp hibridizáció), szimmetrikus, oktaédes geometriájú komplexek képződnek. Ilyenkor a nagyobb koordinációs számú, softabb karakterű donoratomok, közülük is leginkább a kén donoratom kerül előtérbe. A tiolsoport tartalmú peptidok hidligandumként viselkedve gyakran alakítanak ki többmagvú komplexet az ólom(II)ionnal.

A koordinációs szám 2 és 12 között változhat, melyek közül a 2, 4 és 6 a leggyakoribb. 6-os koordinációs számnál nagyobb viszonylag ritkán fordul, melyek között az irodalomban nem találtunk kéntartalmú ligandumokkal kialakított Pb(II)-komplexeket [1]. Sok esetben találhatóak a fémion koordinációs szférájában be nem töltött helyek, melynek oka a sztereokémiailag aktív nemkötő elektronpárok, vagyis a fémion nemkötő elektronjai hibridorbitálokra helyezkednek el [2].

Szimmetrikus szerkezetű komplexeket csak nagyméretű ligandumokkal tud kialakítani az Pb(II)-ion. Ezen felül még nagy koordinációs számok esetén fordul elő a szimmetrikus szerkezet, amennyiben a térbeli taszítás képes ellensúlyozni a hibridizáció energianyereségét. Ha az adott ligandum nem rendelkezik kellő számú koordinációra képes donorcsoporttal, úgy a fémionhoz koordinálódhatnak más ligandumok, vagy esetleg oldószer molekulák is [1]. Feltehetőleg a változatos

koordinációs szerkezet és ezek könnyen bekövetkező geometriai torzulása eredményezheti azt, hogy az Pb(II) kölcsönhatásba tud lépni az élő szervezetekben megtalálható, létfontosságú Ca(II)- és Zn(II)-kötőhelyekkel, és képes a helyükről ezen fémionokat kiszorítani.

Köztes tulajdonságának köszönhetően mind a soft, mind a hard donoratomot tartalmazó ligandum koordinációja megvalósul [3]. Komplexeinek stabilitását összevetve a kétszeresen pozitív töltésű 3d átmenetifém-ionok komplexeinek stabilitásával, a ligandumtól függően az alábbi sorrendet lehet felállítani: Nitrogén donoratom-tartalmú ligandumok esetében a kötés erőssége a Fe(II)-vel közel azonos erősségű, de gyengébb, mint Cd(II)- és Zn(II)-komplexekben. Aminosavakkal alkotott komplexekben a kölcsönhatás a Co(II)-, a Zn(II)- és Cd(II)-komplexekéhez hasonló mértékű. A kén- és oxigéndonoratomokat tartalmazó ligandumokkal a réz(II)ionhoz képest hasonló erősségű a kölcsönhatás, a Zn(II)- és Cd(II)-ionokhoz képest pedig jóval erősebb.

Az ólom(II)ion kén donoratomhoz való nagyfokú affinitása miatt főként tiolcsoportot tartalmazó aminosavak vizsgálatával kapcsolatos irodalmak találhatók [4], [5].

Legegyszerűbb peptidek (például di- és triglicin) Pb(II)-rendszerének vizsgálatai alapján megállapították, hogy 4-es pH alatt a molekula a karboxilátcsoportján keresztül koordinálódik, ám 4-es pH felett az (NH₂, CO) koordináció valósul meg, és a karboxilátóxigén egy másik Pb(II)-ionhoz koordinálódhat [6], [7]. A kialakult komplexek stabilitása kicsi, a peptidvázbeli amidnitrogének deprotonálódása nem következik be. Néhány ligandum esetében - mint például az N-tozil-glicin és az N-tozil-β-alanin - előfordul az ólom(II)ion indukált amidnitrogén deprotonálódás. Így ezek a molekulák savas közegben a karboxilátcsoporton keresztül koordinálódnak az ólom(II)ionhoz, majd semleges közegben megtörténik az amidnitrogén deprotonálódása, és kialakul a kelátgyűrű a (COO⁻,N⁻) koordinációjával.

Az ólom(II)komplexeiről általánosan elmondható, hogy ligandumcsere sebességük kiemelkedő, az általam vizsgált négy fémion közül a legnagyobb.

Az ólom(II)ionra nagyfokú hidrolízishajlam jellemző. Ennek következtében az Pb(II)-ion tartalmú rendszerekben a keletkező törzskomplexek mellett megjelennek

a többmagvú hidroxidokomplexek is. Az ólom(II)vegyületek hidrolízise vezet a következő, polimerizálódott szilárd csapadék képződéséhez:

$[\text{Pb}_6\text{O}(\text{OH})_6]^{4+}[\text{ClO}_4]^{-}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, melyet PbO vizes perklórsavban való oldásával, majd annak lúgosításával kapjuk.

Magát az ólmot már több mint 5000 éve ismeri és hasznosítja az emberiség [8]. Kezdetben különböző szerszámokat és konyhai eszközöket készítettek belőle, de a vízvezetékrendszert is ólomcsövekből építették ki. Később vegyületei is igen elterjedté váltak. Az ólomtartalmú festékek, és az üzemanyagoknál használt kopogásgátlók (ólom-tetraetil) [9] felhasználásával nagymértékben megnövekedett az ólom környezeti terhelése. Az ólom-tetraetil egy illékony fémorganikus vegyület, mely a kipufogógázok apró szemcseméretű szálló poraival könnyen a levegőbe jut, ahonnan akár közvetve a táplálékláncból és közvetlenül belélegezve is bekerülhet az emberi szervezetbe. A szervezetbe került fémion csak kis százaléka szívódik fel, a többi kiürül. A szálló por mérete miatt legkönnyebben a tüdőből a tüdőhólyagocskák sejtfalán keresztül kerül be a véráramba. A véráramból a vörösvértestekhez kötődve jut el a csontokig, ahol a kalcium(II)iont kiszorítva tárolódik. A szervezetbe került ólom több mint 90 százaléka inert formában a csontokban található. Az ólom kiürülésének felezési ideje igen hosszú, nagyjából 20 év, mely miatt egy folyamatos, viszonylag magas szintű ólomkoncentráció áll fenn a szervezetben. Nemcsak a csontokban található meg az ólom, hanem például a vérben, azon belül is leginkább (kb. 95%-ban) a vörösvértestben [10]. Funkciójuk miatt legfőképpen a vesében és a májban figyelték meg a fémion dúsulását. Az ólom számos rendellenesség okozója [11], [12], negatív hatása van a hem bioszintézisére, a mitokondrium energia metabolizmusára, a májfunkcióra. Képes helyettesíteni a létfontosságú fémionokat (mint például a Zn(II)-, Ni(II)- és Ca(II)-ionokat) a metalloenzimekben és a metalloproteinekben, melynek következtében drasztikus változás következik be azok biokémiai funkcióiban. Erre példa a kalcium helyettesítése sok létfontosságú folyamatban, mint például a Ca/Na ATP pumpában és a Ca-kötő fehérjékben (pl. kalmodulinban), továbbá gátolja a Ca(II)-ionok felvételét a mitokondriumban. Növeli a cink kiválasztást, a cinkhiány fokozza az ólom felvételét, az ólom pedig helyettesíti a cinket egyes cink-ujj fehérjékben (pl. TFIIIA) [13] is.

Karcinogén hatást fejt ki, illetve fiziológiás elváltozásokat okoz a csontvelőben, az idegrendszerben [14] a vese és a máj működésében [15] is, de felelős még a magas vérnyomásért [16] és a vérszegénységért is. A gyermekeknél a tünetek fokozottabban jelentkeznek. Az ő esetükben az idegrendszeri és viselkedési rendellenességek mellett [17] a fejlődésbeli lemaradás is megjelenik.

Mára már nagymértékben csökkent az ólom felhasználása. Nagyrészt kivonták az üzemanyaggyártásból, sok helyen megtörtént a vízvezetékek cseréje is, de a nagymértékű környezeti terheltség és a lassú felezési idő miatt még most is jelentős mennyiségben van jelen mind a levegőben szálló porként, mind a táplálékláncba beépülve.

Az ólom(II)ion megkötésére és eltávolítására már léteznek kezelések. Olyan komplexképző ágenseket alkalmaznak, melyek képesek nagy stabilitással megkötni a szervezetbe került ólom(II)iont, ezáltal a szervezetből kiürülve eltávolítható. Ehhez különböző specifikus kelátképzőket (pl. BAL, Ca-EDTA, DMSA, DMPS, DTPA) [18] használnak, és egyre elterjedtebbé válik a kevert módszerek alkalmazása, vagyis a fent említett valamely két kelátképző együttes alkalmazása, vagy az egyik kelátképző, és a Monensin nevű antibiotikum egyszerre történő adagolása [19], [20]. Ezek a ligandumok viszonylag nagy szelektivitással kötik meg az ólmot, de a kémiai hasonlósága miatt a Zn(II)ion hasonló stabilitású komplexet képez a ligandumokkal, ezáltal az ólom(II)ionnal együtt távozik a szervezetből.

2.1.2. A kadmium koordinációs kémiája és élettani hatása

A kadmiumot 1817-ben fedezte fel Stromeyer, egy cinktartalmú ásványban. Mennyisége a földkéregben 0,16 ppm. A Cd(II)-ion b osztályú, azaz soft tulajdonságú Lewis-savnak tekinthető. Néhány Cd(II)-vegyület színes, ami a ligandumokról a könnyen polarizálható fémekre irányuló töltésátvitellel magyarázható. Egyes vegyületei reaktívak, sem levegővel, sem vízzel szemben nem stabilisak. Ilyen például a CdH₂, mely még 0 °C alatt is gyorsan bomlik.

A Cd(II) koordinációs kémiája változatos. Halogenidekkel (kivéve a fluort) [MX₃]⁻ és [MX₄]⁻ összetételű komplexek képződnek, melyek vizes oldatban is kellően stabilisak. O-donoratot tartalmazó ligandummal általában tetraéderes komplexet

alakít ki. *N*-donoratomot tartalmazó ligandumokkal, például ammóniával és aminokkal nagy stabilitású komplexek keletkeznek. Cianidvegyületekkel oldószertől függően változatos molekulák alakulnak ki. Ilyen például a $\text{Cd}(\text{CN})_2 \cdot \text{G}$ -klatrát kristály (G= CCl_4 , CMeCl_3 , $\text{CMe}_4 \dots$) [21] és (G= DMF , DMSO) [22]. Tiocianát komplexben, a $[\text{Cd}(\text{SCN})_4]^{2-}$ -ionban a kénatom koordinálódik, eltérően a $[\text{Zn}(\text{NCS})_4]^{2-}$ -iontól, ahol a nitrogén donoratom koordinálódik. A tiocianát lehet hidligandum is, például a $[\text{Cd}\{\text{S}=\text{C}(\text{NHCH}_2)_2\}(\text{SCN})_2]$ vegyületben, ahol az oktaéderesen koordinált Cd(II) lineáris láncai vannak jelen.

Elektronszerkezete $5s^2 4d^{10}$. A d^{10} elektronkonfiguráció esetén a kristálytér-stabilizációs energia nulla, emiatt a vegyületeinek térszerkezete a Cd(II)-ion méretétől, polarizáló erejétől és a ligandum térszerkezetétől függ. Leggyakoribb oxidációs száma a +2, komplexeiben koordinációs száma 2 és 6 között változik.

Emiatt peptidekkel alkotott komplexeinek szerkezete változatos, lehet lineáris, tetraéderes és oktaéderes geometriájú is. Soft karakterű fémionként leginkább a kén donoratomot tartalmazó ciszteinnel lép kölcsönhatásba nagy stabilitású komplexeket képezve, de a nitrogén donoratomot tartalmazó láncvégi aminocsoporttal, valamint a hisztidin imidazol nitrogénjével és az oxigén donoratomot tartalmazó karboxilátcsoporttal (pl. aszparaginsav és glutaminsav karboxilátcsoportjai) is képezhet kisebb stabilitású komplexet, viszont az amidnitrogén deprotonálódást a fémion általában nem tudja indukálni [23]. Az oldalláncban lévő donoratomok nemcsak a kialakuló komplexek termodinamikai stabilitását befolyásolják, hanem a keletkező komplexek koordinációs geometriáját is. A komplexek stabilitása növekszik a ligandumban lévő koordinációra képes donorcsoportok számának növekedésével.

N-terminálisan szabad peptidek esetében, ha a peptid nem tartalmaz oldalláncában koordinálódó donorcsoportot, a terminális amino- és karboxilátcsoportok részvételével egy öttagú kelátgyűrű alakul ki.

A kadmium sem az emberi, sem a növényi és állati szervezetekben nem tölt be semmilyen alapvető biológiai funkciót. Kimutatták viszont, hogy egyes növények a szöveteikben képesek úgy felhalmozni a kadmiumot, hogy annak semmilyen látható

nyoma nem jelentkezik. Ezen kadmium-toleranciával rendelkező növények közé tartozik a rizs, melynek elfogyasztása Japánban, a második világháború után megjelent itai-itai kór [24] kialakulásáért volt felelős. Toyama város lakossága a közelben lévő, kadmiummal erősen szennyezett Jinzu folyó vizét használta a rizsföldek öntözéséhez, mely által a fém bekerült az emberi anyagcsere folyamatokba, fokozva a csontok törékenységét, ami elsősorban idősebb nőknél jelentkezett. Ennek oka, hogy a kadmium hasonló kémiai tulajdonságokkal rendelkezik, mint a kalcium, így képes kiszorítani azt a csontokból. A szervezetből való kiürülésének felezési ideje több mint tíz év, ezáltal megterheli a vesét is [25], így a kadmiumot a toxikus elemek közé soroljuk.

A kadmium kémiai tulajdonságai nemcsak a kalciumhoz, hanem a cinkhez is hasonlítanak. Ennek következtében képes kiszorítani a cink(II)iont a fehérjékből, melynek koordinációs szférájában sok kén donatorom található. Erre példa a cink-ujj fehérje, ahol a kadmium a cinket kiszorítva képes megváltoztatni a transzkripciós folyamatokat. A kadmium szállítása elsősorban az albuminnal és transferrinnel történik, az idegsejtekbe történő bejutása a feszültségfüggő kalcium csatornákon keresztül zajlik. A kadmium szervezetben való mérgeztetéséért a metallothionein és a glutation a felelős [26]. A thioneinek kis molekulatömegű (6000-7000 Da) fehérjék, melyek szerepe a cink és réz megkötése, valamint tárolása. Szerepei közé tartozik a toxikus fémionok megkötésén túl a reaktív oxigén specieszek semlegesítése, illetve a sejtek redoxiállapotának szabályozása is. Nemcsak a cink(II)ionok, hanem a kadmium(II)ionok is képesek indukálni a thionenin termelődést azáltal, hogy aktiválják a cink- és kadmiumérzékeny transzkripciós faktort.

2.1.3. A nikkell koordinációs kémiája és biológiai szerepe

A nikkell a 22. leggyakoribb elem a földkéregben. Egyes mikroorganizmusok és baktériumok számára létfontosságú, ám az emberi szervezetben betöltött szerepét még nem tisztázták. Oxidációs állapotai komplexeiben +1-től +4-ig létezhetnek, ezek közül a leggyakoribb a nagy stabilitású +2-es oxidációs állapot, melyben a nikkell d^8 elektronszerkezetű. A komplexek szerkezeteinek geometriai különbségét a nikkell koordinációs számának változása okozza. Míg a 6-os koordinációs szám a paramágneses oktaéderes geometriát, addig a 4-es koordinációs szám paramágneses, tetraéderes, illetve diamágneses, síknégyzetes geometriát eredményez. A szerkezet változásával az oldatok színe is változik. Az oktaéderes és tetraéderes geometriájú komplexek oldatainak színe kék, illetve zöld színű, a síknégyzetes szerkezetű komplexekre pedig a sárga, valamint vörös szín jellemző. Vegyületei nagy részére jellemző a toxicitás. Ilyenek például a nikkell-oxidok és nikkell-szulfidok, melyek rákkeltő hatásúak, illetve a könnyen felszívódó, erősen mérgező nikkell-tetrakarbonil.

A nikkell biológiai szerepét csak néhány évvel ezelőtt, 1975-ben kezdték felismerni, amikor jelenlétét felfedezték az ureáz enzimben [27], melyet már 1926-ban sikerült kikristályosítani [28]. Ez az enzim felelős a növényekben a karbamid ammóniává történő hidrolízisének katalizálásáért, és a folyamat során semlegesíti a savas pH-t. Az ureáz enzim működéséhez a nikkellen kívül szén-dioxid, GTP (guanozin-trifoszfát) és számos egyéb fehérje szükséges [29].

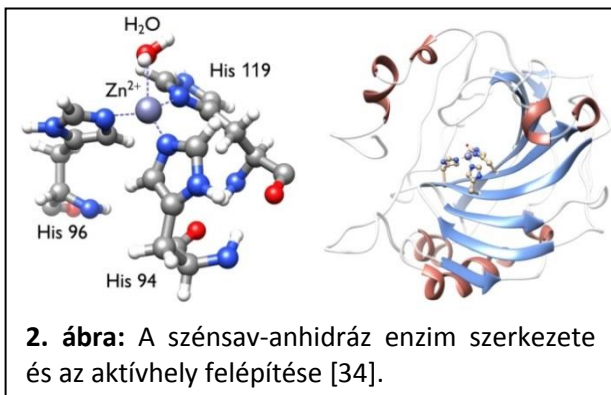
Emellett a nikkell megtalálható még a mikroorganizmusokban a nikkell-vas-hidrogenázban is. Szerkezetileg a vas-kén fehérjékhez hasonlít, ám az aktív szerkezeti egység egy cisztein-S hidakkal összekapcsolt Ni-Fe centrumot tartalmaz, és a kénatomot szelén is helyettesítheti. Szerepe a molekuláris hidrogén vízzé történő oxidációja reverzibilis folyamatokban [30]. Szintén mikroorganizmusokban található a Nikkell-SOD enzim, melyben a nikkell(II)ionokat cisztein-S donoratomok koordinálják, és működése során Ni(II) - Ni(III) átmenet valósul meg [31]. Emellett a nikkell még több másik enzim alkotója is. Ilyen például a CO-dehidrogenáz, melynek feladata a szén-monoxid szén-dioxiddá történő oxidációja, valamint a

metil-koenzim M reductáz, ami a széndioxid metánná történő átalakulását katalizálja.

A nikkelt közvetve részt vesz a *Helicobacter pylori* által okozott krónikus gyomorfertőzés, és egyéb betegségek (köztük az akut vagy krónikus gyomorhurut és a karcinóma) kialakulásában is [32]. A baktériumnak a gyomorban lévő extrém savas pH-jú (1,5-3,5) körülmények túléléséhez szükséges a nikkelt homeosztázisa. A *Helicobacter pylori* baktériumban a nikkelt megkötésében fontos szerepet játszik a HspA (Heat Shock Protein A) peptid [33]. Ezen peptid modellvegyületénél (Ac-ACCHDHKKH) megállapították, hogy nikkelt-hez a két cisztein tiolátcsoportja, és a közöttük lévő amidnitrogén koordinált.

2.1.4. A cink koordinációs kémiája és biológiai szerepe

A cink a földkéreg 24. leggyakoribb eleme, az emberi szervezetben a 2. leggyakoribb nyomelem. Átlagos mennyisége egy 70 kg-os felnőtt emberi szervezetben 2 és 4 gramm közé tehető, melynek nagy része az izomszövetekben (~57 %) és a csontokban (~29 %) található, de alkotója a bőrnek, a májnak, az agynak és vérplazmának is. Az egyik legkevésbé toxikus nyomelem, melynek számos hiánybetegsége ismert, mint például a növekedési zavar (törpenövés), látászavar, bőrelváltozás, hajhullás és sebesedés. Komplexeiben a cink oxidációs



száma +2-es. $3d^{10}$ elektronszerkezetének következtében a komplexek színtelenek és diamágnesesek, közepes termodinamikai stabilitással rendelkeznek, kinetikailag labilisak és nem vesznek részt

redoxireakciókban. A cink koordinációs száma lehet 4 és 6, ezáltal tetraéderez és oktaéderez komplexeket kialakítva. Számos cinktartalmú fehérje ismert, melyek nélkülözhetetlenek az élőlényekben lejátszódó folyamatok működéséhez. Közülük a

legismertebb a **2. ábrán** látható, 1940-ben elsőként felfedezett szénsav-anhidráz enzim, mely a víz reverzibilis reakcióját katalizálja szén-dioxiddal [35]. Az enzim aktív helyén található egy cinkion, ami három hisztidil oldalláncot (His94, His96 és His119) koordinál azok imidazolnitrogén atomjain keresztül [36]. A negyedik koordinációs helyet egy vízmolekula foglalja el, mely központi szerepet játszik a reakció katalízisében.

Az 1990-es évek elejére már több mint 100 cinktartalmú enzimet azonosítottak. Ilyen enzim a karboxipeptidáz-A, ami a szénsavanhidrázhoz hasonlóan egy cink(II)iont tartalmaz, torzult tetraédes geometriát kialakítva. Ez a szerkezet két hisztidin (His69 és His196), valamint egy glutamát (Glu72) és egy vízmolekula koordinációjával jön létre [37], [38]. Az inaktív formáját a hasnyálmirigy termeli, és csak az emésztőcsatornában található tripszin hatására alakul aktív karboxipeptidázzá, vagyis egy fehérjebontó enzimmé, mely a peptidok C-terminális peptidkötésének hidrolízisét katalizálja.

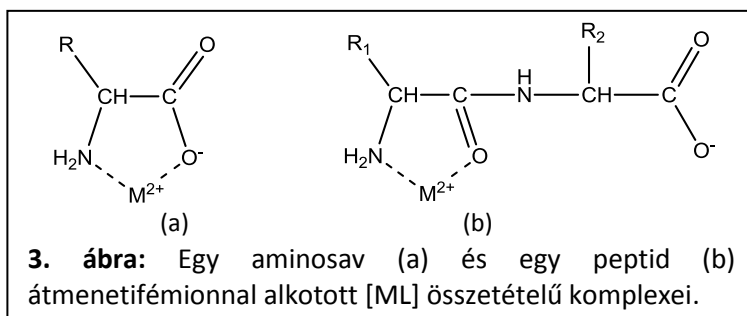
A cink hiánybetegségének megfigyelése kapcsán kerültek előtérbe az úgynevezett cink-ujj fehérjék, melyek kb. harminc aminosavból álló szerkezeti egységekből, vagyis doménekből épülnek fel, ahol a fémiont két cisztein és két hisztidin koordinálja. Ezeknek a fehérjéknek számos szerkezeti formájuk lehet, jelenleg több mint tíz osztályba sorolhatjuk őket, változatos szerkezettel, fémkötő móddal, funkcióval és reaktivitással [39]. Egyik ilyen cink-ujj fehérje a 9 doménből felépülő TFIIIA protein, mely DNS-hez kötő és aktiváló fehérje, transzkripciófaktor.

A cink tárolása metallotionein formában főleg a májban és a vesében történik. A metallotionein kis molekulatömegű fehérje, mely kb. 10-11 % fémion-tartalommal rendelkezik. Három típusa ismeretes, az I. típus, ami az emlősökben található, 60-62 aminosavból épül fel, és ebben átlagosan minden harmadik aminosav cisztein [40]. A cink köztes tulajdonságának köszönhetően kialakíthat kölcsönhatást S-, N- és O-donoratómot tartalmazó peptidokkal [41] is, jellemzően az N-terminális aminocsoporton, a cisztein tiolátcsoportján és a hisztidin imidazol-nitrogénjén keresztül [42], [43].

2.2. Az aminosavak és peptidek koordinációs kémiaja

A biológiai folyamatok modellezése végett az elmúlt évtizedek során számos kutatócsoport foglalkozott már az aminosavak, illetve peptidek különböző fémionokkal való kölcsönhatásának vizsgálatával, melynek köszönhetően nagyszámú publikációt találhatunk az irodalomban [44]-[50]. Ezeknek köszönhetően szembevetünk, hogy a képződő komplexek szerkezetét és stabilitását is nagymértékben befolyásolja mind a donorcsoport minősége, mind a fémion sajátosságai.

Az aminosavak vizes oldatban ikerionos formában vannak jelen, és egy proton felvételére ($pK_{\text{karboxil}} \sim 2-2,5$), illetve leadására ($pK_{\text{amino}} \sim 9-10$) képesek. Átmenetifémionokhoz való koordinációra az α -amino és a karboxilátcsoportokon keresztül képes igen stabilis, öttagú kelátgyűrűt kialakítva (**3.a. ábra**).



A **3. ábra** a legegyszerűbb aminosavak és peptidek aminosavszerű ($\text{NH}_2, \text{COO}^-$) és peptidszerű (NH_2, CO) koordinációs módját mutatja be. Amennyiben az aminosav, illetve a peptid R csoportjai koordinációra képes donorcsoportot jelentenek, abban az esetben a képződő komplexek szerkezete, és azok stabilitása jelentősen eltérhet ettől. A peptidekben található amidkötés révén két donoratomb, a karboniloxigén és az amidnitrogén is részt vehet a fémion megkötésében, melynek köszönhetően változatosabb összetételű, nagyobb stabilitású komplexek keletkezhetnek.

Mivel a peptidcsoport ($-\text{NH}-\text{CO}-$) igen gyenge savként, illetve bázisként viselkedik, ezért a karbonilcsoport oxigénje csak extrém savas körülmények között képes proton felvételre ($\lg K_{\text{karbonil}} \sim 1$) [51], illetve az NH-csoport csak extrém lúgos körülmények között képes leadni a protonját. Ezekre csak kevés példa található az irodalomban (pl. GlyTyr $pK_{\text{amid}} = 15,2$) [52]. Elmondható, hogy általában a peptidcsoport

deprotonálódási folyamatai a vizsgált pH-tartományban ($1 < \text{pH} < 14$) csak (bizonyos) fémionok jelenlétében számottevőek. Az úgynevezett fémion indukált amidnitrogén deprotonálódás elősegítésére képes például a Ni(II)-, Cu(II)-, és Pd(II)-fémion [53] is, de néhány peptidnél kimutattak ilyen folyamatot Zn(II)- és Co(II)-ion esetén is. Ehhez szükséges, hogy legyen a peptidláncban az amidnitrogénnel kelátképző helyzetben egy úgynevezett horgonycsoport is (pl. a láncvégi aminocsoport, a cisztein tiolát csoportja [54], [55] vagy a hisztidin imidazol nitrogénatomja [56]), mely a fémionhoz koordinálódva elősegíti az amidnitrogén deprotonálódását és a stabil kelátgyűrű kialakulását. Ebben az esetben jelentősen csökken a deprotonálódás folyamatára jellemző pK érték a szabad ligandumra jellemző pK értékhez képest.

Az aminosavakhoz viszonyítva a dipeptidek esetében csökken az aminocsoport bázicitása ($pK_{\text{amino}} \sim 7-8$) [55] és a karboxilcsoport savassága ($pK_{\text{karboxil}} \sim 2,9-3$) [57], mivel ez a két donorcsoport egymástól már távolabb helyezkedik el, mely nagymértékben befolyásolja a keletkező komplexek szerkezetét.

Ezt bizonyítja az a tény is, hogy további, bár sokkal kisebb változások figyelhetők meg a láncvégi csoportok bázicitásában a donorcsoportok közötti távolság növelésével [42].

Az aminosavakkal ellentétben a peptidekben a nagyobb távolság miatt az amino- és karboxilátcsoporthoz nincs kelátképző helyzetben, így a kialakult komplex szerkezetében csak az egyik donorcsoport vehet részt. Az elsődleges kötőhely szerepét egyértelműen a fémion karaktere határozza meg.

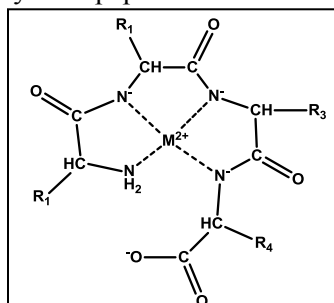
Oldalláncban donoratomot nem tartalmazó, szabad terminussal rendelkező peptidek esetében leggyakrabban az N-terminális aminocsoport a meghatározó donorcsoport, mely a hozzá legközelebb eső karbonilcsoport oxigén donoratomjával [ML] összetételű komplexet kialakítva képez kelátgyűrűt. A pH növelésével megtörténik az amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja, kialakítva az $[\text{MH}_1\text{L}]$ komplexet. A dipeptidek ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{COO}^-$) koordinációs módú (5,5) tagú csatolt kelátgyűrűt képeznek. Nagyobb tagszámú peptidek esetében lehetőség van további amidnitrogének koordinációjára. $[\text{MH}_2\text{L}]$ összetételű komplex esetében már (5,5,5) tagú csatolt kelátgyűrű alakul ki egy amino- és két deprotonálódott amidnitrogén

részvételével. A fémion negyedik koordinációs helyét tripeptidek esetében a karboxilátcsoport, háromnál nagyobb tagszámú peptidek esetében pedig a karboniloxigén foglalja el. Tetrapeptidek esetében további amidnitrogén deprotonálódásával $[MH_3L]$ összetételű (NH_2, N^-, N^-, N^-) koordinációs módú (5,5,5) tagú csatolt kelátkomplex alakul ki (4. ábra).

Amennyiben az aminosavak oldalláncai fémionmegkötésre képes donorcsoportot tartalmaznak, az növeli a fémion-ligandum

kölcsönhatás sokszínűségét. Az aminosavak oldalláncainak minősége szintén befolyásolhatja a koordinációs módokat. Az aminosavakat csoportosíthatjuk nem-, gyengén-, illetve erősen koordinálódó donoratomot tartalmazó aminosavakra. A nem-koordinálódó oldalláncot tartalmazó aminosavak közé tartozik például az alanin, a valin, a leucin, az izoleucin és a fenilalanin is, melyek nem vesznek részt a komplexképződésben, de befolyásuk lehet a kialakult komplexek stabilitására [58]. Gyengén koordinálódó donorcsoportok például a karboxilát- (aszparaginsav és glutaminsav) [59], az alkoholos hidroxil- (szerin és treonin) [60], a fenolos hidroxil- (tirozin) [61]-[63], a tioéter- (metionin) [64]-[66] és az aminocsoport (lizin és arginin) [67]-[70], melyek csak gyenge kölcsönhatást létesítenek a fémionnal a komplexképződés során [71].

Erősen koordinálódó donorcsoportok közé tartozik például a tiolcsoport (cisztein) [72]-[75] és az imidazolcsoport (hisztidin) [76]-[80]. Ez utóbbi aminosavak jelentősen befolyásolják a komplexképződés folyamatát, illetve nagyobb stabilitású komplexek kialakítására képesek, mint a gyengén koordinálódó donorcsoportot tartalmazó aminosavak [81].



4. ábra: Egy tetrapeptid $[MH_3L]$ komplexének szerkezete (M = pl. Ni(II), Cu(II)).

2.2.1. Aszparaginsav-tartalmú peptidek komplexképző sajátosságai

Az aszparaginsav az oldalláncban gyengén koordinálódó karboxilát donorcsoportot tartalmazza, mely nem viselkedik horgonycsoportként, de a képződő komplexek stabilitását növelhetjük a peptidláncban lévő aszparaginsavak számának növelésével. Ám nemcsak az aszparaginsavak száma, hanem a peptidláncban lévő helyzete is befolyásolhatja a komplexek stabilitását, mely jól szemléltethető a GlyAsp és az AspGly ligandumok példájával [82].

Amennyiben az aszparaginsav N-terminális helyzetű, úgy az β -alaninszerű koordinációt alakít ki az Pb(II)-, Cd(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-fémionokkal ($\text{NH}_2, \beta\text{-COO}^-$) kötésmóddal [ML], illetve [ML₂] komplexeket képezve.

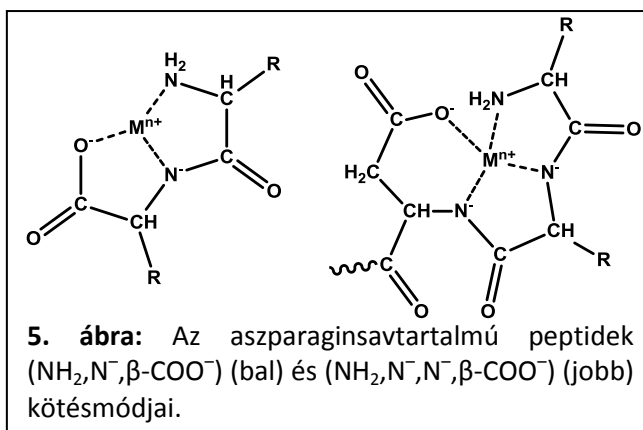
Az így kialakuló hattagú kelátgyűrű sokkal stabilisabb, mint a szintén karboxilát donorcsoporttal rendelkező glutaminsav ($\text{NH}_2, \beta\text{-COO}^-$) kötésmódú komplexei, ahol a hasonló koordinációs mód eredményeképpen már egy kevésbé stabilis, héttagú kelát képződik.

Egyes fémionok, pl. a Ni(II), a Zn(II) és a Cu(II) lúgos oldatban képes elősegíteni az amidnitrogének deprotonálódását, dipeptidszerű koordinációt kialakítva.

A karboxilátcsoporthoz való koordinációja elősegíti a szomszédos N-terminus felőli amidnitrogén(ek) deprotonálódását és koordinációját, és gátolja vagy nagyobb pH-tartomány felé tolja az aszparaginsavtól C-terminális irányba található amidnitrogénét [83].

Ha az aszparaginsav az N-terminálistól számított második pozícióban helyezkedik

el, akkor az ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \beta\text{-COO}^-$) donorcsoportok koordinálják a fémiont, ha pedig a harmadik pozícióban található, akkor ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \beta\text{-COO}^-$) kötésmóddal alakul ki a komplex, melyek szerkezetét az 5. ábra



szemlélteti. Ilyen kötésmód kialakítására képes többek között a nikkell(II)- és a réz(II)ion is.

Az irodalomban számos adatot találhatunk aszparaginsav-tartalmú ligandumok Ni(II)-, Zn(II)-, Cd(II)-ionokkal alkotott komplexeiről, de csak kevés vizsgálat történt Pb(II)-ionnal. Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy gyenge kölcsönhatás jellemző az Pb(II)-aszparaginsav rendszerekre.

Az Pb(II)-ion aszparaginsavval savas pH-n (pH~4,0 körül) PbHL komplexet képez. A pH növelésével háromfogú koordinációval PbL összetételű, (NH₂,COO⁻,COO⁻) koordinációs módú komplex képződik. ~8,0-as pH körül pedig kialakul az PbH₁L vegyes hidroxidkomplex, melynek képződése során csapadék válik le.

A többi fémionhoz hasonlóan a karboxilát-O részvétele stabilitásnövelő hatással van a kialakult, kelátgyűrűs-szerkezetű komplexekre [84], [85], ám az Pb(II)-ion indukált amidnitrogén deprotonálódását csak kevés vegyületben tudták kimutatni (pl. N-tozil- és N-szulfonil-aminosavakban, N-benzoilglicinben [86], [83]).

A legegyszerűbb aszparaginsav tartalmú peptidek, a GlyAsp és az AspGly Pb(II)-ionnal eltérő koordinációs móddal képeznek komplexet. [PbH₂L]²⁺ komplexet csak az AspGly ligandum képez Pb(II)-ionnal, melyben a két disszociábilis proton közül az egyik az oldallánc karboxilcsoportjának protonja. A GlyAsp dipeptid esetében, melyben az oldallánc karboxilátcsoportja kelátképző helyzetben van a C-terminális karboxilátcsoporttal, [PbH₂L]²⁺ komplex nem képződik. Az [PbHL]⁺ komplex mindkét ligandum esetében kialakul, ahol a horgonycsoport a C-terminális karboxilátcsoport. Az [PbL] komplex az N-terminális ammóniumcsoport deprotonálódásával, az amino-N és a karbonil-O donorcsoportok által stabil öttagú kelátgyűrűt kialakítva jön létre [82].

Az oldalláncbeli karboxilátcsoport stabilitásnövelő hatását csak az N-terminális karboxilátcsoporttal rendelkező peptidben mutatták ki (AspGly), melyben az aminocsoport és a karboxilátcsoport stabil, 6-tagú kelátgyűrűt képez (1. táblázat) [82].

Amidnitrogén deprotonálódást egyik peptid esetében sem mutattak ki se pH-potenciometriás, se ¹H NMR vizsgálatok során.

1. táblázat: A különböző dipeptidek PbL komplexeinek pK-IgK értékei (T = 298 K, I = 0,20 M KNO₃).

| | lgβ(PbL) | pK-IgK |
|---------------|-----------------|---------------|
| GlyGly | 3,30 | 4,83 |
| GlyGlu | 3,45 | 4,85 |
| GluVal | 3,35 | 4,52 |
| GlyAsp | 3,70 | 4,68 |
| AspGly | 4,01 | 3,95 |

Az AspAsp, az AspAspAsp és az AspAspAspAsp peptidok Zn(II)- és Cd(II)-ionnal alkotott MHL komplexeiben a fémiont minden esetben a karboxilátcsoport koordinálja, az aminocsoport pedig protonált. Ez ellentétben áll ugyanezen peptidok Cu(II)-, Ni(II)- és Pd(II)-ionnal alkotott rendszereivel, ahol az N-terminális aminocsoport a fő fémionkötő hely. Az ML komplex stabilitása a Cd(II)- és Cu(II)-ion esetében az aszparaginsavak számának növekedésével nő, Ni(II)-ion esetében csökken, mivel a β -karboxilát csoport kötődésének stabilizáló szerepe kisebb a ligandum mérete miatt.

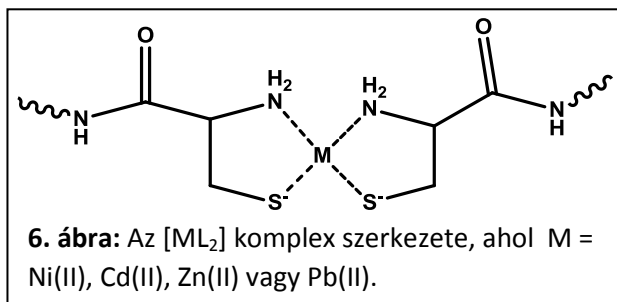
Biszkomplexek kialakulása nem jellemző ezekre a rendszerekre, ám kimutatták a Cd(II)-AspAla, a Zn(II)-GlyAspGly, valamint a Zn(II)-AspAspAsp és a Ni(II)-AspAsp, illetve Ni(II)-AspGlu rendszerek vizsgálata során is [87], [57].

2.2.2. Ciszteín-tartalmú peptidok komplexképző sajátosságai

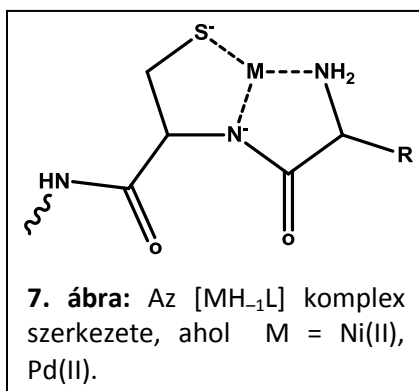
A ciszteín tiolcsoportja az aszparaginsav karboxilcsoportjával ellentétben az erősen koordinálódó donorcsoportok közé tartozik, ám a kötés erősségét a fémion karaktere nagymértékben befolyásolja. Mind a soft jellegű fémionokkal (pl. Cd(II)-, Pd(II)- és Pt(II)-ionok), mind a köztes fémionokkal (pl. Pb(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-ionok) erős, kovalens jellegű kötést alakít ki a tiolátcsoport, míg a hard jellegű fémionokkal gyenge kölcsönhatást létesít. A képződő komplexek összetétele és szerkezete igen változatos lehet, melyet több tényező is befolyásol.

Egyes fémionok esetében (pl. Pb(II)-, Ni(II)-, Cd(II)- és Zn(II)-ion) a ciszteín-tartalmú N-terminálison nem védett peptidok aminocsoportja akár horgonycsoportként is viselkedhet.

Abban az esetben, ha az N-terminális aminosav cisztein (pl. CysGly [73], [82]), kialakul az öttagú kelátgyűrű az $(\text{NH}_2, \text{S}^-)$ donorcsoportok részvételével. Ennek köszönhetően képződhetnek biszkomplexek is, melynek következtében az amidnitrogén deprotonálódása gátolt (6. ábra). Ekvimoláris fémion-ligandum arány esetében megjelenhetnek többmagvú komplexek, melyek kén-hidas szerkezetűek.



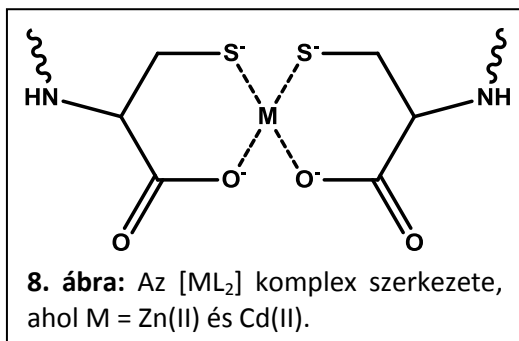
A második helyen ciszteint tartalmazó peptidek donoratombjai már a fémion függvényében változhatnak.



Bizonyos fémionok, például a Ni(II) - és Pd(II) -ionok képesek indukálni az amidnitrogén deprotonálódását, ezáltal az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}^-)$ donorcsoportokkal csatolt kelátrendszerű komplexeket alakítanak ki (7. ábra), ahol a tiolátcsoport horgonycsoportként viselkedik, mely szintén hozzájárul az amidnitrogén deprotonálódásához. A tridentát

koordináció miatt a koordinációs szféra nem telített, így lehetőség van egy másik ligandum belépésére is, így ligandumfelesleg esetén biszkomplexek, 1:1 fémion-ligandum aránynál pedig tioláthidas dimer komplexek képződnek.

Harmadik helyen ciszteint tartalmazó peptidek esetében (pl. AlaAlaCys [55] és GlyGlyCys [73]) szintén elősegíthetik a Ni(II) - és Pd(II) -ionok az amidnitrogének kooperatív deprotonálódását. Ekkor az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S}^-)$ csoportok koordinációjával igen nagy stabilitású $[\text{MH}_{-2}\text{L}]$ összetételű komplex alakul ki, mely által a fémionok koordinációs szférája telített, vagyis ebben az esetben többmagvú komplexek kialakulására nincs lehetőség.



Amennyiben a cisztein nem a C-terminálison található, úgy egyes fémionok, pl. a cink(II)- és kadmium(II)ion esetében kialakulhat a stabil (S^-,COO^-) hattagú kelát, valamint lehetőség van a biszkomplexe megjelenésére (8.

ábra), ám ebben az esetben tiolátsoporton koordinálódó fémion nem képes az amidnitrogének deprotonálódását elősegíteni.

Az ólom(II) és cisztein kölcsönhatását viszonylag kevés irodalom tárgyalja. A 2.1.2. fejezetben már említett, cisztein-tartalmú fehérjéket, a tioneineket már széles körben vizsgáltak különböző fémionokkal (pl. $Cd(II)$, $Hg(II)$, $Cu(I)$, $Cu(II)$, $Ag(I)$, $Au(I)$, $Bi(III)$, $As(III)$, $Co(II)$, $Fe(II)$, $Pb(II)$, $Pt(II)$ és $Tc(IV)$) [88], [89]. A tioneinek ciszteinben gazdag fehérjék (kb. 30% az összes aminosavhoz viszonyítva), emiatt nagy affinitással képesek megkötni a toxikus fémionokat, köztük az $Pb(II)$ - és $Cd(II)$ -iont is [90], [91]. A tionein ólom méregtelenítésében való szerepére több irodalmi adatot is találhatunk [92], [93], ám ezeket nehéz rendszerezni [94]. A publikációk többsége spektroszkópai adatokon alapszik, melyekben rámutatnak az ólom és a tionein kölcsönhatására [95], [96].

Ólom(II)ion jelenléte mellett legtöbbször a peptidek amidnitrogénjeinek deprotonálódása még lúgos közegben sem játszódik le, ám ezáltal kialakulhatnak a vegyes hidroxidokomplexe. Az egy ciszteint tartalmazó ligandumok esetében a leggyakrabban az (NH_2,S^-) koordináció a jellemző. Amennyiben a peptidben a második helyen lévő ciszteinhez közel található még egy cisztein, kialakulhat a (S^-,S^-) koordináció is [97].

Ezen kívül vizsgálták még az $Pb(II)$ -ion $Ca(II)$ -ion helyettesítő képességét a kalmodulinban, illetve a $Zn(II)$ -ion helyettesítő képességét az 5-aminolevulinsav dehidratázban, és bebizonyították, hogy ezeknek a folyamatoknak egészségkárosító szerepük van [98]. Két jelentős tanulmány, eltérő spektroszkópai módszereket használva bemutatta az ólom(II)ion nagyfokú affinitását a kalmodulinhoz (CaM)

[99], [100], ami egy létfontosságú jelzőfehérje, és több mint 100 biológiai folyamatban vesz részt.

2.2.3. Vegyes kötőhelyű peptidek koordinációs kémiája

Ciszteint és aszparaginsavat is tartalmazó ligandumok és Pb(II)-ion kölcsönhatását S. Peng és munkatársai vizsgálták [101]. Az ólommérgezések kezelésére addig használt kelátterápia nem tűnt hatékonynak, ugyanis eltávolította a szervezet számára fontos fémionokat is (pl. kalcium(II) és vas(II)) [102], így új kelátorokat fejlesztettek ki [103], [104]. Az L-metioninnal összekapcsolt poli- α,β -DL-aszparaginsav (PD) képes hatékonyabban eltávolítani az Pb(II)-iont az emberi szervezetből [105]. Továbbá azt is megfigyelték, hogy az aminosavval módosított PD különböző nanoszerkezeteket és fokozottabb biológiai aktivitást mutat [106]. Ezért párosították az L-ciszteint a PD-vel, kifejlesztve egy új kelátort. Ez az új kelátor a poli- α,β -DL-aszpartil-L-cisztein (PDC), mely képes nanorészecskét kialakítani és szelektíven eltávolítani az Pb(II)-iont. Az egereken végzett vizsgálatokból megállapították, hogy a combcsontban felhalmozódott Pb(II) 30 százalékát, a májban és a lépben felhalmozódott Pb(II) 50 százalékát képes eltávolítani a PDC. Azoknak az egereknek a vizeletében és ürülékében jelentősen kevesebb mennyiségű ólmot mutattak ki, melyek a kontrollcsoportba (normál sóoldat) tartoztak, illetve azon esetekben is, amikor a terápia során PDC helyett DL-penicillammal kezelték az alanyokat. Ez szintén azt támasztja alá, hogy a cisztein és aszparaginsav tartalmú PDC hatékonyabban távolítja el az egerek szervezetéből az Pb(II)-iont, mint a penicillamin, míg a létfontosságú fémionokat csak minimális mennyiségben távolítja el.

A ciszteint és hisztidint is tartalmazó rendszerek vizsgálatából általánosan megállapítható, hogy bár mindkét aminosav erősen koordinálódó donorcsoporttal rendelkezik, az ólom köztes tulajdonságának köszönhetően a cisztein kén donoratómjával sokkal erősebb kölcsönhatást alakít ki, mint a hisztidin imidazolnitrogénjével. Összehasonlítva a legegyszerűbb hisztidin és cisztein tartalmú peptidek (HisGly és CysGly) ólom(II)komplexeit, egyértelműen látszik,

hogy a CysGly nagyobb stabilitású komplexeket képez az Pb(II)-ionnal [82]. Ezért habár a hisztidint tartalmazó ligandumok átmenetifém komplexeinek vizsgálatával már számos kutatócsoport foglalkozott [107], [108], ezek között igen kevés eredményt találunk az ólom(II)ion komplexeiről. Emiatt kevés adat áll rendelkezésünkre olyan ligandumokról is, melyek cisztein és hisztidin aminosavakat is tartalmaznak.

A legegyszerűbb ciszteint és hisztidint is tartalmazó ligandumok a CysHis és HisCys peptidek, mely különböző formáival (H-CysHis-OH, Ac-CysHis-OH, H-CysHis-NH₂, Ac-CysHis-OEt, illetve ezek HisCys párjaival) különböző fémionokkal már végeztek szisztematikus vizsgálatokat [109]. A Zn(II)-ionnal végzett kutatások során megállapították, hogy amennyiben az N-terminálison a ligandum nem védett, úgy az aminocsoport horgonycsoportként viselkedik és (NH₂,S⁻), illetve (NH₂,N_{im}) a koordinációs mód. Az N-terminálison védett, a C-terminálison COO⁻ csoportot tartalmazó ligandumok esetében a koordinációs mód a (S⁻,COO⁻), valamint (N_{im}, COO⁻), ám ekkor sokkal kisebb stabilitású komplexek keletkeznek.

Szintén ciszteint és hisztidint tartalmazó ligandumok (például: Ac-HAAC-NH₂, AHAAC-NH₂, AAHAAC-NH₂, és ciklo-HisCys) vizsgálataiból kiderült, hogy a nikkell(II)ion számára az N-terminálisan nem védett peptidek esetén az (NH₂,N_{im}) donorcsoport, az N-terminálisan védett ligandumok számára pedig a (S⁻, N_{im}) donorcsoport az elsődleges kötőhely. Továbbá megállapították, hogy a cink(II)- és kadmium(II)ion az (N_{im}, S⁻) kötésmóddal alakít ki makrokelátot a védett, nemvédett és ciklikus ligandum esetében is [42], [110]. Ám az AHAAC-NH₂ ligandum [NiL]⁺ és [ZnL]⁺ komplexében az (NH₂,N_{im}) donorcsoportok mellett a cisztein tiolát csoportja is részt vesz a koordinációban, vagyis a ligandum (NH₂,N_{im},S⁻) koordinációs móddal kötődik a fémionhoz.

Szintén ciszteint, hisztidint és aszparaginsavat tartalmaz az új tervezésű védett Ac-SCHGDQGSDCSI-NH₂ dodekapepid, melynek Cd(II)-iont tartalmazó rendszerét széleskörűen vizsgálták. A kapott eredményeből arra következtettek, hogy a koordinációs mód igen változatos lehet a keletkező komplexek összetételétől függően. Az UV-spektrofotometriás és ¹H NMR vizsgálatok is alátámasztják a CdS₄ összetételű komplex kialakulását. Az NMR vizsgálatok eredményei alapján nem

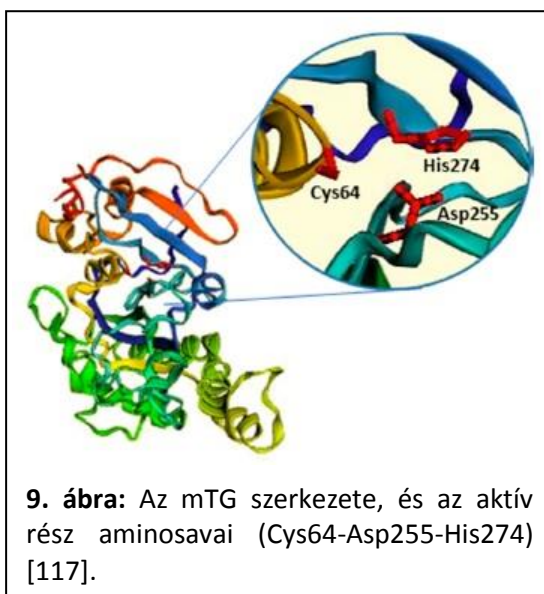
zárható ki a torzult tetraédes geometriájú CdS_2NX összetételű komplex is, melyben a fémionhoz két cisztein tiolátcsoportja, a hisztidin imidazolnitrogénje és (vagy a vízből, vagy az aszparaginsavból származó) oxigén donoratom koordinálódik, egy hurkot alakítva ki [111].

Mint látható, pl. cink(II)- és nikkell(II)ionnal számos kutatás folyt cisztein és hisztidin donorcsoportot is tartalmazó ligandumokkal, ám az ólom(II)ionnal való kölcsönhatás vizsgálatára vonatkozóan nem találtam irodalmi adatot, melynek oka a hisztidin és ólom(II) közötti gyenge kölcsönhatás.

Ciszteint, hisztidint és aszparaginsavat is tartalmazó vegyület a transzglutamináz (TG) enzim, melyet Heinrich Waelsch fedezett fel 1957-ben [112]. A TG-t leginkább a fehérjék közötti intra- és intermolekuláris kovalens kötések kialakulásának katalizátoraként ismerjük [113]. A TG-család egyik tagja a transzglutamináz 2 (TG2), mely 687 aminosavból épül fel. Számos különböző sejttípusban megtalálható, és a többi aktív taghoz hasonlóan kalciumfüggő transzamidáló aktivitással rendelkezik [114]. Szerkezete négy globuláris doménből épül fel. A fő domén (140-460 aminosavak) tartalmazza a katalitikus triádot, vagyis a cisztein-hisztidin-aszparaginsavat (Cys277-His335-Asp358) [115] és két triptofánt (Trp241 és Trp332), melynek szerepe a köztitermékek stabilizálása [116]. A TG2 enzimben összesen hat Ca(II) -ion kötőhely van, melyből öt az enzim allosztérikus aktiválásáért felelős. Vagyis ha ezeket az aktiválásért felelős Ca(II) -ionokat helyettesíti más fémion (pl. Pb(II) vagy Cd(II)), az enzim elveszti aktivitását.

Az eukarióta TG-től eltérően a mikrobiális transzglutamináz

(mTG) enzim aktiválása független a Ca(II) -iontól. Az mTG, melyet 1989-ben izoláltak Ando és munkatársai, egy 331 aminosavból álló, kb. 38 kDa tömegű



monomer fehérje. A szekvencia-vizsgálatokból nyert adatok, és a kristályszerkezet azt mutatja, hogy az mTG katalitikus aktiválása a Cys64-től függ, mely a **9. ábrán** látható katalitikus triád része (Cys64-Asp255-His274). Bár az enzim aktiválása nem függ a Ca(II)-iontól, mégis érzékeny a többi kationnal szemben (pl. az Pb(II)-, Li(II)- Zn(II)- és Cu(II)-ion) [118], melyek hatására módosulhat, illetve megszűnhet az enzim funkciója.

3. KÍSÉLTETI MÓDSZEREK ÉS ALKALMAZOTT TECHNIKÁK

3.1. Felhasznált vegyszerek

A szilárd fázisú peptidszintézis során felhasznált összes vegyszer, illetve oldószer kereskedelmi forgalomból származik, melyet további tisztítás nélkül alkalmaztunk. Minden Fmoc (9-fluorenil-metoxi-karbonil) védőcsoportot tartalmazó aminosavszármazékot (Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(Trt)-OH), a Rink Amide AM gyantát, és a 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium-tetrafluoroborátot (TBTU) a svájci Novabiochem forgalmazza. A 2,2'-(etiléndioxi)-dietántiól (DODT), a dietil-étert (Et₂O), az *N*-hidroxibenzotriazol hidrátot (HOBt·H₂O), az *N*-metil-2-pirrolidont (NMP), az analitikai tisztaságú *N,N*-dimetil-formamidot (DMF), a trifluoecetsavat (TFA) és a triizopropil-szilánt (TIS) a Sigma Aldrich Co. forgalmazza. A 2-metil-bután-2-olt és az *N,N*-diizopropil-etilamint (DIPEA) a Merck Kft., az ecetsavanhidridet pedig a VWR International szolgáltatta. A piperidin, a diklórmetán (CH₂Cl₂) és a 96%-os ecetsav vegyületeket a Molar Chemicals Kft.-től szereztük be.

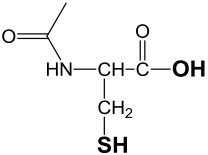
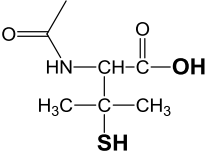
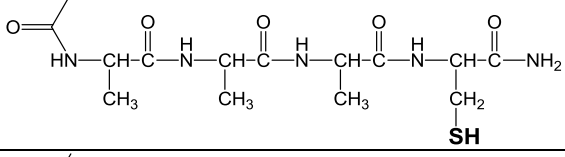
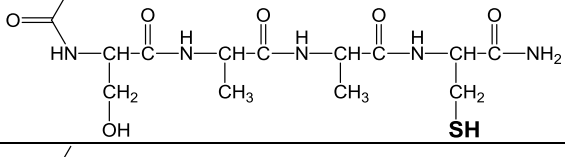
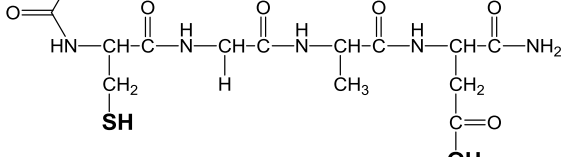
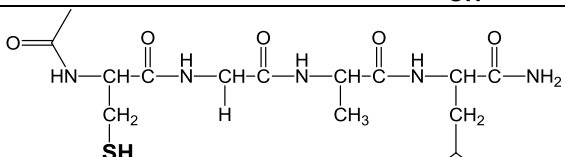
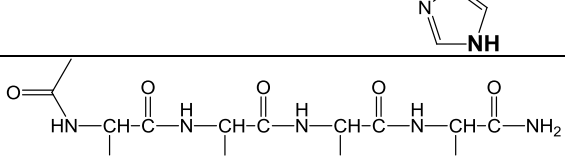
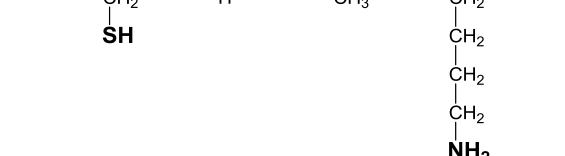
A tisztaságellenőrzés végett alkalmazott HPLC vizsgálatokhoz szükséges vegyszerek (HPLC-tisztaságú acetonitril (MeCN) és trifluoecetsav (TFA)) a Sigma Aldrich Co. termékei.

A pH-potenciometriás vizsgálatokat CO₂ mentes közegben végeztük. A titrálószer argon alatt tárolt kb. 0,2 mol/dm³-es, pontosan ismert koncentrációjú KOH-oldat volt. Az oldategyensúlyi és spektroszkópiás vizsgálatok során használt Pb(NO₃)₂-, Cd(NO₃)₂-, CdSO₄-, Ni(NO₃)₂-, NiCl₂-, NiSO₄-, Zn(NO₃)₂-, ZnCl₂-törzsoldatok a Reanal Finomvegyszergyár Zrt. a.l.t. minőségű vegyszereiből készültek háromszor ioncserélt vízben történő oldással. Az ólom-trifluoecetát oldat (Pb(CF₃COO)₂) elkészítéséhez ólom-nitrátot reagáltattunk ammónia-oldattal, melynek következtében ólom-hidroxid (Pb(OH)₂) csapadék vált le. A csapadékot dekantálás és vizes mosás után trifluoecetsavban (TFA) oldottuk. Az oldat savtartalmának pontos koncentrációját pH-potenciometriás titrálással, Gran módszert alkalmazva

határoztuk meg [119]. A pontos fémion-koncentrációkat oxinát formában, gravimetriás módszerrel határozták meg.

A kutatáshoz használt vegyületek közül az **AspAsp**, az **AspAspAsp**, az **AspAspAspAsp**, a **GlyCys** és az **Acetil-cisztein** vegyületeket a svájci Bachem cégtől, a **GlyAsp** peptidet és az **Acetil-penicillamint** a Fluka cégtől szereztük be. Az **Ac-CGAK-NH₂** és az **Ac-CGAH-NH₂** peptideket a SynPeptide Co. Ltd gyártotta. Az **Ac-SCCS-NH₂** peptidet Lukács Márton, az **Ac-CGAD-NH₂** peptidet Pálinkás Dóra szintetizálta a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportban. Az **AAC-OH** peptid Franciaországban készült egy korábbi irodalmi módszer szerint [55]. A fennmaradó kilenc peptidet (**Ac-AAAC-NH₂**, az **Ac-SAAC-NH₂**, az **Ac-CSC-NH₂**, az **Ac-CGSC-NH₂**, az **Ac-CSSC-NH₂**, az **Ac-CSSACS-NH₂**, a **CSSACS-NH₂**, az **ACSSACS-NH₂** és az **SSCSSACS-NH₂**) szilárd fázisú peptidszintetizátorral állítottam elő a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport keretein belül. Az összes ligandum szerkezeti képlete a **10. ábrán** látható.

| | |
|--|-------------------|
| $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-\text{H}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{H} \qquad \qquad \qquad \text{CH}_2 \\ \qquad \qquad \qquad \\ \qquad \qquad \qquad \text{C}=\text{O} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \qquad \qquad \qquad \text{OH} \end{array}$ | GlyAsp |
| $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-\text{H}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{CH}_2 \qquad \qquad \text{CH}_2 \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{C}=\text{O} \qquad \qquad \text{C}=\text{O} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{OH} \qquad \qquad \text{OH} \end{array}$ | AspAsp |
| $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-\text{H}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-\text{H}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \\ \text{CH}_2 \qquad \qquad \text{CH}_2 \qquad \qquad \text{CH}_2 \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \\ \text{C}=\text{O} \qquad \qquad \text{C}=\text{O} \qquad \qquad \text{C}=\text{O} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \\ \text{OH} \qquad \qquad \text{OH} \qquad \qquad \text{OH} \end{array}$ | AspAspAsp |
| $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-\text{H}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-\text{H}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-\text{H}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \\ \text{CH}_2 \qquad \qquad \text{CH}_2 \qquad \qquad \text{CH}_2 \qquad \qquad \text{CH}_2 \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \\ \text{C}=\text{O} \qquad \qquad \text{C}=\text{O} \qquad \qquad \text{C}=\text{O} \qquad \qquad \text{C}=\text{O} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \\ \text{OH} \qquad \qquad \text{OH} \qquad \qquad \text{OH} \qquad \qquad \text{OH} \end{array}$ | AspAsp- AspAsp |

| | |
|---|-------------------------|
|  | Ac-Cys |
|  | Ac-Pen |
|  | Ac-AAAC-NH ₂ |
|  | Ac-SAAC-NH ₂ |
|  | Ac-CGAD-NH ₂ |
|  | Ac-CGAH-NH ₂ |
|  | Ac-CGAK-NH ₂ |
|  | Ac-SCCS-NH ₂ |

3.2. Szilárdfázisú peptidszintézis

A szilárdfázisú peptidszintézis atyja a Nobel-díjas R. B. Merrifield [120]. Ennek a módszernek az előnye, hogy automatizálható, ezáltal kevésbé időigényes, mint a manuális módszer. A felhasznált ligandumokat a Liberty (CEM, Matthews, NC) szilárd fázisú peptidszintetizáló készülékkel állítottuk elő. Ennek lényege, hogy az aminosavakat egy oldhatatlan szilárd hordozóra, úgynevezett gyantára kapcsoljuk fel kémiai kötéssel. Attól függően, hogy a C-terminálisán -OH végű vagy -NH₂ csoporttal védett peptidet szeretnénk előállítani, úgy kell megválasztani a gyantát is. Esetemben az összes előállított peptid C-terminálisan védett volt, savamid csoportot tartalmazott, így a Rink Amid AM típusú gyantát használtuk a szintetizáláshoz, mely Fmoc védőcsoporttal van ellátva [121]. A peptidlánc szintetizálásához a gyantára először a C-terminálisán lévő aminosavat kapcsoltuk. Első lépésként eltávolítottuk a gyantán lévő védőcsoportot, hogy a szilárd hordozón szabad aminocsoportot kapjunk. Ez 0,1 mol/dm³ koncentrációjú HOBt · H₂O és 20 V/V% piperidint tartalmazó DMF oldat hozzáadásával 180 másodpercen keresztül 80 °C-on, 30 W teljesítményű mikrohullámmal történt. Következő lépésben négyszeres feleslegben hozzáadtuk a C-terminális felőli első aminosavat (koncentráció: 0,2 mol/dm³, oldószer: DMF, funkciós csoportok aktiválása: TBTU/HOBt/DIPEA elegye). Az aminosav gyantához, illetve a következő aminosavnak az előző aminosavhoz való kapcsolásához szintén 30 W teljesítményű mikrohullámot használt a készülék 300 másodpercen keresztül 80 °C-on (cisztein esetében 50 °C-on). A hasítási, majd kapcsolási lépéseket ismételve kaptuk meg a végén az előre megadott aminosav-szekvenciának megfelelően a kívánt terméket. Azokban az esetekben, amikor N-terminálisan védett peptideket állítottunk elő, az utolsó aminosav Fmoc védőcsoportjának eltávolítása után 5 V/V% DIPEA- és 6 V/V% ecetsavanhidrid-tartalmú oldat hozzáadásával értük el az acilcsoport kialakítását.

A szintézis végeztével a DMF eltávolítása miatt mostuk a gyantát és a rajta lévő peptidet először diklórmetánnal, ezután 96%-os ecetsavval, 2-metil-2-butanollal és végül dietil-éterrel. A peptid gyantáról történő hasítása és a védőcsoportok eltávolítása 94% TFA, 2,5% TIS, 2,5% H₂O és 1% DODT tartalmú elegyben történt

szobahőmérsékleten. Végül a peptid kicsapásához a hasítóelegyet hideg dietil-éterbe csepegtettük. Az így kapott fehér vagy piszkosfehér csapadékot vákuumszűrő segítségével szűrtük ki, szárítást követően vízben oldottuk, majd lefagyasztottuk a liofilizáláshoz.

A szintézisek során 0,25 mmol anyagmennyiségű peptidet kívántunk előállítani. A PepDriver1 szoftver (mely a peptidszintetizáló készülék vezérléséért felelős) az előállítani kívánt anyagmennyiség megadása után kiszámolja az aminosavak, reagensek és oldószerek szükséges mennyiségét. Minden esetben tíz százalék felesleggel dolgoztunk.

A szintézis első fele, vagyis az aminosavak kapcsolása és az utolsó aminosavon lévő Fmoc védőcsoport eltávolítása (illetve szükség esetén az előállítandó peptid acilezése) az automata peptidszintetizátorral történt. A szintézis további lépéseit - vagyis a gyanta mosásától kezdve a liofilizálásig - már mechanikusan végeztük.

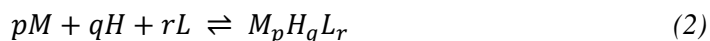
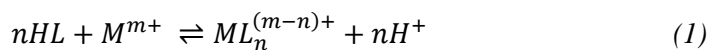
A liofilizált termék tisztaságát nagynyomású folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) módszerrel ellenőriztük. Ehhez egy analitikai Teknokroma Europa Peptide C18 (250 mm x 4,6 mm, pólusméret: 120 Å, szemcseméret: 5 µm) típusú kolonnát és Jasco MD-2010 plus diódasoros detektorral rendelkező Jasco készüléket használtunk. A detektálás 222 nm-en történt, ez a peptidkötésre jellemző elnyelési hullámhossz maximuma. A vizsgálatok során gradiens elúciót alkalmaztunk. Eluensként 0,1 V/V% TFA-t tartalmazó vizet és acetonitrilt használtunk, ahol az acetonitril aránya a nulladik perctől a tizenötödik percig 20 V/V%-ra nőtt, majd a tizenötödik perctől a huszadik percig 0 V/V%-ra csökkent, az áramlási sebesség pedig 0,8 – 1 ml/perc között változott adott peptidenként.

Az SSCSSACS-NH₂ peptid szennyezőktől való elválasztásához a W. R. Grace and Co. Vydac C18 félpreparatív kolonnáját (250 mm x 10 mm, pólusméret: 300 Å, szemcseméret: 5 µm) használtuk. Az eluens összetétele azonos az analitikai vizsgálatoknál használtakkal, 3 ml/perc áramlási sebességet alkalmaztunk.

Az elkészült peptidok azonosságát és tisztaságát vizsgáltuk még HPLC módszer mellett ESI-MS, NMR és pH-potenciás módszerekkel is.

3.3. pH-potenciometria

A pH-potenciometria az oldategyensúlyi vizsgálatok egyik legfőbb módszere, melynek segítségével tanulmányozhatjuk a komplexképződési folyamatokat. Ám ahhoz, hogy ezt a módszert alkalmazni tudjuk, szükséges, hogy a komplexképződés megváltoztassa a ligandum deprotonálódási folyamatait, mely által változik az oldat pH-ja is. Ekkor a H^+ -ion és az M^{m+} fémion közötti kompetíciót az (1) reakcióegyenlettel adhatjuk meg, a bruttó komplexképződési folyamat általános alakját pedig a (2) egyensúlyi reakció egyenletével írhatjuk le (a 2. egyenlet a töltéseket a könnyebb kezelhetőség miatt nem tartalmazza):



ahol H: a hidrogénion, L: a ligandum teljesen deprotonált formája, M^{m+} : a fémion és p,q,r: sztöchiometriai együtthatók.

A kialakuló komplexek összetétele és stabilitási állandói is meghatározhatóak a pH-potenciometriával, a stabilitási szorzatot a (3) egyenlet írja le:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_pH_qL_r]}{[M]^p[H]^q[L]^r} \quad (3)$$

A ligandum protonálódási állandóinak kiszámolására a SUPERQUAD [122], a fémkomplexek stabilitási szorzatainak meghatározásához pedig a PSEQUAD [123] számítógépes programot használtuk. A számolásokhoz az alábbi bemeneti adatok szükségesek: a fémion, a hidrogénion és a ligandum analitikai koncentrációja, az egyedi részecskék (hidroxido- és $M_pH_qL_r$ fémkomplexek) pontos vagy becsült stabilitási szorzatai, a víziószorzat, az Irving-faktor [124] (melyet a diffúziós potenciál figyelembevételének érdekében alkalmazunk), a titrálószer pontos koncentrációja, valamint a primer térfogat (ml) – pH adatpárok. A kiindulási komponensekre felírható anyagmérleg egyenletekkel (4-6) megadhatjuk a stabilitási állandók értékeit:

$$c_M = [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{pqr} [M]_i^p [H]_i^q [L]_i^r \quad (4)$$

$$c_H = [H] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{pqr} [M]_i^p [H]_i^q [L]_i^r \quad (5)$$

$$c_L = [L] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{pqr} [M]_i^p [H]_i^q [L]_i^r \quad (6)$$

Abban az esetben, ahol vegyes ligandumú rendszert vizsgáltunk, a komponensek száma három helyett négyre változik, így az anyagmérleg is négy komponensre írható fel. A program, felhasználva a kiindulási adatokat és a becsült stabilitási szorzatokat, a stabilitási állandókat a Newton-Raphson iterációval közelíti mindaddig, amíg el nem éri a $\sum (V_{mért} - V_{számított})^2$ számértéke a minimumot, ahol a V térfogat értékek az ismert koncentrációjú mérőoldatra vonatoznak. A közelítés pontosságát a $|V_{mért} - V_{számított}|$ átlagértéke, vagyis az illesztési paraméter adja meg. A program kiszámolja az adott részecskék stabilitási állandóit és azok hibáját, illetve a standard deviációt a titrálási görbe egyes pontjaiban. Ezen felül kirajzolja a részecskék koncentráció-eloszlási diagramját is, a pH függvényében egy adott komponensre nézve. Ez az eloszlás megszerkeszthető a MEDUSA [125] nevű programmal is, melyekhez a stabilitási állandók, illetve a kiindulási ligandum- és fémkoncentráció megadása szükséges.

Az Pb(II)-ionot tartalmazó rendszerekben minden esetben figyelembe vettük a hidrolízis állandókat, melyeket korábban már meghatároztak [97], [126]:

2. táblázat: Az Pb(II)-ion vizes közegben mért ($c = 0,001-0,006 \text{ mol/dm}^3$) irodalomban meghatározott hidrolízis állandói.

| | $\lg\beta$ |
|-----------------------------------|------------|
| $[\text{PbH}_{-1}]^+$ | -7,32 |
| $[\text{Pb}_4\text{H}_{-4}]^{4+}$ | -19,98 |
| $[\text{Pb}_6\text{H}_{-8}]^{4+}$ | -42,62 |

A kiértékeléseknél minden esetben figyelembe vettük a csapadékképződést, az adatsorokat a csapadék megjelenéséhez tartozó pH-ig használtuk fel.

Kísérleteinket vizes oldatokban végeztük el. A hőmérséklet állandó, 298 K-en való tartásához ultratermosztát berendezést alkalmaztunk. A pH-potenciometriás vizsgálatok elvégzéséhez a fémiontól függően két különböző titrátort használtunk.

Az ólom(II)ion komplexeinek meghatározásához a Mettler T50 automata titrátort alkalmaztuk, amelyhez 6.0255.100 Methrom DoubleJunction üvegelektrodót

csatlakoztattunk. A titrálás során a mintába argongázt vezettünk, mely az oxigén kizárása mellett a minta állandó kevertetését is biztosította.

A nikkel(II)-, kadmium(II)- és cink(II)ionot tartalmazó rendszerek esetében a MOLSPIN nevű készüléket használtuk, a titráló oldat adagolását a rendszerhez csatlakoztatott, Hamilton fecskendővel ellátott Mol-AcS mikrobüretta biztosította. A pH méréshez Methrom 6.0255.100 kombinált üvegelektrodót használtunk. A kevertetést a mágneses keverőmag biztosította, az oxigén kizárására szintén argongázt alkalmaztunk a minta gázterébe való bevezetéssel.

Mindkét berendezés esetében mérőoldatként pontosan ismert ($\sim 0,2 \text{ mol/dm}^3$) koncentrációjú karbonátmentes kálium-hidroxid-oldatot adagoltunk, melynek gázterébe ugyancsak argongázt vezettünk. Ezen oldat pontos koncentrációját a $0,0500 \text{ mol/dm}^3$ kálium-hidrogén-ftalát oldattal határoztuk meg. A pH-mérők kalibrálásához szintén $0,050 \text{ mol/dm}^3$ kálium-hidrogén-ftalát oldatot használtunk, melynek pH-ja 298 K-en 4,005. A minták összeállítása során használt HCl- és HNO_3 -oldatok pontos koncentrációját, a víziionszorozatot és az Irving-faktort az aktuális paramétereknek megfelelően, a már ismert pontos koncentrációjú KOH-oldattal történő titrálással határoztuk meg. A titrálási adatok kiértékelése a Gran-féle linearizáción [119] alapuló programmal történt. A vizsgálandó minták (kiindulási) ligandum koncentrációja $1,0 \cdot 10^{-3}$ és $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ között, a fémion – ligandum arány 2:1 és 1:3 között változott. A minták állandó ionerősségét 1 mol/dm^3 (a mintákra nézve $0,2 \text{ mol/dm}^3$) koncentrációjú KCl- illetve KNO_3 -oldatok hozzáadásával biztosítottuk. Mivel az ionerősség megegyezik a titráló oldat koncentrációjával, ám jelentősen meghaladja a minták fémion- és ligandum koncentrációjának összegét, így a minta ionerőssége állandó értéken tartható.

Ahhoz, hogy a keletkezett komplexek szerkezeti jellemzőit megadhassuk, további vizsgálati módszerek alkalmazása szükséges, úgymint ^1H NMR és CD spektroszkópia, valamint UV-látható spektrofotometria. Ez által képet kaphatunk a keletkezett komplexek szerkezetéről és a komplexképződésben részt vevő csoportokról is.

3.4. UV-látható spektrofotometria

Az elektrongerjesztési spektroszkópiák analitikai célokra talán legtöbbet alkalmazott módszere az UV-látható spektrofotometria, amelynél gerjesztés hatására a molekula elektronpályái között létrejövő energia átmenetekről nyerhető információ. Fémkomplexek képződése során felhasadnak a központi ion d-pályái, és eltérő energiájúak lesznek a ligandum elektromos terének hatására. A spektrális vizsgálatok eredményeképpen egy adott komplex szerkezetére, geometriájára, a koordinálódó donoratomok számára és minőségére tudunk következtetni. Az abszorpciós maximum értékét a koordinálódó csoportok kémiai minősége és száma jelentősen befolyásolhatja.

A nikkell(II)-komplexekre a leginkább a 4-es és 6-os koordinációs szám jellemző. A 6-os koordinációs számú oktaédes geometriájú komplexekhez három spinmegengedett d-d átmenet tartozik, melyek a Laporte-szabályban megfogalmazott tiltás következtében kis intenzitásúak ($\epsilon_{\max} < 30 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$): $\lambda_1 = 1430\text{-}770 \text{ nm}$ (${}^3\text{A}_2 \rightarrow {}^3\text{T}_2$), $\lambda_2 = 910\text{-}500 \text{ nm}$ (${}^3\text{A}_2 \rightarrow {}^3\text{T}_1(\text{F})$), $\lambda_3 = 520\text{-}370 \text{ nm}$ (${}^3\text{A}_2 \rightarrow {}^3\text{T}_2(\text{P})$). A középső oktaédes sáv felhasadása mutatja a komplex geometriai torzulását. Létezik még egy kisebb intenzitású, spin tiltott (${}^3\text{A}_2 \rightarrow {}^1\text{E}$) átmenet is, de ez általában csak vállként jelenik meg valamelyik csúcson.

Az előzőekkel ellentétben a 4-es koordinációs számú nikkell(II)-komplexek spektrumában $\lambda = 900\text{-}500 \text{ nm}$ hullámhossz tartományban már nagyobb intenzitású sávokat ($\epsilon \sim 100\text{-}1000 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) találhatunk. A diamágneses, síknégyzetes komplexek szintén 4-es koordinációs számúak, amelyek főleg erős terű ligandumok (pl. fehérjék amidnitrogénjei) kölcsönhatása révén képződnek. Ezeknek a komplexeknek a nagy intenzitású ($\epsilon \sim 50\text{-}500 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) elnyelési sávja $\lambda = 400\text{-}550 \text{ nm}$ hullámhossz tartományban jelenik meg, az oldatot gyakran sárga, narancssárga vagy vöröses szín jellemzi. Emellett 430 nm alatt található még egy második, intenzívebb sáv is, mely gyakran töltésátviteli eredetű.

Az Pb(II)-komplexek oldatbeli szerkezetének UV-látható spektrofotometriával való meghatározását a 6s elektronok távoli UV elnyelése és ennek a ligandumkoordinálódásra való érzéketlensége, a kadmium(II)ion esetén pedig a telített

vegyértékelektronháj nehezíti [127]. Azonban az irodalomban ismert az ólom(II) hidrolízisének és kén-donoratomokkal rendelkező ligandumokkal alkotott komplexeinek tanulmányozása a ligandum→fém töltésátviteli sávjának követésével [128].

Tiolcsoportot tartalmazó ligandumok (például: Ac-Cys és Ac-Pen) ólom(II)-komplexeinek UV-spektrumában ~277-278 nm hullámhossz körül jelenik meg az abszorpciós maximum, a szabad ligandumokkal szemben, ahol ~235-238 nm hullámhossznál széles váll van a spektrumban. Az Pb(II)-Cys rendszerénél 298 nm-nél detektálták az abszorpciós maximumot, mely a $S^- 3p \rightarrow Pb(II) 6p$ ligandum-fém töltésátviteli sávhoz tartozik [129]. Az ólom(II)-glutation rendszer esetében 334 nm hullámhossznál detektáltak abszorpciós maximumot, mely a három tiolátcsoport koordinációjához rendelhető [130].

Cisztein tartalmú vegyületek Cd(II)-komplexeinek UV spektrumában az abszorpciós maximum 231-232 nm hullámhosszúság körül található, melyhez a $Cd \rightarrow S^-$ fém-ligandum töltésátviteli sávot rendelték hozzá. 232 nm hullámhosszon detektálták a TRIL16C ligandum három kén koordinált kadmium komplexét $22600 M^{-1}cm^{-1}$ értékű extinciókoefficienssel. Analóg kísérletek a TRIL12C hasonló eredményeket produkáltak, ahol szintén három kén donortatom koordinálódott a fémionhoz. Az abszorpciós maximumot 231 nm hullámhosszon, $20600 M^{-1}cm^{-1}$ extinciókoefficiens értékkel detektálták [131].

A spektrumsorozatokot Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras spektrofotométerrel 1,000 cm-es küvettában vettük fel, ólom(II)- és kadmium(II)iont tartalmazó rendszerek változásának vizsgálatához 200-400 nm közötti, nikkell(II)iont tartalmazó rendszerek esetében pedig 200-900 nm közötti hullámhossz tartományban. A minták koncentrációja $1 \cdot 10^{-4}$ és $1 \cdot 10^{-3} mol/dm^3$ között változott, a fémion-ligandum arány 2:1 és 1:3 között volt. A spektrumokat különböző pH-kon detektáltuk, melyhez a 6.0234.110 Methrom kombinált üvegelektóddal összekapcsolt Methrom 827 pH lab hordozható pH-mérő készüléket használtuk. A pH állításához KOH-, HCl- és TFA-oldatokat használtunk.

Az ólom(II)-komplexek esetében nem tudtuk a pH-potenciometriás vizsgálatoknál már használt $Pb(NO_3)_2$ -oldatokat használni, ugyanis a fémoldatban lévő NO_3^- -ion

abszorpciós elnyelése ugyanabban a hullámhossz tartományban van (~277-278 nm), mint a tiolátsoporté. Emiatt ólom(II)-nitrát oldat helyett a felhasznált vegyszereknél leírt módon elkészített ólom(II)-trifluoracetát oldatot használtunk a spektrofotometriás mérések során. A Cd(II)- és Ni(II)-tartalmú rendszerek vizsgálatához kb. 0,1 mol/dm³ pontosan ismert koncentrációjú CdSO₄-, NiSO₄-, illetve NiCl₂-oldatot használtunk.

A spektrumok kiértékelése a gyártó által rendelkezésünkre bocsájtott program, és az MS Office Excel segítségével történt.

3.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A CD spektroszkópia azon módszerek közé tartozik, mely a polarizált fény és egy optikailag aktív anyag kölcsönhatásán alapulnak. A fehérjék (mint a legtöbb, élő szervezet által szintetizált molekula) optikailag aktívak, azaz az oldatukon keresztülbocsájtott polarizált fény síkját elforgatják, vagy a síkban poláros fényt elliptikussá teszik. Optikailag aktív egy molekula, amely aszimmetrikus (más néven királis), vagyis másodrendű szimmetriaelemmel (tükörsíkkal, inverziós centrummal, tükrözéses forgatással) nem rendelkezik, szerkezete nem esik egybe a saját tükörképével.

A fémkomplex optikai aktivitása származhat a komplex molekula vagy a ligandum saját asszimetriájától. Optikailag aktív közegben két cirkulárisan polarizált fénysugár különböző mértékben nyelődik el, így azon áthaladva amplitúdójuk is különbözni fog, amely elliptikus polarizációhoz vezet. A mintán áthaladó fény elnyelődésére érvényes a Lambert-Beer törvény. Az optikailag aktív mintára jellemző CD spektrumot megkaphatjuk a hullámhossz függvényében ábrázolt balra és jobbra cirkulárisan poláros fény abszorpciós koefficiensek különbségéből ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{bal}} - \varepsilon_{\text{jobb}}$). Fontos, hogy mind az optikai forgatóképesség, mind a cirkuláris dikroizmus függ a hullámhossztól. Az optikai forgatóképességi diszperziót és a cirkuláris dikroizmust együttesen hívjuk Cotton-effektusnak.

A CD-spektroszkópiát széles körben használják a nikkell(II)-peptidkomplexek szerkezetének feltérképezésére [132]-[134]. Tripeptidek esetén, erősen koordinálódó

oldallánc hiányában nagy stabilitású, $[\text{MH}_2\text{L}]^-$ összetételű, síknégyszetes komplexek alakulnak ki az aminocsoport, két amidnitrogén és a karboxilátóxigén részvételével. Abban az esetben, ha a tripeptidben tetszőleges helyzetben nemkoordinálódó oldalláncok ($-\text{R}$) találhatóak, akkor a komplex várható Cotton-effektusa[135] az alábbi egyenlet alapján számítható ki:

$$\Delta\varepsilon_{\lambda}^{X-Y-Z} = \Delta\varepsilon_{\lambda}^{X-Gly-Gly} + \Delta\varepsilon_{\lambda}^{Gly-Y-Gly} + \Delta\varepsilon_{\lambda}^{Gly-Gly-Z} \quad (7)$$

ahol $\Delta\varepsilon_{\lambda}^{X-Y-Z}$: az X-Y-Z tripeptid $[\text{MH}_2\text{L}]^-$ összetételű komplexének egy adott (λ) hullámhosszon mért Cotton-effektusa. A komplexben különböző helyzetben lévő (R_1 , R_2 vagy R_3), de azonos kémiai minőségű optikailag aktív csoportok különböző nagyságú Cotton-effektust eredményeznek a következő sorrend szerint:

$$\Delta\varepsilon_{\lambda}^{Gly-X-Gly} > \Delta\varepsilon_{\lambda}^{Gly-Gly-X} > \Delta\varepsilon_{\lambda}^{X-Gly-Gly} \quad (8)$$

Ez azzal magyarázható, hogy a központi fémionhoz kapcsolódó különböző donorcsoportok nem azonos hatásfokkal továbbítják a tripeptid $-\text{R}$ oldalláncai által hordozott királis információt a kromofór csoport, vagyis a fémion felé. Ez a hatás a kísérleti tapasztalatok alapján az alábbi sorrendben csökken: $\text{N}^- > \text{COO}^- > \text{NH}_2$. Minél közelebb van a kromofór csoporttól (központi fémiontól) a kiralitáscentrum, annál intenzívebb effektust eredményez.

A ligandumaink nikkell(II)-komplexeinek CD spektroszkópiás szerkezetvizsgálatát a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszék JASCO-810 típusú készülékén végeztük. A minták fémion-ligandum aránya 2:1 és 1:5 között változott. A spektrumokat szobahőmérsékleten, különböző pH-értékeken rögzítettük, melyhez a 6.0234.110 Methrom kombinált üvegelektóddal összekapcsolt Methrom 827 pH lab hordozható pH-mérő készüléket használtuk. A spektrumokat 220-800 nm hullámhossztartományban 1,000 mm és 1,000 cm úthosszú küvetákban rögzítettük. Az adatok kiértékelése a gyártó által mellékelt szoftveren, illetve az MS Excel program használatával történt.

3.6. NMR spektroszkópia

A ^1H NMR magmágneses magrezonancia spektroszkópiát egyrészt alkalmazhatjuk a ligandum tisztaságának és szerkezetének azonosítására, másrészt követhetjük a pH fokozatos emelésével lejátszódó komplexképződési folyamatokat Pb(II)-, Cd(II)- vagy Ni(II)-iont tartalmazó oldatokban, azonosíthatjuk a keletkező komplexek szerkezetét, meghatározhatjuk a koordinációban résztvevő funkcionális csoportokat. Ezekre utalhat a jelek kémiai eltolódása, szélesedése, illetve multiplicitásának változása. Az ólom(II)ion és kadmium(II)ion esetében a részecskék ligandumcsere sebessége az NMR skálán nézve gyors, a jelek ellaposodnak.

Az ^1H NMR spektrumokban a jelhozzárendelést 2D NMR spektroszkópiai mérésekkel kiegészítve tudtuk elvégezni. Az ^1H COSY NMR egy homonukleáris 2D technika, mely a skalárisan csatolt protonok közötti korrelációt mutatja. Többnyire a geminális ($^2J_{\text{HH}}$) és vicinális ($^3J_{\text{HH}}$) csatolások láthatóak [136].

Az ^1H - ^{13}C HSQC spektroszkópia a különböző, skalárisan csatolt magok közötti korrelációt mutatja. A kétdimenziós spektrum keresztcsúcsa az egyik dimenzióban az ^1H kémiai eltolódása, a másik dimenzióban a protonhoz kapcsolódó ^{13}C mag közötti korreláció. Ebben az esetben egykötéses korrelációt detektálhatunk [137].

Az NMR-méréseket a Bruker AM 360 MHz FT-NMR, illetve a Bruker Avance DRX 400 MHz FT-NMR készüléken végeztük, a kiértékeléshez a TopSpin 3.5 és a MestReNova 9.0 szoftvereket használtuk.

A minták oldószereként az Eurisotop által forgalmazott, 99,8% izotóptisztaságú D_2O szolgált. A ligandumok koncentrációja $0,005 \text{ mol/dm}^3$, a fémion-ligandum arány 0:1 és 2:1 között változott, melyeket D_2O -ban oldott $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ és $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ hozzáadásával értünk el, belső standardként trimetil-szilil-propánsav (TSP) nátrium sóját használtunk. A spektrumokat különböző pH-kon vettük fel. A pH beállításához NaOD- és DNO_3 -oldatokat használtunk, a pH mérését a 6.0234.110 Methrom kombinált üvegelektóddal összekapcsolt Methrom 827 pH lab hordozható pH-mérő készülékkel végeztük, melyet $0,0500 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú, háromszor ioncserélt vízben oldott kálium-hidrogén-ftalát pufferoldatra kalibráltuk. A D_2O -oldatban mért pH* értékeket az alábbi egyenletet felhasználva konvertáltuk át pH értékekké [138]:

$$pH = pH^* \cdot 0,930 + 0,40 \quad (9)$$

3.7. Tömegspektrometria (ESI-TOF-MS)

Az előállított ligandumok egységességét HPLC technikával ellenőrizni tudtuk, míg a ligandumok összetételének azonosítására, illetve a kétmagvú komplexek létezésének bizonyítására ESI-MS és ESI-MS/MS technikát alkalmaztunk. A minták oldásához háromszor ioncserélt vizet használtunk. A vizsgálat gázfázisban történt, melyhez a gáz hallmazállapotot elporlasztásos ionizációval értük el. Mivel a képződő részecskék lágy ionizáción mentek keresztül, a fragmentáció csekély mértékű volt, ezáltal a komplex molekulatömegének ismeretében hozzárendelhetőek a direkt jelek. A jelek asszignációja a spektrumok tömeg/töltés (m/z) értéke és a jellemző izotópeloszlás alapján történt.

A méréseket Dr. Csire Gizella végezte maXis II MicroTOF-Q típusú Qq-TOF MS készüléket (Bruker Daltonik, Bréma, Németország) használva ESI ionforrás mellett. A minta áramlási sebessége 3 $\mu\text{l}/\text{perc}$ volt, melyet fecskendőpumpa (ColeParmer Ins. Co., Vernon Hills, IL, USA) segítségével biztosítottak. A spray feszültsége 4 kV, a szárító gáz (N_2) hőmérséklete 200 °C, az áramlási sebessége pedig 4 l/min volt. Az MS/MS mérések esetén ütközési gázként is nitrogént használtunk. Az ütközési cellában $1,2 \cdot 10^{-3}$ mbar nyomást alkalmaztunk. A ligandumok tömegspektrumait pozitív módban, a negatív töltésű komplexek tömegspektrumait pedig negatív módban rögzítettük.

A mérésekhez a ligandumok koncentrációját $1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³-re állítottuk be, a fémkomplexek esetében a fémion-ligandum arány 2:1 volt. A kívánt pH-értéket 0,2 mol/dm³ KOH oldattal állítottuk be, a fémkomplexek vizsgálatához használt fémion a kb. 0,01 mol/dm³ pontosan ismert koncentrációjú Ni(NO₃)₂-oldat volt.

4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

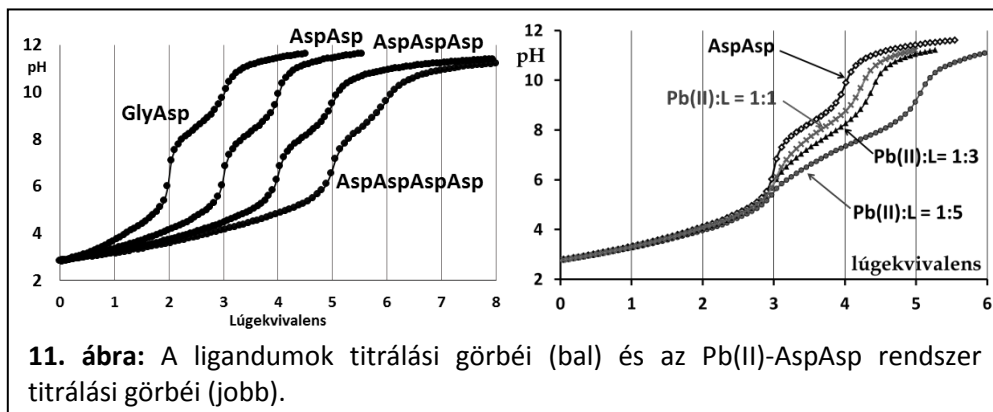
4.1. Aszparaginsavat tartalmazó peptidek ólom(II)komplexei

Ahhoz, hogy megállapíthassuk a ligandumban lévő karboxilátcsoportok számának és az ólom(II)ionnal kialakított komplexek stabilitásának összefüggését, összesen négy különböző ligandumot vizsgáltunk pH-potenciometriás módszerrel. A vizsgált négy ligandumban (GlyAsp, AspAsp, AspAspAsp és AspAspAspAsp) rendre három, négy, öt és hat deprotonálódásra képes csoport van, melyek közül minden esetben az egyik az N-terminális ammóniumcsoport, a többi disszociálabilis proton az aszparaginsavak karboxilcsoportjaiból származik, melyeknek makroszkópikus állapotait az 3. táblázatban tüntettem fel. Ezek jól egyeznek a már korábban közölt irodalmi értékekkel [87].

3. táblázat: A vizsgált, aszparaginsav tartalmú ligandumok deprotonálódási (pK) állandói ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,20\text{ mol/dm}^3\text{ KNO}_3$).

| | GlyAsp | AspAsp | AspAspAsp | AspAspAspAsp |
|---------------------|---------|---------|-----------|--------------|
| $pK(\text{COOH})_1$ | 2,72(8) | 2,76(2) | 2,45(2) | 2,40 [87] |
| $pK(\text{COOH})_2$ | 4,22(4) | 3,46(1) | 3,24(1) | 2,94(1) |
| $pK(\text{COOH})_3$ | | 4,47(1) | 3,96(1) | 3,66(1) |
| $pK(\text{COOH})_4$ | | | 4,83(1) | 4,30(2) |
| $pK(\text{COOH})_5$ | | | | 5,03(2) |
| $pK(\text{NH}_3^+)$ | 8,36(1) | 8,16(1) | 8,12(3) | 8,3(1) |

A legnagyobb pK érték minden esetben az ammóniumcsoporthoz rendelhető. A szabad ligandumok és az Pb(II)-AspAsp rendszer titrálási görbéit a 11. ábra



szemlélteti. Látható, hogy a peptidekben lévő aszparaginsavak karboxilcsoportjainak

deprotonálódási folyamatai átfedő folyamatként zajlanak le, így a pK értékek nem rendelkezhetők az egyes karboxilátcsoportokhoz.

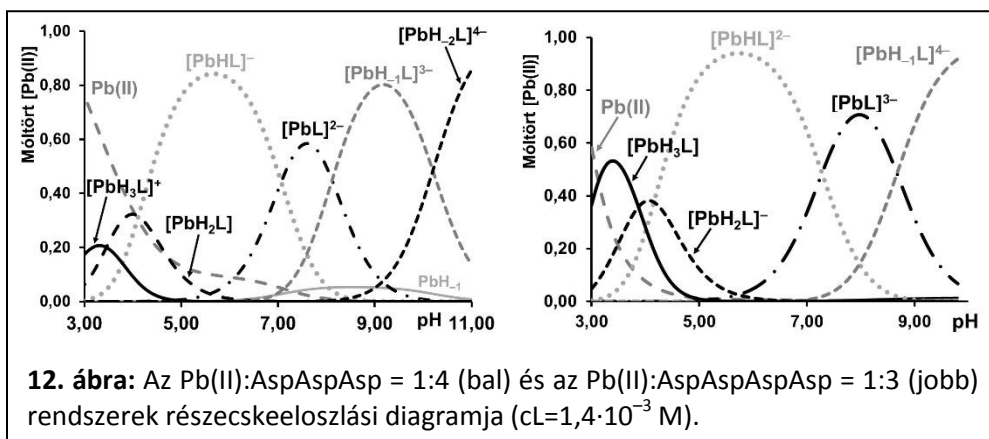
Az ólom(II)iont és aszparaginsav-tartalmú peptidet tartalmazó rendszerek pH-potenciometriás vizsgálatait az alábbi arányoknál végeztük el: Pb(II):GlyAsp = 1:3, 1:2 és 1:1, Pb(II):AspAsp = 1:5, 1:3 és 1:1, Pb(II):AspAspAsp = 1:4, 1:2,5 és 1:1, Pb(II):AspAspAspAsp = 1:3 és 1:1. Mind a négy vizsgált peptid esetében az 1:1 és 1:2 fémion-ligandum összetételű oldatokban ~7,0-8,0 pH körül csapadék vált le, 1:3 aránynál ~ 9,0-11,0 pH körül alakult ki csapadék, nagyobb ligandumfelesleg alkalmazása esetén csapadékleválás nem történt. A peptidek ólom(II)ionnal alkotott komplexeire jellemző állandók a 4. táblázatban találhatóak.

4. táblázat: A ligandumok ólom(II)komplexeinek stabilitási állandói ($\lg\beta_{pqr}$) és lépcsőzetes deprotonálódási (pK) állandói ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,20\text{ mol/dm}^3\text{ KNO}_3$).

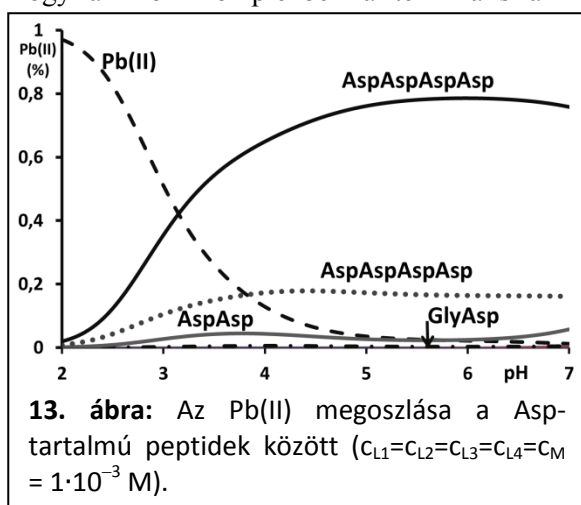
| | GlyAsp | AspAsp | AspAspAsp | AspAspAspAsp |
|---|-----------|----------|-----------|--------------|
| HL | 8,36 | 8,16 | 8,12 | 8,15 |
| PbH ₃ L | | | 19,65(5) | 21,58(5) |
| PbH ₂ L | | 15,07(3) | 16,19(3) | 17,71(6) |
| PbHL | 10,45(7) | 11,11(3) | 12,07(2) | 13,55(5) |
| PbL | 3,6(1) | 4,63(4) | 5,00(3) | 6,27(9) |
| PbH ₁ L | -3,58(5) | -2,65(4) | -3,12(4) | -2,4(1) |
| PbH ₂ L | -13,63(6) | -12,7(2) | -13,32(5) | |
| $pK(\text{PbH}_3\text{L}/\text{PbH}_2\text{L})$ | | | 3,46 | 3,87 |
| $pK(\text{PbH}_2\text{L}/\text{PbHL})$ | | 3,96 | 4,12 | 4,16 |
| $pK(\text{PbHL}/\text{PbL})$ | 6,85 | 6,48 | 7,07 | 7,28 |
| $pK(\text{PbL}/\text{PbH}_1\text{L})$ | 7,18 | 7,28 | 8,12 | 8,67 |
| $pK(\text{PbH}_1\text{L}/\text{PbH}_2\text{L})$ | 10,05 | 10,05 | 10,20 | |
| $\lg\beta(\text{PbHL})-pK_{\text{amino}}$ | 2,09 | 2,95 | 3,95 | 5,25 |
| $\lg\beta(\text{PbL})-pK_{\text{amino}}$ | -4,76 | -3,53 | -3,12 | -1,88 |

Mind a négy ligandum esetében megállapíthatjuk, hogy csak 1:1 összetételű mononukleáris komplexek jelennek meg, biszkomplexeiket még nagy ligandumfelesleget tartalmazó oldatban sem tudtunk kimutatni.

Ligandumfelesleget tartalmazó rendszerek esetében vegyes hidroxidokomplexek keletkezése is feltételezhető (12. ábra).



Az AspAspAspAsp esetében az PbH_3L részecske pH~3,0 körül jelentős mennyiségben van jelen. Az $PbH_3L \rightleftharpoons PbH_2L + H$ ($pK(PbH_3L/PbH_2L)$) és a $PbH_2L \rightleftharpoons PbHL + H$ ($pK(PbH_2L/PbHL)$) folyamat megfelel a komplexben kötött ligandumok karboxilcsoportja disszociációs állandóinak. Ezekben a komplexekben, mint horgonydonor, egy vagy több karboxilát oxigén koordinálódik az Pb(II)-ionhoz, és a terminális aminos csoport protonált marad a protonált részecskében. Azonban a $PbHL \rightleftharpoons PbL + H$ folyamat disszociációs állandója ($pK(PbHL/PbL)$) minden esetben kisebb, mint a terminális aminos csoport pK értéke. Ez azt jelenti, hogy az PbL komplexben a terminális aminos csoport részt vesz az Pb(II)-ion



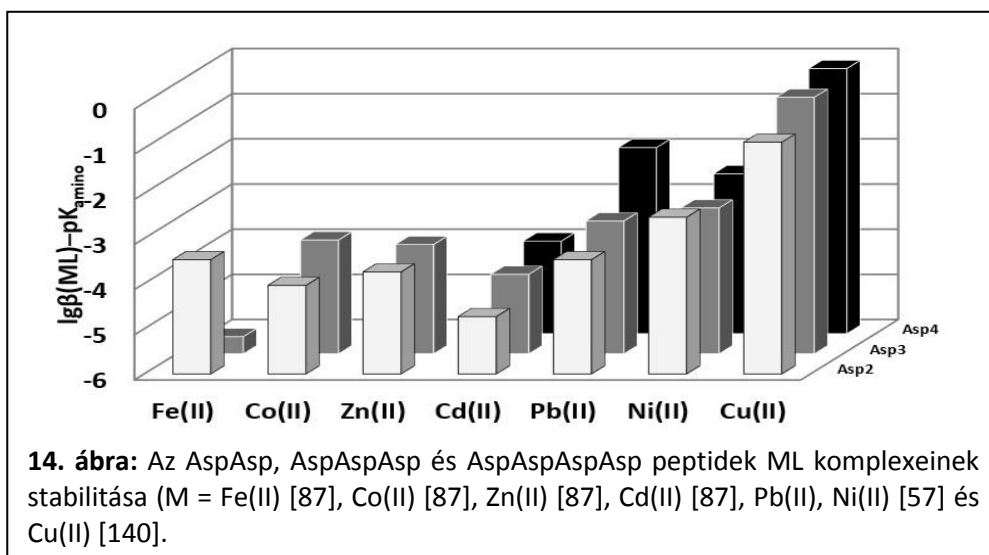
megkötésében. A $pK(NH_3^+) = \lg\beta(HL)$ és a $pK(PbHL/PbL)$ értékek közötti különbség 1,0-1,7 között van, ami utalhat az aminos csoport jelentős mértékű kölcsönhatására vagy a negatív töltés csökkenésére is. A kölcsönhatás erőssége csökken a karboxilátcsoportok számának növelésével (az AspAsp;

AspAspAsp és AspAspAspAsp sorrendben), melynek oka valószínűleg a sztérikus

hatás. A karboxilátcsoportok Pb(II)-ionhoz való koordinációját korábban már igazolták a szilárd Pb(HAsp)(NO₃)- és Pb(Asp)-komplexek röntgendiffrakciós vizsgálatával is [139].

A 2. táblázat adataiból, illetve a **13. ábrán** jól látszik, hogy a komplexek stabilitása határozottan nő a β -karboxilát csoportok számának növelésével, és nem befolyásolja a ligandum mérete, illetve annak megnövekedett negatív töltése.

Ezen ligandumok komplexképződését már vizsgálták kutatócsoportunkban más fémionokkal is, melyek a **14. ábrán** láthatóak. Általánosságban elmondható, hogy az oldalláncok karboxilátcsoportjai hatással vannak a komplexképződésre. Ám ez a hatás függ ezeknek az oldalláncoknak a helyzetétől és számától is.



Az aszparaginsav β -karboxilát csoportjainak hatása egyértelmű, azok közvetlenül kötődnek a fémionhoz, mely a komplexek megnövekedett stabilitását eredményezi. Az irodalmi adatokból úgy tűnik, hogy a γ -karboxilát csoportnak nincs hatása a komplex kialakulásának folyamatára, a részecskék összetétele és a stabilitása ugyan az, mint a Gly₂ peptidben.

Az ábra jól tükrözi, hogy ezen peptidekkel a legnagyobb stabilitású komplexeket a Cu(II) és Ni(II) képezi. Az Pb(II)-, a Zn(II)-, illetve a Co(II)-ionok közel azonos stabilitással alakítanak ki komplexeket, míg a vizsgált fémionok közül a Cd(II)-

ionnal alakulnak ki a legkisebb stabilitású komplexek. Ezek alapján az alábbi stabilitási sorrendet lehet felírni: Cu(II) > Ni(II) > Pb(II) ~ Zn(II) ~ Co(II) > Cd(II).

4.2. N-terminálisan védett egy, illetve két ciszteint tartalmazó peptidek

Ahhoz, hogy megérthessük a nagyobb tagszámú, két ciszteint tartalmazó peptidek fémkomplexeiben a tiolátcsoportok szerepét, először kisebb tagszámú egy-, illetve két ciszteint tartalmazó peptidek vizsgálatára volt szükség. Így különböző fémionokkal (Pb(II), Cd(II), Ni(II), Zn(II)) megvizsgáltunk öt-öt olyan egy, illetve két ciszteint tartalmazó peptidet, melyek N-terminális vége acetilcsoporttal védett, így csak a tiolátcsoport, illetve az egyéb koordinálódásra képes donorcsoportok részvétele befolyásolja a kialakuló komplexek összetételét, és a keletkezett komplexek koordinációs módját.

Az egy és két ciszteint tartalmazó peptidek protonálódási és deprotonálódási állandóit az 5. és 6. táblázat tartalmazza.

5. táblázat: Az egy ciszteint tartalmazó ligandumok protonálódási ($\lg\beta$) és deprotonálódási (pK) állandói ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,20\text{ M KNO}_3$).

| | Ac-AAAC | Ac-SAAC | Ac-CGAK | Ac-CGAH | Ac-CGAD |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| $\lg\beta_1$ | 8,64(1) | 8,79(2) | 10,38(1) | 8,40(2) | 8,61(5) |
| $\lg\beta_2$ | | | 18,65(1) | 14,92(2) | 13,09(7) |
| pK_1 | 8,64 | 8,79 | 8,27 | 6,52 | 4,48 |
| pK_2 | | | 10,38 | 8,40 | 8,61 |

6. táblázat: A két ciszteint tartalmazó ligandumok protonálódási ($\lg\beta$) és deprotonálódási (pK) állandói ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,20\text{ M KNO}_3$).

| | Ac-SCCS | Ac-CSC | Ac-CGSC | Ac-CSSC | Ac-CSSACS |
|--------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| $\lg\beta_1$ | 8,98(1) | 9,16(3) | 8,98(1) | 9,34(1) | 8,82(1) |
| $\lg\beta_2$ | 17,11(1) | 17,27(5) | 17,10(1) | 17,64(1) | 16,91(1) |
| pK_1 | 8,13 | 8,11 | 8,12 | 8,30 | 8,09 |
| pK_2 | 8,98 | 9,16 | 8,98 | 9,34 | 8,82 |

Az egy ciszteint tartalmazó N-terminálisan védett tetrapeptidek közül kettő, az Ac-AAAC-NH₂ és az Ac-SAAC-NH₂ csak egy donorcsoportot, a tiolátcsoportot tartalmazza. Az Ac-CGAK-NH₂ ligandumban a tiolátcsoport mellett a lizin aminocsoportja, az Ac-CGAH-NH₂ tetrapeptidben a hisztidin imidazolcsoportja, az

Ac-CGAD-NH₂-ben az aszparaginsav karboxilátcsoportja is potenciális donorcsoport. A tiolcsoportok deprotonálódási állandói közel azonos értékűek az öt tetrapeptidben (8,27 és 8,79 közötti), és ezek közül a legnagyobb értékek a csak tiolcsoportot tartalmazó peptideket jellemzik.

A két ciszteint tartalmazó N-terminálisan védett tri-, tetra- és hexapeptidekben a tiolátcsoponton kívül más koordinációra képes csoport nem található, a különbség a peptidekben a ciszteinek egymáshoz viszonyított pozíciója. A pK₁ értékeik ~8,1-8,3 körüliek, pK₂ értékeik pedig egy lg egységgel nagyobbak (9,0-9,3), így a két tiolcsoport deprotonálódása minden esetben átfedő lépésben zajlik.

4.2.1 Az ólom(II)komplexek

Az egy ciszteint tartalmazó tetrapeptidekből kettő esetében (Ac-AAAC-NH₂ és Ac-SAAC-NH₂) a pH-potenciometriás mérések során a ligandumfelesleget tartalmazó oldatokban ~7,0-es pH körül csapadék vált le, (ami feltehetőleg semleges töltésű vegyes hidroxidokomplex), így 1:1 fémion-ligandum arányú oldattal vizsgálat nem történt. Az Ac-CGAH-NH₂ és az Ac-CGAK-NH₂ peptidek esetén 1:2 és 1:1 fémion-ligandum arányú oldatok pH-potenciometriás vizsgálatát is elvégeztük, mely során csak ekvimoláris oldatban vált le csapadék (pH ~7,6-on és pH ~8,5-ön). A keletkezett komplexek összetételét és azok stabilitási állandóit a 7. táblázatban tüntettem fel.

7. táblázat: A ligandumok ólom(II)komplexeinek stabilitási állandói ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,20\text{ M KNO}_3$).

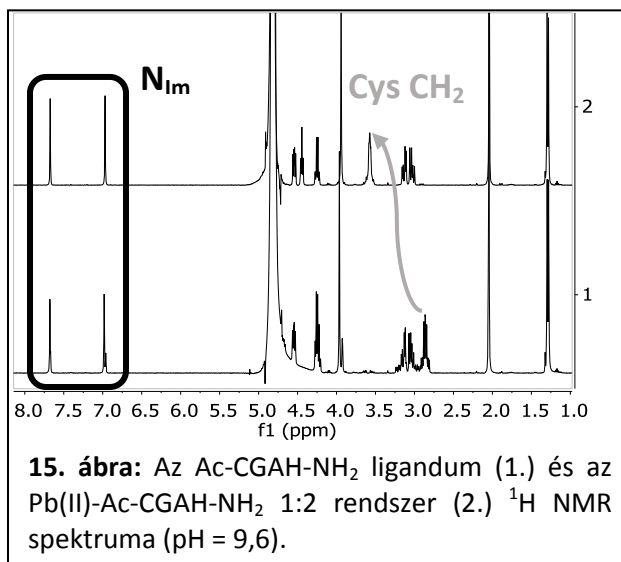
| $\lg\beta$ | Ac-AAAC | Ac-SAAC | Ac-CGAK | Ac-CGAH |
|--|---------|---------|-----------|----------|
| [PbH ₂ L ₂] ²⁺ | | | 31,48(5) | |
| [PbHL ₂] ⁺ | | | 22,2(1) | |
| [PbL ₂] | | | 12,00(8) | 11,41(5) |
| [PbHL] ²⁺ | | | 15,46(12) | 12,46(6) |
| [PbL] ⁺ | 6,2(1) | 6,4(1) | | 6,14(5) |

Az egy ciszteint tartalmazó ligandumok, az egyéb donorcsoportok ellenére is csak a tiolátcsoponton keresztül koordinálnak az ólom(II)ionhoz, amelyet a vizsgált peptideknél az alábbi eredmények igazolnak.

Összevetve az Ac-AAAC-NH₂ és az Ac-CGAH-NH₂ [PbL] komplexének stabilitási állandóját, az értékek közel megegyeznek, ami igazolja a fenti megállapítást. Az Ac-CGAH-NH₂ [PbHL]²⁺ komplexének deprotonálódására jellemző pK értéke (lgβ (PbHL)–lgβ(PbL)) a szabad ligandum hisztidin imidazolnitrogénjének pK értékéhez közeli érték (12,46–6,14 = 6,32 (pK_{His} = 6,52)), azaz az [PbL]⁺ komplexben sem feltételezhető az imidazolcsoport kötődése. A biszkomplexeik esetén két ligandum koordinálódik a fémionhoz a tiolátcsoportján keresztül.

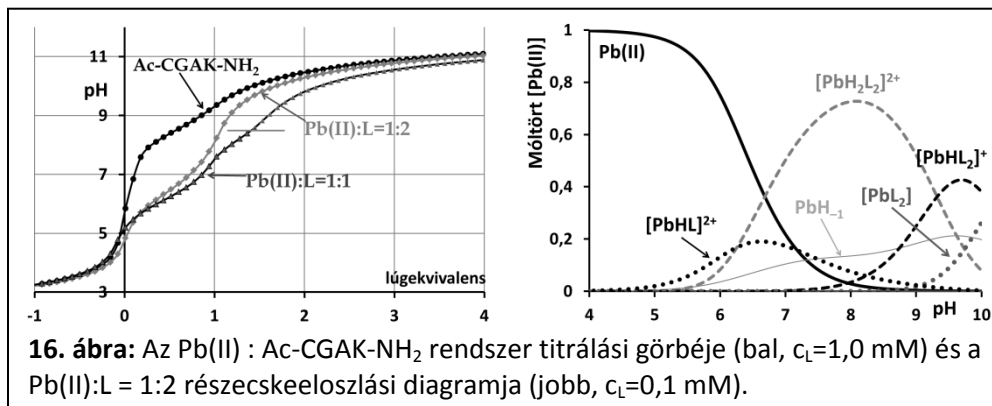
Ennek igazolására felvettük az Pb(II):Ac-CGAH-NH₂ 1:2 arányú rendszer pH-függő

¹H NMR spektrumát, melyből látszik, hogy az azonos pH-kon felvett szabad ligandum és az Pb(II)-iont is tartalmazó rendszer spektrumaiban a hisztidin imidazol nitrogénjeihez tartozó jelek gyakorlatilag nem tolódnak el, ám a cisztein metilén-csoportjában drasztikus változás figyelhető



meg. A **15. ábrán** bemutatott spektrumokból látható, hogy 9,6-os pH-n a szabad ligandum cisztein -CH₂ csoportjának jele 2,86 ppm kémiai eltolódásnál, az [PbL₂] komplexben ugyanez a jel 3,57 ppm kémiai eltolódásnál található, ami bizonyítja, hogy a donorcsoport nemcsak deprotonálódik a pH növelésével, hanem koordinálódik is.

Az Ac-CGAK-NH₂ [PbH₂L₂]²⁺ komplexében a fémionhoz két tetrapeptid koordinálódik a tiolátcsoportokon keresztül, és mindkét lizin aminocsoportja protonált formában van. Az [PbHL₂]⁺ és a [PbL₂] komplex képződése során (**16. ábra**) a két lizin oldallánc lépcsőzetes deprotonálódása játszódik le (lgβ PbH₂L₂–PbHL₂ = 9,48 és lgβ PbHL₂–lgβ PbL₂ = 10,2). Közel azonos értéket kapunk a lizin pK értékéhez, ami alátámasztja a lizin ammóniumcsoportjának deprotonálódását, és azt, hogy a deprotonált lizin aminocsoportja nem vesz részt a fémion megkötésében.



Az Ac-CGAK-NH₂ és az Ac-CGAH-NH₂ [PbL₂] komplexeinek stabilitási állandói közel azonosak, ami alátámasztja, hogy az Pb(II)-ionhoz mindkét ligandum csak a tiolátcsoportokon keresztül koordinálódik.

A komplexekben részt vevő tiolátcsoportok számának igazolásához felvettük a ligandumok különböző összetételű ólom(II)komplexeinek UV spektrumait (8. táblázat), melyet kiegészítettünk az Ac-CGAD-NH₂ ligandum ólom(II)komplexeinek adataival. A vizsgált rendszerek koncentrációja a tizede volt a pH-potenciometria során alkalmazott koncentrációval, így csapadékképződést a vizsgált pH-tartományokban nem tapasztaltunk.

8. táblázat: Az ólom(II)-ligandum 1:3 arányú rendszerek spektrális adatai a koordinációban részt vevő tiolátcsoportok számának függvényében (T=298 K).

| pH tartomány | koordinált S száma | Ac-SAAC-NH ₂ | | Ac-CGAK-NH ₂ | | Ac-CGAH-NH ₂ | | Ac-CGAD-NH ₂ | |
|--------------|--------------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| | | λ nm | ε M ⁻¹ ·cm ⁻¹ | λ nm | ε M ⁻¹ ·cm ⁻¹ | λ nm | ε M ⁻¹ ·cm ⁻¹ | λ nm | ε M ⁻¹ ·cm ⁻¹ |
| ~4,8-6,2 | 1 S ⁻ | 273 | 2000 | 276 | 1200 | 271 | 3500 | 274 | 1650 |
| ~6,3-7,4 | 2 S ⁻ | 314 | 1800 | | | 309 | 2700 | 308 | 1000 |
| ~7,5-11,0 | 3 S ⁻ | 333 | 2000 | 335 | 1200 | 334 | 1900 | | |

Összehasonlításképpen felvettük az Acetil-cisztein (Ac-Cys) és az Acetil-penicillamin (Ac-Pen) 1:2 és 1:1 fémion-ligandum arányú rendszerek pH-függő UV spektrumsorozatait (9. táblázat) [141]. A kapott eredmények alapján megállapíthattuk, hogy ezen ligandumok monokomplexeihez rendelhető abszorpciós maximumok 276 és 277 nm, a biszkomplexeihez rendelhető abszorpciós

maximumok pedig 309 és 311 nm hullámhossznál jelentkeznek. A három tiolátkén koordinációjára az irodalomban található összehasonlító adat, a glutation $[\text{PbL}_3]$ komplexéhez egy 334 nm-nél megjelelenő abszorpciós maximum rendelhető [142] (9. táblázat).

9. táblázat: A ligandumok ólom(II)komplexeihez rendelhető abszorpciós maximumok hullámhossza és moláris abszorpciós együttható értéke.

| komplexe összetétele | Ac-Cys | | Ac-Pen | | Glutation [142] | |
|------------------------------------|-------------------|---|-------------------|---|-------------------|---|
| | λ (nm) | ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) | λ (nm) | ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) | λ (nm) | ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) |
| [PbL] | 276 | 2400 | 277 | 2800 | | |
| [PbH _x L ₂] | 309 | 2600 | 313 | 2200 | | |
| [PbL ₃] ⁻ | | | | | 334 | 3500 |

Ezekből az adatokból látszik, hogy a koordinálódott tiolátcsoportok számának növekedése a nagyobb hullámhossz irányába tolja el az UV spektrumok abszorpciós maximumát.

Bár a pH-potenciometriás vizsgálatok alapján az Ac-SAAC-NH₂ peptiddel csak monokomplekx képződését feltételeztük, a spektrális változások (vagyis, hogy az abszorpciós maximum folyamatosan eltolódik a nagyobb hullámhossz irányába) arra utalnak, hogy az Pb(II)-ion koordinációs szférájában egynél több kén donoratom van jelen. Ez azt jelentheti, hogy pH > 6,0 felett $[\text{PbL}]_x$ ($x > 1$) polimerszerkezetű komplexek képződnek a tiolátcsoportokon keresztül, vagy nagyobb pH-n (igen híg oldatban) bisz- és triszkomplekxek is megjelennek.

Az előzőekhez hasonlóan az Ac-CGAK-NH₂ és Ac-CGAH-NH₂ ligandumok esetében is kialakulhat a bisz-, illetve triszkomplekx is, vagyis kötődhet kettő, valamint három ligandum a fémionhoz tiolátcsoportjaikon keresztül. Ezeket a részecskéket pH-potenciometriás vizsgálatokkal meghatározni nem tudtuk, mivel a komplexképződés pH-tartományában már a tiolcsoportok deprotonált formában vannak jelen. Ám az UV-spektrumsorozatok 309, illetve 334 nm hullámhosszon megjelelenő abszorpciós maximumai egyértelműen a kettő, valamint három kén donoratom koordinációját támasztják alá.

Az Ac-SAAC-NH₂ és Ac-CGAD-NH₂ komplexeiben lévő két kén donoratom koordinációjú komplexekre kapott spektrális adatok összhangban vannak a másik

két ligandum adataival, minden esetben ~310 nm hullámhossz körül van az abszorpciós maximum a spektrumokban.

Az N-terminálisan védett, két ciszteint tartalmazó peptidek esetén az alábbi fémion-ligandum arányú rendszerekkel végeztünk pH-potenciometriás méréseket: Pb(II):Ac-SCCS-NH₂ = 1:2 és 1:1, Pb(II):Ac-CSC-NH₂ = 1:5 és 1:1, Pb(II):Ac-CGSC-NH₂ = 1:2 és 1:1, Pb(II):Ac-CSSC-NH₂ = 1:3, 1:2 és 1:1, valamint Pb(II):Ac-CSSACS-NH₂ = 1:3 és 1:1. Ezek közül az Ac-CSC-NH₂ és az Ac-CGSC-NH₂ peptidek ólom(II)-rendszerének pH-potenciometriás vizsgálatai során még a ligandumfelesleget tartalmazó oldatokban is történt csapadékleválás pH ~7,0 körül. Mivel ezen két rendszer esetén még az UV spektroszkópia vizsgálatok során használt híg oldatokban is kialakult csapadék, ezért UV spektroszkópiás vizsgálatokat nem végeztük el. Az Ac-SCCS-NH₂ esetében csak 1:1 fémion-ligandum arányú oldatban (pH ~ 8,0-on) vált le csapadék, ám az Ac-CSSC-NH₂ és az Ac-CSSACS-NH₂ peptidek esetében még ekvimoláris oldatban sem képződött csapadék a vizsgált pH-tartományban (pH ~ 3,6 - 11,0). A pH-potenciometriás adatok kiértékelése során kapott stabilitási állandókat a 10. táblázatban tüntettem fel:

10. táblázat: A ligandumok ólom(II)komplexeinek stabilitási állandói ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,2\text{ M KNO}_3$).

| $\lg\beta$ | Ac-SCCS-NH ₂ | Ac-CSC-NH ₂ | Ac-CGSC-NH ₂ | Ac-CSSC-NH ₂ | Ac-CSSACS-NH ₂ |
|-----------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| [PbL ₂] ²⁻ | 15,5(2) | | | | |
| [PbL] | 10,86(4) | 13,73(2) | 11,32(2) | 11,72(3) | 10,81(5) |
| [PbH ₁ L] ⁻ | 0,6(2) | | | 1,03(5) | -0,4(1) |

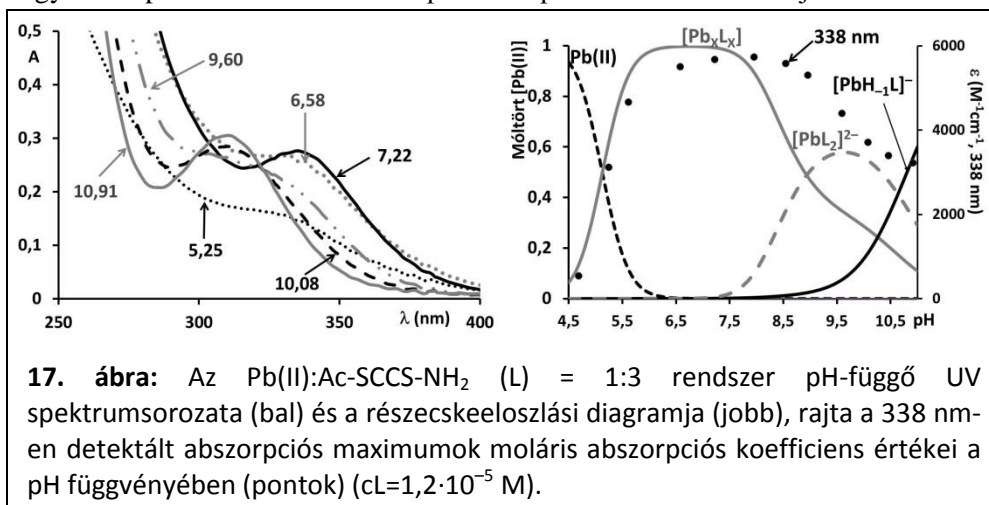
A két ciszteint tartalmazó N-terminálisan védett peptidek közül mindegyik képez ólom(II)ionnal [PbL] komplexet, melyek stabilitási állandói a 10,81-es és 13,67-es értékek között változóak, egyértelmű trendet nem lehet felírni. Ekkor a ligandum két tiolátcsoporton keresztül koordinálja a fémiont. A koordinációs módok igazolására felvettük a rendszerek pH-függő UV spektrumjait. Leolvastuk az abszorpciós maximumokhoz tartozó hullámhossz és moláris abszorpciós koefficiens értékeket, és ezeket az adatokat a 11. táblázatban tüntettem fel.

Az PbL komplex esetében nem zárhatjuk ki a polimerszerkezetű komplex kialakulását sem, vagyis az Pb_xL_x sztöchiometriát, ahol $X > 1$. Ezt a fotometriás vizsgálatok eredményei egyértelműen alátámasztják, mivel azt tükrözik, hogy az Pb(II)-ion kettőnél több kén donoratomhoz kötődik.

11. táblázat: Az ólom(II)-ligandumok 1:3 arányú pH-függő spektrumainak spektrális adatai ($T=298\text{ K}$).

| koordinált kén donoratom száma | pH-tartomány | Ac-SCCS-NH ₂ | | pH-tartomány | Ac-CSSC-NH ₂ | | Ac-CSSACS-NH ₂ | |
|--------------------------------|--------------|-------------------------|---|--------------|-------------------------|---|---------------------------|---|
| | | λ nm | ϵ M ⁻¹ ·cm ⁻¹ | | λ nm | ϵ M ⁻¹ ·cm ⁻¹ | λ nm | ϵ M ⁻¹ ·cm ⁻¹ |
| 2 S ⁻ | 10,0-11,0 | 311 | 3600 | 4,0-5,5 | 318 | 3000 | 318 | 800 |
| 3 S ⁻ | 4,6-9,5 | 338 | 5700 | 5,5-11,0 | 331 | 2000 | 335 | 1100 |

Az Ac-SCCS-NH₂ peptid [PbL] komplexének abszorpciós maximuma 338 nm hullámhosszra tehető (17. ábra), mely a három kén donoratom koordinációjára utal, vagyis ez a polimer szerkezetű komplexek képződését is alátámasztja.



A 9,0-es pH-n felvett 1:3 fémion-ligandum arányú UV spektrumban, ahol a részecskeeloszlási diagram alapján az [PbL] és az $[PbL_2]^{2-}$ komplexek 50-50%-ban vannak jelen (17. ábra), még a három kén koordinációjára jellemző abszorpciós maximum jelenik meg. Az utóbbi esetben az $[PbL_2]^{2-}$ biszkomplex kialakulásával az egyik ligandum két foggal, míg a másik ligandum csak az egyik tiolátcsoporttal koordinálódik a fémionhoz.

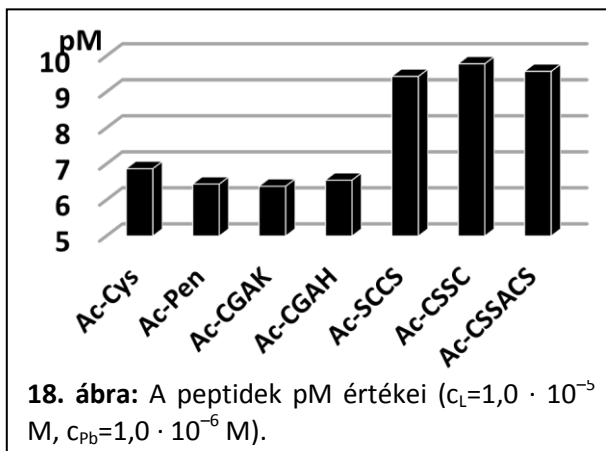
Az ekvimoláris oldatban és a ligandumfelesleget tartalmazó rendszer 11,0-es pH-n felvett spektrumában, ahol az $[PbH_1L]^-$ részecske az uralkodó, eltolódik 311 nm hullámhosszra az abszorpciós maximum, azaz két kén donoratom van jelen a koordinációs szférában, ami a vegyes hidroxidokomplex képződésére utal.

Az Ac-CSSC-NH₂ és az Ac-CSSACS-NH₂ peptidek Pb(II)-ionnal alkotott 1:1 arányú rendszereinek spektrumában az abszorpciós maximum 318 nm-nél jelenik meg, az 1:3 arányú rendszerben ez a csúcspont eltolódik 8,0-as pH felett 331 és 335 nm-re. Mivel mindkét aránynál csak 1:1 összetételű mononukleáris komplexeket írtunk le, ezért míg az első esetben két, addig a második esetben három cisztein koordinálódik a fémionhoz, ami szintén a polimerszerkezetű komplexek kialakulását feltételezi mindkét ligandum esetén, melynek összetétele $[Pb_xL_x]$, ahol $x \geq 2$.

Az eddigi eredmények alapján megállapítható, hogy a kis tagszámú N-terminálisan védett egy, illetve két ciszteint tartalmazó peptidek a legtöbb esetben polimer szerkezetű komplexeket is képeznek az ólom(II)ionnal savas pH-tartományban. Emellett híg oldatban lúgos pH-tartományban bis- vagy triszkomplexek is megjelenhetnek, de ezek stabilitása a pH-potenciometriás mérésekből nem határozható meg. A polimer szerkezetű komplexek kialakulása több esetben csapadék kiválásával eredményezhető, mely magyarázható azzal, hogy az Pb(II)-ion nagy affinitással lép kölcsönhatásba a kén donoratommal, illetve a tiolátcsoport hajlamos

kénhidas szerkezetet kialakítani. Mivel ezek a vizsgált peptidek kis tagszámúak, méretük nem akadályozza a polimer szerkezet kialakulását az ólom(II)ion körül.

A ligandumok fémionmegkötő képességének



összehasonlítására kiszámoltuk a pM értékeket ($pH=7,4$, $c_L=1 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³, $c_M=1 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³) (18. ábra). Azon peptidek esetében, ahol már 7,4-es pH alatt csapadék vált ki a titrálás során, nem adható meg ez az érték.

Az oszlopdiaagramból egyrészt látható, hogy míg az egy ciszteint tartalmazó ligandumok pM értéke minden esetben csupán ~6,5 körül van, addig a két ciszteint tartalmazó peptidek esetén ez az érték ~9,5 körüli. Ez jelentős fém megkötésbeli különbséget jelent az egy- és két ciszteint tartalmazó ligandumok között.

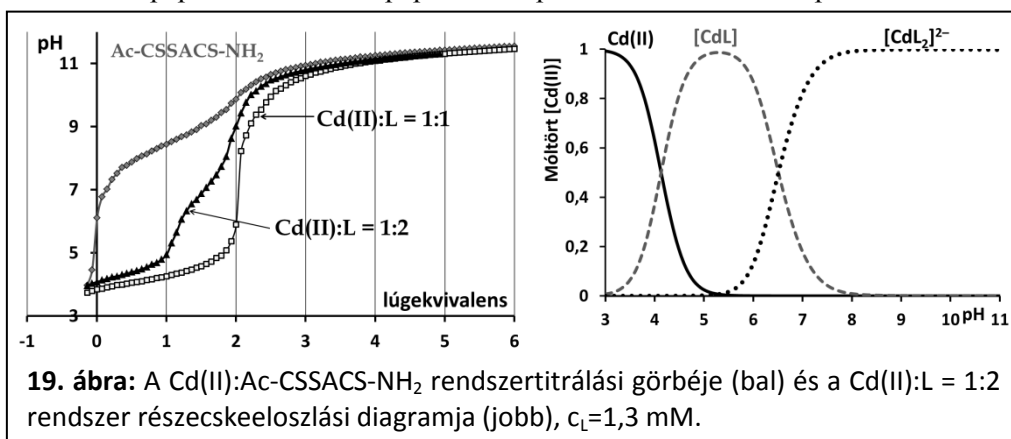
4.2.2. A kadmium(II)komplexek

Az Cd(II)-ligandum rendszerek pH-potenciometriás vizsgálatait mindhárom peptid (Ac-AAAC-NH₂, Ac-SAAC-NH₂ és Ac-CSSACS-NH₂) esetében 1:2 és 1:1 fémion-ligandum arányú oldattal végeztük el. A vizsgálatok során a Cd(II):Ac-AAAC-NH₂ = 1:2 és 1:1 rendszerek esetén is csapadék vált le 6,0-os pH felett. A Cd(II):Ac-SAAC-NH₂ rendszer esetén csak ekvimoláris oldatban képződött csapadék (pH > 9,0 felett). A Cd(II):Ac-CSSACS-NH₂ = 1:2 és 1:1 arányú rendszerek vizsgálata során nem tapasztaltunk csapadékképződést. Az Ac-AAAC-NH₂, az Ac-SAAC-NH₂ és az Ac-CSSACS-NH₂ peptidek Cd(II)-ionnal minden esetben képeznek biszkomplexeiket (12. táblázat), de ezen ligandumok kadmium(II)-komplexeinek koordinációs módja eltér a kén donoratomok száma miatt.

12. táblázat: A peptidek Cd(II)komplexeinek stabilitási állandói ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,20\text{ M KNO}_3$).

| Peptid sorszáma | | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. |
|--|--|-------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| lgβ | | Ac-AAAC-NH ₂ | Ac-SAAC-NH ₂ | Ac-CSSACS-NH ₂ | Ac-CGAK-NH ₂ [143] | Ac-CGAH-NH ₂ [143] |
| 1., 2., 4., 5. | 3. | | | | 15,67 | 12,32 |
| [CdLH] [CdL] | [CdL] [CdH ₁ L] ⁻ | | | 11,47(3) 0,83(5) | | 6,22 |
| [CdH ₂ L ₂] [CdHL ₂] | | | | | 31,79 22,90 | 19,41 |
| [CdL ₂] [CdH ₁ L ₂] ⁻ | [CdL ₂] ²⁻ | 11,71(3) | 11,72(2) 0,97(3) | 18,6(1) | 12,86 2,31 | 12,62 2,28 |

Az Ac-AAAC-NH₂ esetében csak biszkomplexek képződését mutattuk ki, ahol a fémionhoz két peptid cisztein tiolátcsoportjai koordinálnak. Hasonló eredmények figyelhetők meg az Ac-SAAC-NH₂ peptid esetében is, ahol szintén egy donorcsoport található a ligandumban. Ám ebben az esetben kialakul a vegyes hidroxido részecske is, vagyis a [CdHL₁L₂]⁻, majd a pH további emelésével egy kadmium(II)-hidroxid csapadék válik le. Az Ac-CSSACS-NH₂ N-terminálison védett hexapeptid az előző két peptidhez képest két tiolát donorcsoportot tartalmaz.



A keletkező komplexek sztöchiometriája megegyezik az előzőekkel. A másik két ligandumhoz hasonlóan megjelent a [CdL₂]²⁻ biszkomplex, ahol két ligandum két-két kén donoratomja kötődik a fémionhoz (**19. ábra**). Az Ac-SAAC-NH₂-hoz hasonlóan kialakul a vegyes hidroxidokomplex, ám ez a részecske csak igen nagy pH-n jelenik meg. Emellett ebben az esetben monokomplex képződését is kimutattuk, melyben egy ligandum kétfogúan, a két tiolátcsoporton keresztül koordinálja a fémiont.

Jancsó Attila és munkatársai vizsgálták az N-terminálisan védett -CXXC- motívumú Ac-DCSSCY-NH₂ peptid Cd(II)-ionnal alkotott rendszerét [144]. Megállapították, hogy a mono- és biszkomplexek mellett kétmagvú komplexek is kialakulnak. A [CdHL]⁻ komplexben mindkét tiolátcsoport és az aszparaginsav β-karboxilát csoportja is koordinálódik a Cd(II)-ionhoz, a tirozin fenolos -OH csoportja pedig protonált marad a protonált részecskében [144]. Az aszparaginsav oldallánca már deprotonált formában van a komplexképződés pH-tartományában, de a Cd(II) + [HL]³⁻ = [CdHL]⁻ folyamat számolt stabilitási állandójának értéke (lgK = 12,56)

alátámasztja a β -karboxilát csoport részvételét. Ez az érték közel megegyezik a (γ -GluCys)₂-Gly peptid {CdS₂O₂} koordinációs módú komplexének számolt $\log K_1^{+H} = 12,57$ értékével [145], és szignifikánsan nagyobb, mint a csak két tiolátcsoporton keresztül koordinált Ac-CSSACS-NH₂ hexapeptid monokomplexének $\lg K = 11,47$ értéke.

Összevetve az egy-, illetve két ciszteint tartalmazó Ac-AAAC-NH₂ és az Ac-CSSACS-NH₂ ligandumok Cd(II)-ionnal alkotott rendszereinek spektrális adatait és stabilitási állandóit, egyértelműen látszik, hogy a koordinációban részt vevő kén donoratomok számának növekedésével nő a komplex stabilitása (13. táblázat).

13. táblázat: A peptidek Cd(II)-komplexeinek spektrális adatai ($T = 298K$).

| | Ac-SAAC-NH ₂ | | Ac-AAAC-NH ₂ | | Ac-CSSACS-NH ₂ | | Ac-DAAC-NH ₂ [146] | |
|------------------|-------------------------|---|-------------------------|---|---------------------------|---|----------------------------------|---|
| | λ_{\max} nm | ϵ M ⁻¹ · cm ⁻¹ | λ_{\max} nm | ϵ M ⁻¹ · cm ⁻¹ | λ_{\max} nm | ϵ M ⁻¹ · cm ⁻¹ | λ_{\max} nm | ϵ M ⁻¹ · cm ⁻¹ |
| CdL | | | | | 250 | 10000 | 216 | 4000 |
| CdL ₂ | 245 | 9500 | 220 | 8300 | 241 | 25000 | 216 | 10000 |

Korábban számos tiolátcsoportot tartalmazó ligandum Cd(II)-komplexeinek UV spektroszkópiás vizsgálatát végezték el, és megállapították, hogy a Cd(II)-ionhoz koordinálódó S-donoratomok számának növekedésével a moláris abszorpciós koefficiens értéke jelentős mértékben növekszik. Az irodalomból ismert Cd(II):Ac-DAAC-NH₂ rendszerben szintén megjelenik a monokomplex, melyben a koordinációs mód (S⁻,O⁻), vagyis a komplexben egy kén donoratom található, a biszkomplexben, vagyis a [CdL₂]²⁻ részecske koordinációs szférájában pedig két kén donoratom található. Ennek megfelelően az adott részecskékhez tartozó moláris abszorpciós koefficiens 4000 és 10000 M⁻¹cm⁻¹ [146].

Az Ac-SAAC-NH₂ és az Ac-AAAC-NH₂ Cd(II)-tartalmú rendszereiben a biszkomplexekben a Cd(II)-ionhoz két ligandum egy-egy tiolátcsoporton keresztül koordinálódik, vagyis két tiolátcsoport található a koordinációs szférában, ami összhangban van a moláris abszorpciós koefficiens értékekkel (9500 és 8300 M⁻¹cm⁻¹), ami a fentiek alapján a két tiolátcsoport kénatomjának koordinációját támasztja alá.

Az Ac-CSSACS-NH₂:Cd(II) rendszer esetében a [CdL] komplexben a fémionhoz a peptid kétfogú koordinációval kötődik, amit alátámaszt a 250 nm hullámhosszon lévő abszorpciós maximumhoz tartozó 10000 M⁻¹cm⁻¹ érték. A [CdL₂]²⁻ komplexben, ahol két peptid két-két tiolátcsoporton keresztül kötődik a fémionhoz, az abszorpciós maximum eltolódik 241 nm hullámhosszra. Ekkor a biszkomplex moláris abszorpciós koefficiens értéke 25000 M⁻¹cm⁻¹, ami a korábbi adatok alapján megfelel a négy kén donoratomb koordinációjának [147].

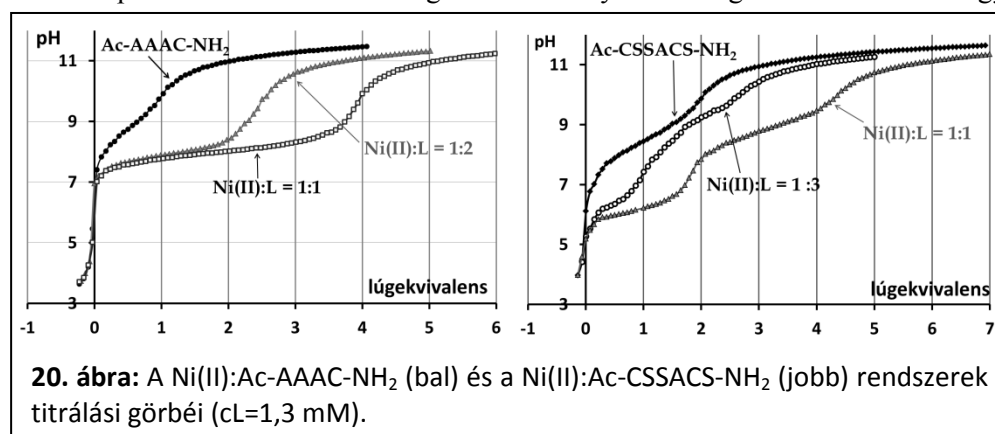
4.2.3. A nikkell(II)komplexek

Az Ac-AAAC-NH₂, az Ac-SAAC-NH₂ és az Ac-CSSACS-NH₂ ligandumok esetében a nikkell(II)ion számára a kén donoratom a fő kötőhely, kialakítva a NiL komplexet. A pH emelésével átfedő lépésben kettő, majd még nagyobb pH-n a harmadik amidnitrogén is deprotonálódik kialakítva az NiH₂L és NiH₃L komplexeket (14. táblázat). A pH-potenciometriás és spektroszkópiás vizsgálatok pH-tartományában (~11,0-es pH-ig) csapadék megjelenését nem tapasztaltuk.

14. táblázat: A peptidek nikkell(II)komplexeinek stabilitási állandói ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,20\text{ M KNO}_3$, ill. KCl a 4. és 5. esetben).

| Peptid sorszama | | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. |
|--|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| lgβ | | Ac-AAAC-NH ₂ | Ac-SAAC-NH ₂ | Ac-CSSACS-NH ₂ | Ac-CGAK-NH ₂ [143] | Ac-CGAH-NH ₂ [143] |
| 1., 2., 4., 5. | 3. | | | | | |
| [NiHL] ²⁺ | [NiL] | | | 7,54(4) | 14,36 | 4,44 |
| [NiL] ⁺ | [NiH ₂ L] ²⁻ | 3,3(1) | -12,01(9) | -9,85(6) | -11,44 | -11,80 |
| [NiH ₂ L] ⁻ | [NiH ₃ L] ³⁻ | -11,73(2) | -19,36(2) | -20,99(7) | -22,24 | -20,77 |
| [NiH ₃ L] ²⁻ | | -19,83(2) | | | 28,15 | |
| [NiH ₂ L ₂] ²⁺ | | | | | | 7,86 |
| [NiL ₂] | | | | | | 8,12 |
| pK amid _{1,2} | | 7,52 | | 8,70 | | 8,12 |
| pK amid ₃ | | 8,10 | 7,35 | 11,14 | 10,80 | 8,97 |

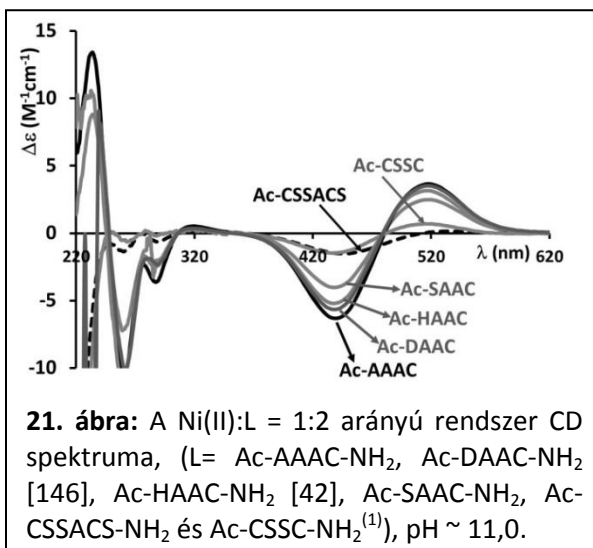
Az amidnitrogének deprotonálódását befolyásolja a koordinációra képes donorcsoportok száma és minősége is. Amennyiben a ligandum tartalmaz egy



második donorcsoportot is, úgy az amidnitrogének deprotonálódása nagyobb pH-n játszódik le, mint abban az esetben, ha a peptid csak egy tiolátcsoporttal rendelkezik

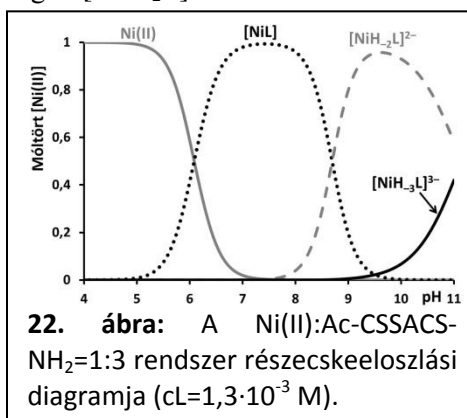
(20. ábra). A kialakuló komplexek összetételében nincs eltérés, ám a koordinációs módokban vannak különbségek.

A nikkell-komplexek koordinációs módjainak megállapításához CD-spektroszkópiás vizsgálatokat végeztünk. A detektált CD spektrumokat összevetettük a korábban már vizsgált egy- és két ciszteint tartalmazó peptidek 11,0-es pH felett, Ni(II)-ligandum = 1:2 arányú oldataiban detektált CD



21. ábra: A Ni(II):L = 1:2 arányú rendszer CD spektruma, (L= Ac-AAAC-NH₂, Ac-DAAC-NH₂ [146], Ac-HAAC-NH₂ [42], Ac-SAAC-NH₂, Ac-CSSACS-NH₂ és Ac-CSSC-NH₂⁽¹⁾), pH ~ 11,0.

spektrumaival (21. ábra). Az Ac-AAAC-NH₂, az Ac-DAAC-NH₂ [146], az Ac-HAAC-NH₂ [42] és az Ac-SAAC-NH₂ ligandumokban ezen a pH-n a fémionhoz a peptid a (S⁻,N⁻,N⁻,N⁻) donor csoportokon keresztül koordinálódik. Ezzel szemben az Ac-CSSACS-NH₂ esetében 11,0-es pH-n még a [NiH₂L]²⁻ az uralkodó részecske (22. ábra), melyben a koordinációs mód hasonlóan az Ac-CSSC-NH₂ peptidhez¹: (S⁻,N⁻,N⁻,S⁻). Vagyis a másik öt ligandummal ellenben, ezen a pH-n nem egy, hanem két cisztein koordinálódik a nikkell(II)ionhoz. A pH emelésével (~11,5-ös pH körül) a harmadik amidnitrogén is deprotonálódik és



22. ábra: A Ni(II):Ac-CSSACS-NH₂=1:3 rendszer részecskeeloszlási diagramja (cL=1,3·10⁻³ M).

kiszorul a koordinációs szférából a C-terminálistól távolabbi kén donortatom, a peptid a nikkell(II)ionhoz a (S⁻,N⁻,N⁻,N⁻) donor csoportokkal kötődik. Ezt támasztják alá az amidnitrogének pK értékei (14. táblázat). Az Ac-CSSACS-NH₂ peptid harmadik amidnitrogénjéhez tartozó pK érték 11,14; ami kb. három lg egységgel

¹ Lukács Márton eredménye, még nem közölt adat.

nagyobb, mint az Ac-AAAC-NH₂, az Ac-SAAC-NH₂ és az Ac-DAAC-NH₂ esetében, ahol már 9,0-es pH felett a NiH₃L az uralkodó részecske.

4.2.4. A cink(II)komplexek

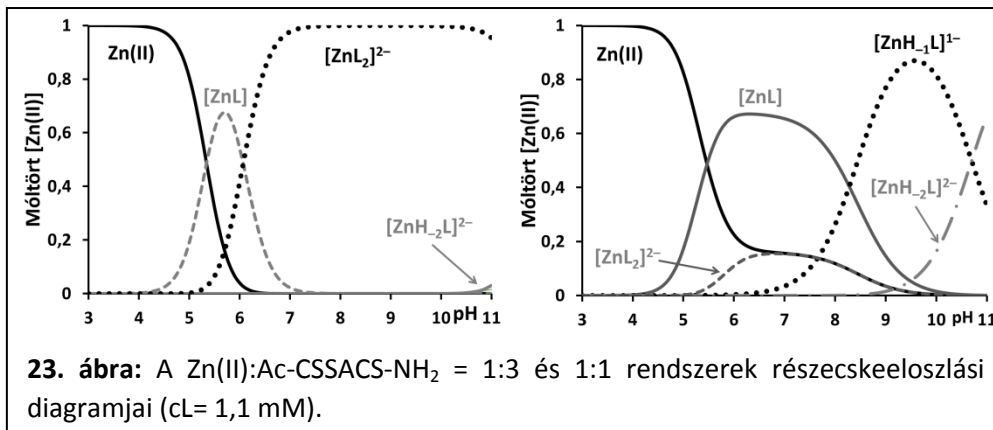
A Zn(II):Ac-AAAC-NH₂ és a Zn(II):Ac-CSSACS-NH₂ rendszerek 1:2 és 1:1 fémion-ligandum arányú pH-potenciometriás vizsgálatait is elvégeztük. Míg a Zn(II):Ac-AAAC-NH₂ = 1:1 arányú rendszer esetén pH ~7,0 körül csapadék vált le, addig a Zn(II):Ac-CSSACS-NH₂ = 1:1 összetételű rendszer esetén csapadékképződést nem tapasztaltunk. Ligandumfelesleget tartalmazó oldatok titrálásakor egyik rendszer esetében sem volt csapadékképződés. Az eddig vizsgált fémionokkal ellenben a cink(II)ion esetében nagyobb eltérést tapasztaltunk az egy és két ciszteint tartalmazó ligandumok komplexképződése során (15. táblázat).

15. táblázat: A peptidek cink(II)komplexeinek stabilitási állandói ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,20\text{ M KNO}_3$, illetve KCl a 3., 4. és 5. ligandum esetén).

| lgβ | | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. |
|---|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1., 3., 4., 5. | 2. | Ac- AAAC- NH ₂ | Ac- CSSAC S-NH ₂ | Ac- SAAC- NH ₂ ² | Ac- CGAK- NH ₂ [143] | Ac- CGAH- NH ₂ [143] |
| [MHL] ²⁺ | [ML] | | 9,16(1) | | | 11,60 |
| [MH ₂ L ₂] ²⁺ | | | | | 22,60 | |
| [MHL ₂] ⁺ | | | | | 21,35 | 18,94 |
| [ML ₂] | [ML ₂] ²⁻ | 9,55(5) | 17,07(8) | 9,75 | | 12,44 |
| [ML ₃] ⁻ | | 13,9(1) | | | | |
| [MH ₁ L ₂] ⁻ | | | | 1,72 | 1,16 | 3,57 |
| [MH ₂ L ₂] ²⁻ | | | | -8,70 | | |
| | [MH ₁ L] ⁻ | | 0,88(4) | | | |
| | [MH ₂ L] ²⁻ | | -9,82(4) | | | |
| [MH ₁ L ₃] | | 4,87(9) | | | | |

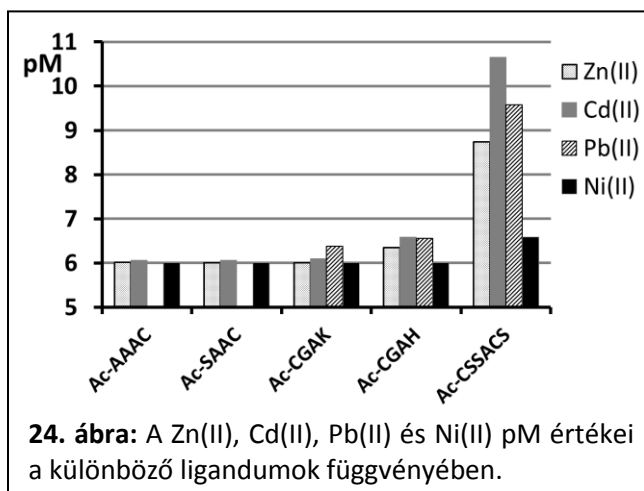
Az Ac-CSSACS-NH₂ esetében kialakul a ZnL komplex, ahol egy tiolátcsoport koordinálja a fémiont, a pH növelésével kialakul a trisz-, valamint biszkomplex is, majd nagyobb pH-n a vegyes hidroxidokomplexek képződnek (23. ábra).

² Lukács Márton eredménye, még nem közölt adat.



Összehasonlítva az Pb(II)-, Ni(II)-, Zn(II)- és Cd(II)-ion Ac-AAAC-NH₂, Ac-SAAC-NH₂, Ac-CGAK-NH₂, Ac-CGAH-NH₂, és az Ac-CSSACS-NH₂ ligandummal alkotott rendszereinek pH=7,4-en számolt pM értékeit³ (c_L=1,0 · 10⁻⁵ M, c_M=1,0 · 10⁻⁶ M), az egy ciszteint tartalmazó ligandumok nem mutatnak szelektivitást egyik fémionra nézve sem, pM értékük minden esetben közel 6,0 (**24. ábra**).

A hexapeptid esetén a különböző fémionoknál jelentősebb eltérés van a pM értékekben: a Cd(II)- és Pb(II)-ion pM értéke jelentősen nagyobb, mint a másik két fémion pM-értéke, de így se mondhatjuk a peptidet egyértelműen szelektívnek



az adott fémionra. Nemcsak a ligandumon belül van eltérés a különböző fémionok pM értéke között, de a többi, egy kén donoratomot tartalmazó ligandumhoz viszonyítva az Ac-CSSACS-NH₂ jelentősebb fémionmegkötő képességgel bír (**24. ábra**).

³ A Zn(II) : Ac-SAAC-NH₂ rendszerhez tartozó adatok Lukács Márton eredményei.

4.3. N-terminálisan nem védett, két ciszteint tartalmazó peptidek

A CSSACS-NH₂ és az ACSSACS-NH₂ ligandumok sav-bázis folyamatait korábban már tanulmányozták [43], és a kapott eredmények alapján megállapították, hogy a csoportok deprotonálódása az alábbi sorrendet követi: $pK(\text{NH}_3^+) < pK(\text{N-terminális Cys}) < pK(\text{C-terminális Cys})$. Hasonló következtetéseket vontunk le az SSCSSACS-NH₂ ligandum képződési állandóiból és pK értékeiből (16. táblázat).

16. táblázat: A ligandumok protonálódási ($\lg\beta$) és deprotonálódási (pK) állandói ($T = 298 \text{ K}$, $I = 0,20 \text{ M KNO}_3$ és KCl).

| | CSSACS-NH ₂ | | ACSSACS-NH ₂ | SSCSSACS-NH ₂ |
|----------------------------------|------------------------|------------------|-------------------------|--------------------------|
| | KCl | KNO ₃ | KNO ₃ | KNO ₃ |
| $\lg\beta(\text{HL}^-)$ | 9,08(1) | 9,08(1) | 8,96(1) | 8,83(1) |
| $\lg\beta(\text{H}_2\text{L})$ | 17,21(1) | 17,32(1) | 17,19(1) | 16,89(1) |
| $\lg\beta(\text{H}_3\text{L}^+)$ | 23,62(2) | 23,83(1) | 24,74(1) | 23,73(1) |
| $pK_1(\text{NH}_3^+)$ | 6,41(2) | 6,51(1) | 7,55(1) | 6,84(1) |
| $pK_2(\text{SH})$ | 8,13(1) | 8,24(7) | 8,23(1) | 8,06(1) |
| $pK_3(\text{SH})$ | 9,08(1) | 9,08(1) | 8,96(1) | 8,83(1) |

A 7 körüli pK érték főleg az ammóniumcsoport deprotonálódásához tartozik, míg a két cisztein oldalláncának tiolátcsoportjaihoz nagyobb pK értékek tartoznak. Ezen felvetéseket a ligandumok ¹H NMR spektrumainak segítségével bizonyítottuk. Hasonlóan a másik két peptidhez az ammónium- és tiolátcsoportok deprotonálódási folyamatai átfedő lépésben zajlanak, de a mikrokonstansok kiszámolása nem lehetséges a cisztein és a szerin metilén, illetve metin csoportjainak jelentős átfedése miatt. Másrészt a ligandumok első pK értékeinek sorrendje az alábbiak szerint alakul: $pK_1(\text{CSSACS-NH}_2) < pK_1(\text{SSCSSACS-NH}_2) < pK_1(\text{ACSSACS-NH}_2)$. A CSSACS-NH₂ pK_1 értéke jelentősen kisebb, mint a másik két peptidé, ami a tiolát- és terminális aminocsoport intramolekuláris kölcsönhatásának köszönhető. A terminális aminocsoport és a cisztein oldallánca közötti távolság növelése magyarázatot ad az ACSSACS-NH₂ nagyobb pK_1 értékére. Hasonló trend figyelhető meg a CysGly [82] ($pK_2 = 6,89$) és az AlaCys [148] ($pK_2 = 7,96$) pK_2 értékei között. Az AlaCys és az AlaAlaCys [148] ($pK_2 = 7,97$) pK_2 értékei hasonlóak egymáshoz, ellentétben az ACSSACS-NH₂ és SSCSSACS-NH₂ pK_1 értékeivel. A különbséget a jelenleg tanulmányozott ligandumok terminális aminocsoportjának deprotonálódási

folyamataiban az SSCSSACS-NH₂ molekula N-terminális szeril oldalláncának -OH csoportja okozza. A terminális aminocsoport és az N-terminális szeril -OH csoportja közötti kölcsönhatás lecsökkenti a pK(NH₃⁺) értékét. Hasonló hatást figyeltek meg a szerin oldalláncoknál a triszerin és a tetraalanin összehasonlítása során (SSS [149]: pK(NH₃⁺) = 7,13 és AAAA [150]: pK(NH₃⁺) = 8,13), illetve a patkány amilin fragmense és annak mutánsai esetében [149] (SSNN-NH₂: pK(NH₃⁺) = 6,99; SSAA-NH₂: pK(NH₃⁺) = 7,11 és AANN-NH₂: pK(NH₃⁺) = 7,86). A hasonló pK₂ és pK₃ értékeket az eredményezi, hogy a ciszteinek környezete azonos mindhárom peptidben.

4.3.1. A CSSACS-NH₂ peptid

4.3.1.1. A ligandum Pb(II)-komplexei

Az Pb(II):CSSACS-NH₂ rendszer 1:2 és 1:1 arányú pH-potenciometriás vizsgálatát is elvégeztük, mely során nem történt csapadékképződés sem az 1:1, sem az 1:2 fémion-ligandum arányú rendszerek titrálása során. A CSSACS-NH₂ ólom(II)komplexeinek sztöchiometriai és stabilitási állandóit a 17. táblázatban gyűjtöttem össze, összehasonlításképpen kiegészítve ugyanezen ligandum kadmium(II)- és cink(II)komplexeinek, illetve a CysGly ligandum ólom(II)komplexeinek adataival.

17. táblázat: A CSSACS-NH₂ Pb(II)-, Cd(II)- és Zn(II)komplexeinek, valamint a CysGly Pb(II)komplexének stabilitási állandói (T = 298 K, I = 0,20 M KNO₃ (Pb(II) és Cd(II) esetében), és 0,20 M KCl (Zn(II) esetében).

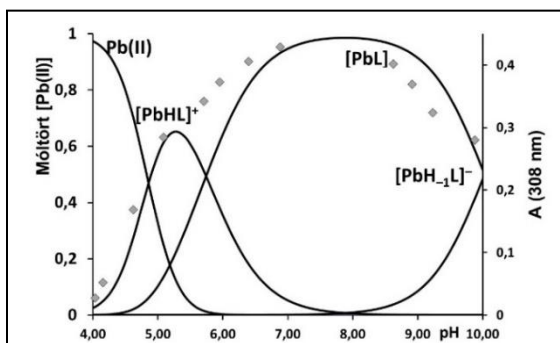
| lgβ | CSSACS-NH ₂ | | | CysGly[82] |
|-----------------------------------|------------------------|------------|------------|------------|
| | Pb(II) | Cd(II)[43] | Zn(II)[43] | Pb(II) |
| [MH ₂ L] ²⁺ | | | | 17,96 |
| [MHL] ⁺ | 18,57(4) | 18,87 | 16,79 | 13,78 |
| [ML] | 12,83(7) | 14,38 | 12,02 | 10,40 |
| [MH ₋₁ L] ⁻ | 2,8(1) | 3,20 | 2,99 | 2,32 |
| [MH ₂ L ₂] | | | | 28,46 |
| [MHL ₂] ⁻ | | | | 23,26 |
| [ML ₂] ²⁻ | | | | 15,96 |
| [ML ₃] ⁴⁻ | | | | 19,0 |
| pK(MHL/ML) | 5,74 | 4,49 | 4,77 | 3,38 |
| pK(ML/MH ₋₁ L) | 10,0 | 11,18 | 9,03 | 8,08 |

Jól látható ezekből az adatokból, hogy a három fémion esetében a komplexek sztöchiometriája hasonló és azok stabilitása a $\text{Cd(II)} > \text{Pb(II)} > \text{Zn(II)}$ sorrendet követik. Csak 1:1 fémion-ligandum összetételű komplexek képződnek és a fiziológias pH körül ($\text{pH} \sim 6 - 8$) az $[\text{ML}]$ komplex a meghatározó.

Mindhárom fémion esetében a molekula N-terminális része a fő kötőhely. Az $[\text{MHL}]^+$ komplexben az aminocsoport és az N-terminális cisztein tiolátcsoportja koordinálódik az ólom(II)ionhoz, a másik, C-terminálishoz közeli tiolátcsoport még protonált formában van jelen. Korábban, a CysGly ligandum $[\text{PbHL}]^+$ komplexében is azonos koordinációs módot bizonyítottak, ahol szintén (N,S) donoratombok kötik a fémiont és a karboxilcsoport még protonált alakban van. Mindkét esetben a $\lg K(\text{M} + \text{HL})$ érték megbecsülhető a CSSACS-NH_2 esetében a $\lg \beta(\text{MHL}) - \text{pK}(\text{SH}(\text{átl}))$ ($18,57 - 8,66 = 9,91$) és a CysGly esetében a $\lg \beta(\text{MHL}) - \text{pK}(\text{COOH})$ ($13,78 - 3,17 = 10,61$) érték kiszámolásával. Figyelembe véve ezeknek a molekuláknak a jelentős méretbeli különbségeit, ezek az értékek jó egyezésben állnak egymással. Az $[\text{PbHL}]^+$ komplex deprotonálódása eredményezi az $[\text{PbL}]$ komplex kialakulását, és ez a folyamatot $\text{pK} = 5,74$ -en jellemzi. Ez az érték kisebb, mint a szabad ligandum pK értéke, de kb. egy log egységgel nagyobb, mint a Zn(II) - és Cd(II) - komplexekre jellemző pK értékek. Ez azt jelenti, hogy a ligandum koordinációja mindhárom fémion esetében háromfogú, de a C-terminális tiolátcsoport stabilizáló hatása az ólom(II)ion esetében a legkisebb.

A CSSACS-NH_2 ligandum $[\text{PbL}]$ komplexének a CysGly $[\text{PbL}]$ komplexéhez képest nagyobb stabilitása is alátámasztja a CSSACS-NH_2 molekula harmadik donorcsoportjának koordinációját.

Ráadásul az ólom(II)komplexben lévő $(\text{NH}_2, \text{S}^-, \text{S}^-)$ koordináció akadályozza az $[\text{PbL}]$ részecskék



25. ábra: Az $\text{Pb(II)}:\text{CSSACS-NH}_2 = 1:2$ arányú rendszer komplexeinek koncentráció eloszlási görbéje (egyenés vonal) és a 308 nm hullámhosszon lévő abszorpciós értékek adott pH-kon ($\text{cL}=0,2 \text{ mM}$).

hidrolízisét, egyes hidroxidokomplex csak $\text{pH} > 9$ felett alakulnak ki, és csapadék megjelenését sem figyeltük meg a vizsgált pH tartományában (**25. ábra**).

Továbbá a C-terminális tiolátcsoport koordinációjának stabilizáló hatását igazolja, hogy a CysGly esetében az $[\text{PbL}]$ komplexben kisebb a $\text{p}K(\text{hidrolízis}) = \text{p}K(\text{ML}/\text{MH}_1\text{L})$ érték.

A komplexek kialakulása UV spektroszkópiával is követhető. A ligandum tiolcsoportjának deprotonálódási folyamata egy nagyon intenzív ($\epsilon \sim 10000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 230 és 240 nm hullámhossz között megjelenő sávval társul. A tiolátcsoport ólom(II)ionhoz való koordinációja során egy új abszorpciós sáv jelenik meg 290-330 nm hullámhossz tartományban. Az 1:2 és 1:1 fémion-ligandum aránynál felvett Pb(II):CSSACS-NH₂ rendszer pH-függő spektrumsorozatai nagyon hasonlítanak egymáshoz, mely azt támasztja alá, hogy ugyanolyan komplexek keletkeznek ekvimoláris oldat esetén, mint ligandumfelesleg alkalmazása során. Ez egyezik azzal a ténnyel, hogy a titrálás során még a ligandumfelesleget tartalmazó oldat esetén sem tudtuk kimutatni a biszkomplexeiket. Ezen spektrumok adott komplexekhez tartozó λ_{max} és ϵ értékeit az 18. táblázatban gyűjtöttük össze. Összehasonlításképpen feltüntettem a korábban már bemutatott Ac-Cys és Ac-Pen ligandumok ólom(II)komplexeinek spektrális adatait.

18. táblázat: Tiol funkciós csoportot tartalmazó ligandumok ólom(II)komplexeinek spektroszkópiás adatai ($x = 0 - 2$)

| | CSSACS-NH ₂ | | Ac-Cys | | Ac-Pen | |
|---------------------------|--------------------------------|---|--------------------------------|---|--------------------------------|---|
| | λ_{max} (nm) | ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) | λ_{max} (nm) | ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) | λ_{max} (nm) | ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) |
| $[\text{MHL}]^+$ | 293 | 3000 | | | | |
| $[\text{ML}]$ | 306 | 4000 | 276 | 2400 | 277 | 2800 |
| $[\text{MH}_x\text{L}_2]$ | | | 309 | 2600 | 313 | 2200 |

Az $[\text{PbHL}]^+$ részecske λ_{max} értéke 293 nm, ami megfelel az egy tiolátcsoport kötődésnek. Hasonlóan egy tiolát donoratom köti meg a fémiont az Ac-Cys és az Ac-Pen $[\text{PbL}]$ komplexeiben [82], és a jellemző λ_{max} érték ezekben a komplexekben a 276 nm és 277 nm hullámhossz. Több tiolátcsoport koordinációja az abszorpciós maximum értékét általában a nagyobb hullámhossz felé tolja, ami látható az Ac-Cys és az Ac-Pen $[\text{PbL}_2]^{2-}$ komplexeiből. A CSSACS-NH₂ ligandum $[\text{PbL}]$

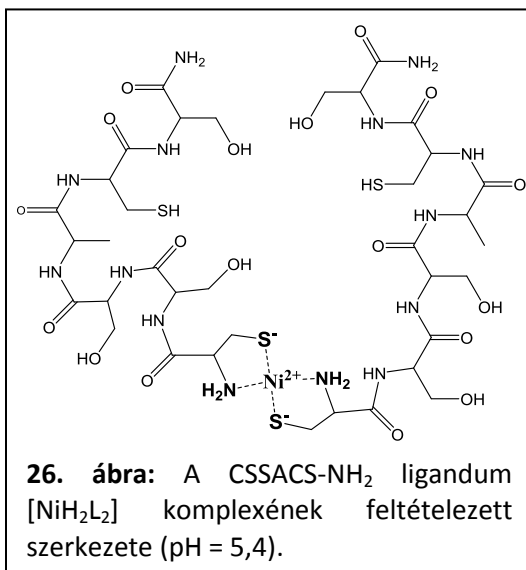
komplexének esetében hasonló eltolódást figyelhetünk meg annak köszönhetően, hogy két kén donoratom van a koordinációs szférában.

Másrészről az $\text{Pb(II)-CSSACS-NH}_2 = 1:1$ arányú oldatának $^1\text{H NMR}$ vizsgálata alátámasztja a ligandum háromfogú koordinációját. A szabad ligandum és annak Pb(II) -iont tartalmazó rendszerének $^1\text{H NMR}$ spektrumait $\text{pH} = 7,90$ -n detektáltuk. Az ólom(II)iont tartalmazó rendszer jelei kiszélesedtek, ellentétben a csak ligandumot tartalmazó minta jeleitől, ami bizonyítja a komplexképződést, valamint az $\text{CH}_3(\text{Ala})$ dublett jelének csekély változása és a két $\text{CH}_2(\text{Cys})$ jelének drasztikus változása alátámasztja, hogy mindkét tiolátcsoport koordinálódik az $[\text{PbL}]$ komplexben.

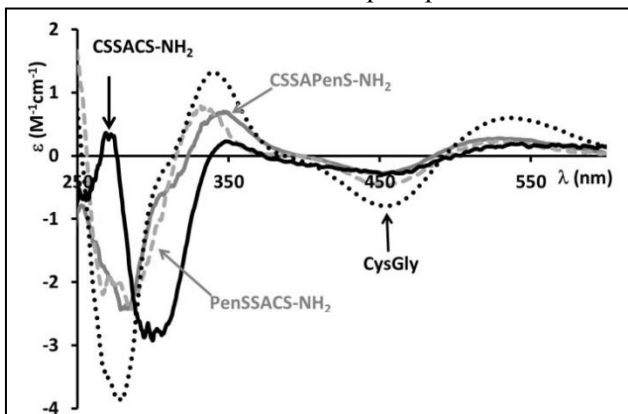
4.3.1.2. A ligandum Ni(II)-komplexei

A $\text{Ni(II)-CSSACS-NH}_2$ 1:2 arányú rendszer titrálása során már 6,0-os és 7,0-es pH között csapadék vált le, így a kiértékelés során egyetlen komplex, a $[\text{NiH}_2\text{L}_2]$ részecske stabilitási állandóját tudtuk meghatározni, melynek értéke: 33,22(1). ($T = 298 \text{ K}$, $I = 0,20 \text{ M KCl}$). Az 1:1 fémion-ligandum arányú rendszer pH -potenciometriás vizsgálatát nem végeztük el.

Az irodalomban található CSSA-Pen-S-NH_2 és Pen-SSACS-NH_2 ligandumok nikkell(II)-rendszereit a teljes pH -tartományon lehetett vizsgálni pH -potenciometriásan, így ezen ligandumok esetén a keletkező komplexek összetétele igen változatos. A $[\text{NiH}_2\text{L}_2]$ komplexek stabilitási állandói jó egyezésben állnak a CSSACS-NH_2 ligandum $[\text{NiH}_2\text{L}_2]$ komplexének stabilitási állandójával ($\lg\beta(\text{CSSA-Pen-S-NH}_2)$: 33,46 és $\lg\beta(\text{Pen-SSACS-NH}_2)$: 34,95 [151], ám látható, hogy az N-terminális penicillaminnak



stabilizáló szerepe van. A **26. ábrán** látható $[\text{MH}_2\text{L}_2]$ összetételű biszkomplexben a fémion számára a fő kötőhely az N-terminális amino- és tiolátcsoport. Ez a komplex mindhárom ligandum esetében a fiziológias pH körül (6,0-8,0 pH) alakul ki, míg a C-terminális közelében tiolcsoport protonált formában van. A biszkomplexben egy



27. ábra: A Ni(II)-ion CSSACS-NH₂, a CSSAPenS-NH₂ [151], a PenSSACS-NH₂ [151] és a CysGly [152] ligandumokkal alkotott 1:2 arányú rendszereinek CD-spektrumai (pH ~ 5,5).

Ni(II)-ionhoz két ligandum koordinálódik $2\text{X}(\text{NH}_2, \text{S}^-)$ kötésmóddal, így a nikkell koordinációs szférája telítette válik. Ezt a koordinációs módot a CD-spektroszkópia egyértelműen alátámasztja. A **27. ábra** az 1:2 fémion-ligandum aránynál 5,0-ös pH körül felvett spektrumot mutatja be, együtt a CysGly [73], CSSA-Pen-S-NH₂ [151] és Pen-SSACS-NH₂ [151] ligandumok nikkell(II)komplexeinek CD-spektrumaival. Látható, hogy a CSSACS-NH₂ ligandum Ni(II)-iont tartalmazó oldatban felvett spektruma jól egyezik a másik három ligandum nikkell(II)komplexeinek CD-spektrumaival.

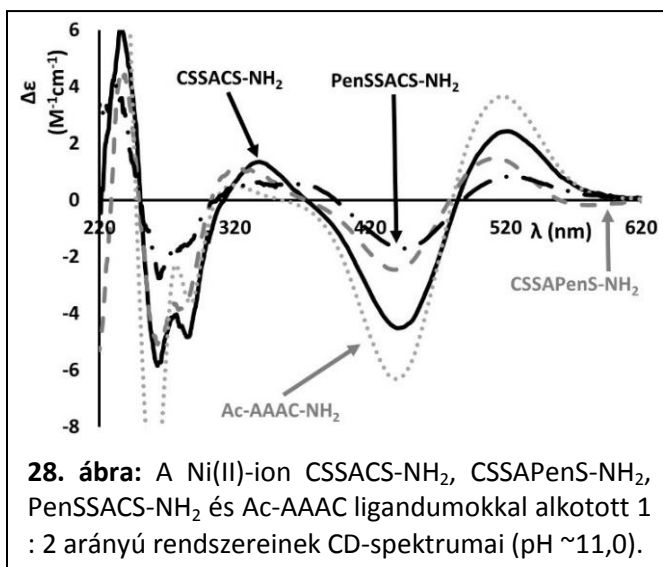
A $\lg K (\text{M}+2\text{HL})$ folyamatra jellemző állandó értéke ($\lg \beta[\text{MH}_2\text{L}_2] - 2 \cdot \lg \beta(\text{HL}) = 15,06$), közel azonos a CysGly $\lg \beta(\text{NiL}_2)$ értékéhez, a 17,77-hez. Ez alátámasztja, hogy a CysGly ligandum $[\text{NiL}_2]$ komplexének koordinációs módja megfelel a CSSACS-NH₂ ligandum $[\text{NiH}_2\text{L}_2]$ komplexének koordinációs módjával, vagyis az $(\text{NH}_2, \text{S}^-)$ kötésmóddal.

A pH-potenciometriás vizsgálatok során pH > 6,0 felett csapadék jelent meg, mely polimer szerkezetű komplexek képződésére utal. Ezt azt jelenti, hogy a polimer szerkezetű komplexek kialakulása a második, vagyis a C-terminális közelében tiolcsoportjának deprotonálódásával párhuzamosan történik. A kialakult csapadék miatt a lúgos pH-tartományban keletkező komplexek pontos összetételét, és azok stabilitási állandóit meghatározni nem tudtuk, mivel az függ a fémion-ligandum aránytól, a minta koncentrációjától és a pH-tól is. A CD-spektroszkópiás

vizsgálatok lehetőséget adtak a kis mennyiségben keletkező monokomplexek szerkezetének megadására.

A CD-spektroszkópiás vizsgálatok elvégzéséhez a keletkezett csapadékot leszűrtük, de a visszamaradó, tiszta oldat továbbra is színes maradt. Ez arra utal, hogy kis koncentrációban keletkeztek monomer összetételű komplexek is, így ~11,0-es pH-n az ~5,0 pH-n felvett spektrumokhoz képest jelentősen eltérő CD-spektrumokat kaptunk.

A ~11,0 pH-n felvett Ni(II)-CSSACS-NH₂ rendszer CD-spektrumai jó egyezést mutatnak a szintén ~11,0 pH-n felvett CSSA-Pen-S-NH₂, a Pen-SSACS-NH₂ és az Ac-AAAC-NH₂ ligandumok Ni(II)-ionnal alkotott komplexeinek CD-spektrumaival (28. ábra).



28. ábra: A Ni(II)-ion CSSACS-NH₂, CSSAPenS-NH₂, PenSSACS-NH₂ és Ac-AAAC ligandumokkal alkotott 1 : 2 arányú rendszereinek CD-spektrumai (pH ~11,0).

Ebből arra következtethetünk, hogy a lúgos pH-tartományban lévő egymagvú komplexekben a fémion a C-terminális részhez kötődik az alábbi koordinációval: (S⁻,N⁻,N⁻,S⁻) vagy (S⁻,N⁻,N⁻,N⁻).

A 19. táblázat adatai szintén a CD-spektrumok hasonlóságát, és így a C-terminális tiolátcsoport és a megelőző amidnitrogének koordinálódását támasztják alá.

19. táblázat: A Ni(II)-ligandum 1:1 arányú rendszereinek spektrális adatai (λ : nm-ben kifejezve és $\Delta\varepsilon$: $M^{-1}cm^{-1}$ -ben kifejezve), (pH ~11,0).

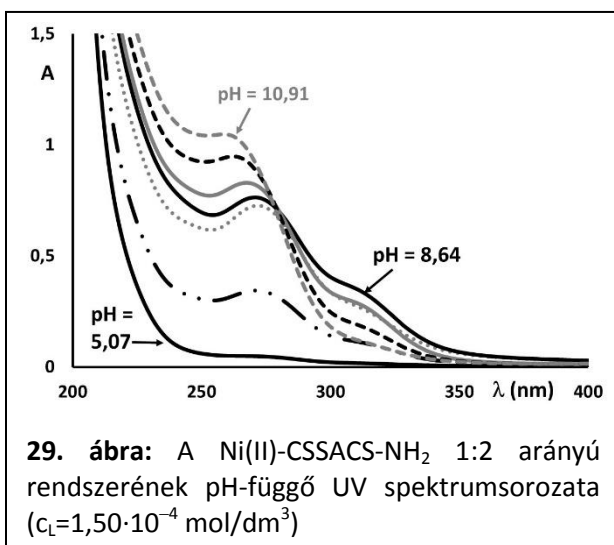
| Ac-AAAC-NH ₂ | | Ac-CSSACS-NH ₂ | | CSSACS-NH ₂ * | | CSSA-Pen-S-NH ₂ | | Pen-SSACS-NH ₂ | |
|-------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|--------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
| λ | $\Delta\varepsilon$ | λ | $\Delta\varepsilon$ | λ | $\Delta\varepsilon$ | λ | $\Delta\varepsilon$ | λ | $\Delta\varepsilon$ |
| 518,0 | +2,15 | 537,0 | +0,09 | 524,5 | +2,72 | 515,0 | +1,22 | 529,0 | +0,58 |
| 438,5 | -3,73 | 444,5 | -0,76 | 444,0 | -5,20 | 439,5 | -2,05 | 445,5 | -1,68 |
| 320 | +0,32 | 334,0 | +0,27 | 337,5 | +1,29 | 334,5 | +1,07 | 331,0 | +0,35 |
| 287 | -2,11 | 283,0 | +0,15 | 284,5 | -4,97 | 282,0 | -3,82 | 288,5 | -0,28 |
| 260,5 | -6,01 | 261,5 | -1,06 | 264,0 | -6,21 | 265,0 | -3,78 | 263,5 | -0,77 |
| 234 | +8,27 | 234,5 | +6,75 | 234,0 | +8,08 | 237,0 | +3,76 | 235,0 | +2,23 |

*A moláris abszorpciós koefficiensek becsült értékek.

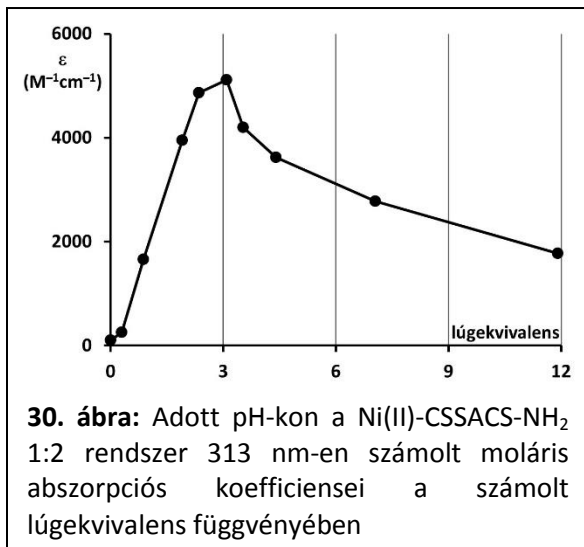
Mivel az UV spektroszkópiás mérések során használt minta a pH-potenciometria során használt mintához képest tízszeres hígítású volt ($c_L=1,50 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³), így ebben az esetben a vizsgált pH-tartományban nem jelent meg csapadék, ezáltal a komplexek kialakulását UV spektroszkópiával is nyomon követtük. A **29. ábrán**

látható Ni(II):CSSACS-NH₂ 1:2 arányú rendszer pH-függő spektrumsorozata. A 313 nm hullámhossznál lévő abszorpciós csúcs maximuma 8,64-es pH-n van.

Az ennél nagyobb pH-n felvett spektrumok abszorbancia értéke lecsökken, és a 271 nm-en lévő abszorpciós maximum



eltolódik 261 nm hullámhossz irányába, mely a komplex szerkezetváltozását igazolja. A 313 nm hullámhosszon leolvasott abszorpciós értékekből számolt moláris abszorpciós koefficiensek értékét ábrázolva a hozzáadott lúg anyagmennyiségének függvényében, egy maximumgörbét kapunk (**30. ábra**).



Ennek maximuma 3 lúgekivalensnél van, ami azt jelenti, hogy a ligandumban mindhárom donorcsoport deprotonálódott formában van jelen. Ez alátámasztja azt a feltételezést, hogy a C-terminális tiolcsoportok deprotonálódásával párhuzamosan a biszkomplexek mellett polimer szerkezetű komplexek is megjelennek,

amelyek a pH emelésével részben monomer komplexekké alakulnak, és a Ni(II)-ion a C-terminális részhez kötődik [153].

4.3.2. Az ACSSACS-NH₂ peptid

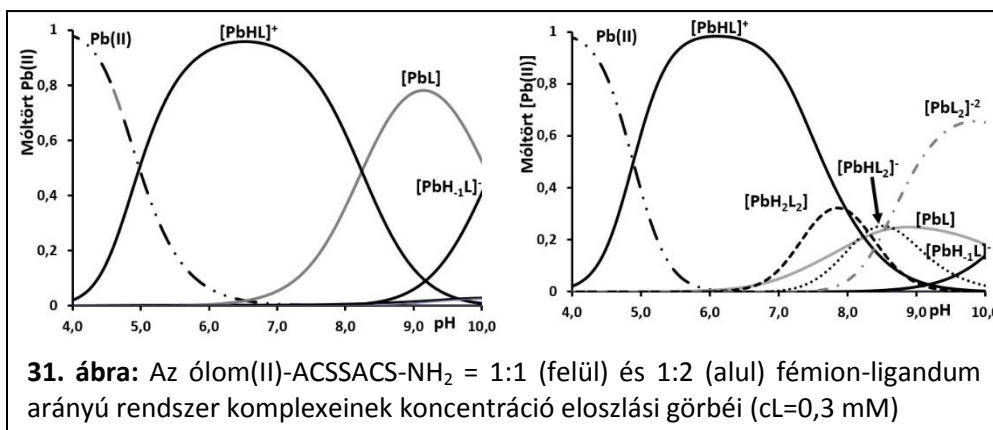
4.3.2.1. A ligandum Pb(II)-komplexei

Az Pb(II):ACSSACS-NH₂=1:2 és 1:1 arányú rendszerek pH-potenciometriás vizsgálatát végeztük el, mely során nem vált le csapadék egyik fémion-ligandum aránynál sem. Az Pb(II)-ACSSACS-NH₂ rendszer komplexeinek összetétele és stabilitási állandói a 20. táblázatban találhatóak, kiegészítve az irodalomból származó Cd(II)- és Zn(II)-komplexek [43], illetve az AlaCys ólom(II)komplexének [82] adataival.

20. táblázat: Az ACSSACS-NH₂ ólom(II)-, kadmium(II)- és cink(II) komplexeinek, valamint az AlaCys ólom(II)-komplexének stabilitási állandói ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,20\text{ M KNO}_3$ (Pb(II) és Cd(II) esetében), és $0,20\text{ M KCl}$ (Zn(II) esetében))

| lgβ | ACSSACS-NH ₂ | | | AlaCys |
|---|-------------------------|-------------|-------------|--------------|
| | Pb(II) | Cd(II) [43] | Zn(II) [43] | Pb(II) [140] |
| [MH ₂ L] ²⁺ | | | | 20,49 |
| [MHL] ⁺ | 18,39(3) | 19,23 | 17,00 | 15,99 |
| [ML] | 10,15 (7) | 11,98 | 9,88 | 8,3 |
| [MH ₁ L] ⁻ | 0,0(5) | 3,41 | 1,92 | 0,80 |
| [MH ₂ L ₂] | 31,9(1) | 34,35 | 32,68 | 30,1 |
| [MHL ₂] ⁻ | 23,6(2) | 26,40 | 24,94 | 22,0 |
| [ML ₂] ²⁻ | 15,0(1) | 17,29 | 16,80 | 13,7 |
| pK(MHL/ML) | 8,24 | 7,25 | 7,12 | 7,7 |
| pK(ML/MH ₁ L) | 10,1 | 8,57 | 7,96 | 7,5 |
| pK(MH ₂ L ₂ /MHL ₂) | 8,3 | 7,95 | 7,74 | 8,1 |
| pK(MHL ₂ /ML ₂) | 8,6 | 9,11 | 8,14 | 8,3 |
| lg(K ₁ /K ₂) ^H | 4,9 | 4,11 | 1,32 | 1,88 |
| lg(K ₁ /K ₂) | 5,3 | 6,67 | 2,96 | 2,9 |

A táblázat adatai tükrözik, hogy mind az Pb(II), mind a korábban vizsgált két fémion esetén mono- és biszkomplexek képződnek. Ennek eloszlását mutatja be a **31. ábra** ligandumfelesleg és ekvimoláris rendszer esetén.



Bár azonos sztöchiometriájú komplexeket írtak le a Cd(II)- és Zn(II)-ACSSACS-NH₂ rendszerekben is, de néhány komplexben a koordinációs mód eltérő. Zn(II) és Cd(II) esetében a protonált mono- és biszkomplexekben (S⁻,S⁻) kötémódot állapítottak meg, és az [ML] komplexben az aminocsoportnak csak gyenge kölcsönhatása mutatható ki. Az [PbHL]⁺ és az [PbL] komplexben szintén (S⁻,S⁻) koordinációs mód valósul meg, 18 tagú makrokelát kialakulásával.

A stabilitási sorrend mindkét komplex esetében, hasonlóan a CSSACS-NH₂ ligandum komplexeinek stabilitásához a Cd(II) > Pb(II) > Zn(II) sorrendet követi.

A feltételezett koordinációs módokat alátámasztják az Pb(II)-AlaCys rendszer komplexeinél kapott eredmények [82] (20. táblázat). Ebben a ligandumban a C-terminális tiolátcsoport az elsődleges kötőhely és az Pb(II)-iont a (S⁻, COO⁻) donorcsoportokon keresztül köti meg ez a dipeptid. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy az (NH₂,S⁻) koordináció nem kedvezményezett, ha a cisztein a második helyen van a peptidláncban, azaz az NH₂ és a S⁻ donorcsoportok nincsenek kelátképző pozícióban.

Az [PbHL]⁺ komplex deprotonálódási folyamata nagyobb pH-n játszódik le az ACSSACS-NH₂ peptid esetében a CSSACS-NH₂ ligandumhoz képest, és a pK(MHL/ML) érték közel áll a szabad ligandum pK értékéhez.

Ezek az adatok bizonyítják a ligandum kétfogú koordinációját az [PbL] komplexben, ami megmagyarázza az [PbL] komplex kisebb stabilitását a CSSACS-NH₂-hez képest.

A ¹H NMR adatok is alátámasztják ezt a feltevést. A spektrumokat Pb(II) : ligandum = 1:1 arányú D₂O oldatban vettem fel, különböző pH-kon (21. táblázat). pH ~3,60 körül még nincs komplexképződés, míg pH ~6,50 és pH ~9,50-en az [PbHL]⁺ és az [PbL] komplexek az uralkodó részecskék (31. ábra).

21. táblázat: A szabad ligandum és az ekvimoláris Pb(II) : ACSSACS-NH₂ rendszerben a ligandum megfelelő jeleinek kémiai eltolódásai (ppm) az ¹H NMR spektrumokban különböző pH-kon.

| pH | 2X Cys- CH ₂ | +Pb(II) | Ala(1)- CH ₃ | +Pb(II) | Ala(5)- CH ₃ | +Pb(II) |
|------|----------------------------|----------|----------------------------|---------|----------------------------|---------|
| ~3,5 | 2,95, | 3,0 | 1,54, | 1,52, | 1,40, | 1,38, |
| | 2,97 | (széles) | 1,55 | 1,54 | 1,42 | 1,40 |
| ~6,5 | 2,95, | a) | 1,51, | 1,51, | 1,41, | 1,38, |
| | 2,96 | | 1,53 | 1,53 | 1,43 | 1,40 |
| ~9,5 | 2,86, | b) | 1,26, | 1,27, | 1,41, | 1,38, |
| | 2,88 | | 1,27 | 1,29 | 1,42 | 1,40 |

a) széles, nem kellően felhasadtt jelek

b) nem értékelhető jelek

A cisztein metilencsoportjához tartozó dublett jelnek a jelentős kiszélesedése alátámasztja a két tiolátcsoport koordinációját a monokomplexben. Az alanin metilcsoportjának éles jelét minden spektrumban tudtuk asszignálni. A terminális alanin metilcsoportjának NMR jelei 1,55 ppm-től 1,26 ppm-ig tolódott a pH~ 6,0-10,0 közötti tartományban, míg a másik Ala oldalláncának metilcsoportja nem tolódott el a vizsgált pH-tartományában. Ólom(II)ion hozzáadását követően sincs mérhető változás a terminális alanin jelében, pedig a ligandum teljes mennyisége kötött az ólom(II)komplexben. Ez a megfigyelés egyértelműen azt bizonyítja, hogy az N-terminális aminocsoport a protonált komplexben protonált formában van jelen, és a két tiolát rész a fő fémionkötőhely. A pH további emelésével a metil protonok jelei eltolódnak a nagyobb kémiai eltolódás irányába, de ez a szabad ligandummal párhuzamos folyamat, ami arra utal, hogy a terminális aminocsoport nem vesz részt a fémion megkötésében.

Más részről a két tiolát kénatomjának koordinációs szférában való jelenléte lehetőséget ad még egy ligandum megkötésére biszkomplexet kialakítva, és ezek a komplexek túlsúlyban vannak ligandumfelesleg jelenlétében.

Az UV spektroszkópiás mérések további bizonyítékot adnak a két tiolátcsoport koordinációjára mind az $[PbHL]^+$, mind az $[PbL]$ komplexben, mert mindkét komplexet hasonló $\lambda_{(max)}$ és ϵ értékekkel lehet jellemezni (22. táblázat), és ezek a paraméterek megfelelnek az ólom(II)ion koordinációs szférájában jelenlévő két kénatomnak (hasonlóan az $[PbL_2]^{2-}$ komplexhez az Ac-Cys esetében).

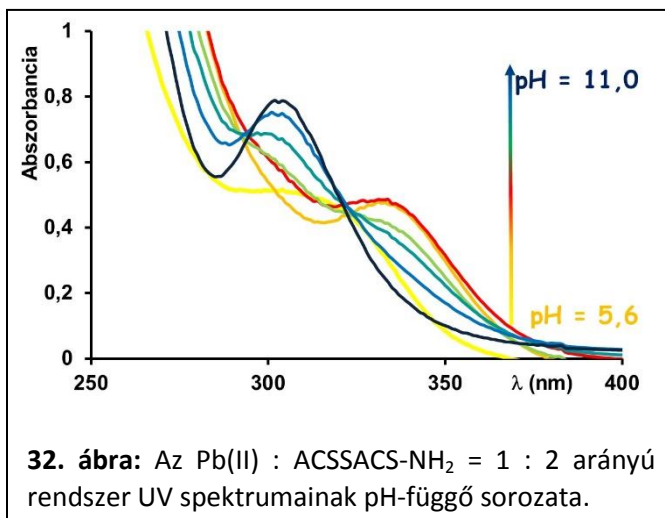
22. táblázat: Tiol funkciós csoportot tartalmazó ligandumok ólom(II) komplexeinek spektroszkópiai adatai ($x = 0 - 2$).

| | Ac-Cys | | Glutation[142] | | ACSSACS-NH ₂ | | SSCSSACS-NH ₂ | |
|--------------|-------------------------|---|-------------------------|---|-------------------------|---|--------------------------|---|
| | λ_{max} (nm) | ϵ M ⁻¹ · cm ⁻¹ | λ_{max} (nm) | ϵ M ⁻¹ · cm ⁻¹ | λ_{max} (nm) | ϵ M ⁻¹ · cm ⁻¹ | λ_{max} (nm) | ϵ M ⁻¹ · cm ⁻¹ |
| $[PbHL]^+$ | | | | | 312 | 3600 | 307 | 2800 |
| $[PbL]$ | 276 | 2400 | 277 | 2800 | 303 | 5000 | 307 | 3000 |
| $[PbH_xL_2]$ | 309 | 2600 | 313 | 2200 | 333 | 4500 | 331 | 6000 |
| $[PbL_3]^-$ | | | 334 | 3500 | | | | |

Az Pb(II)-ACSSACS-NH₂ 1:2 arányú rendszer UV spektrumsorozatának abszorpciós maximuma szignifikánsan eltolódik a nagyobb hullámhossz felé, és az

új abszorpciós sáv $\lambda_{\max} = 333$ nm hullámhossznál jelenik meg (32. ábra). Ez az abszorpciós maximum megfelel a biszkomplexnek (31. ábra), amelyekben így 3S⁻ koordináció feltételezhető.

Hasonló spektrális paraméterekkel



jellemezhető a glutation [PbL₃] komplexe ($\lambda_{\max} = 334$ nm, $\epsilon = 3500$ M⁻¹·cm⁻¹) (22. táblázat) [142]. Következésképpen a második ligandum csak egyfogóan kötődik az egyik tiolátcsoporton keresztül. Ez azzal a megfigyeléssel is egyezésben van, hogy a ciszteinben gazdag környezetben lévő Pb(II) gyakran koordinálódik trigonális piramis geometriában, ahol a magános pár a trigonális piramis csúcsán található.

Ez a trigonális piramis geometria jellemző az ólom(II)-glutacion [PbL₃] komplexére is, valamint az ólom(II)iont kötő ciszteingazdag, cinkkötő fehérjékre [154]-[156] is, például a szilárd fázisú Pb(II)-ALAD (aminolevulinsav dehidratáz) metalloenzimre [157]-[159], vagy az új tervezésű TRI peptidcsalád [160] ólom(II)komplexeire is.

A biszkomplexekben a két ligandum eltérő koordinációs módja magyarázza a szokatlanul nagy $\lg(K_1/K_2)^H$ és a $\lg(K_1/K_2)$ értéket (20. táblázat).

Nagyobb pH-n az Pb(II) komplexképződési folyamatai teljesen eltérőek a Zn(II)-vagy Cd(II)-ionhoz képest. Lúgos oldatban az (NH₂,N⁻,S⁻) koordinációjú [ZnHL₁L]⁻ és [CdHL₁L]⁻ komplexek keletkeznek, ám az ólom(II)ion nem képes indukálni az amidnitrogének deprotonálódását, így az [PbHL₁L]⁻ részecskék vegyes hidroxidkomplexek, melyek pH ~10,0 körül vannak jelen.

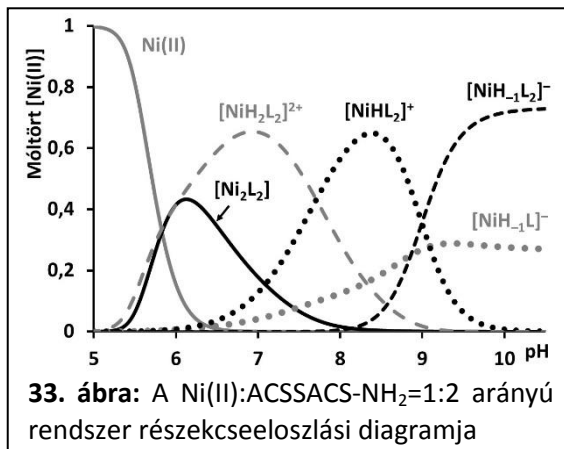
4.3.2.2. A ligandum Ni(II)-komplexei

A pH-potenciometriás mérések során a Ni(II)-ACSSACS-NH₂ 1:2, 1:1 és 2:1 arányú rendszerek vizsgálatát végeztük el, mely során a vizsgált pH-tartományban (pH = 5,0-11,0) az oldat színe folyamatosan sötétedett világosbarnától sötétbarna színűig, ám csapadékképződést nem tapasztaltunk. A kiértékelés során egy- és kétmagvú, illetve biszkomplexekeket tartalmazó modellel tudtuk illeszteni a titrálási adatokat. Ezen komplexek stabilitási állandóit a 23. táblázat tartalmazza, melyet kiegészítettünk az ADAAAC-NH₂ [146] és az AHAAAC-NH₂ [42] ligandumok nikkell(II)komplexeinek irodalmi adataival is.

23. táblázat: A ligandumok nikkell(II)komplexeinek stabilitási állandói ($T = 298 \text{ K}$, $I = 0,20 \text{ M KCl}$).

| komplexek összetétele | ACSSACS-NH ₂ | | ADAAAC-NH ₂ | AHAAAC-NH ₂ |
|----------------------------------|-------------------------|--|------------------------|------------------------|
| | $lg\beta$ | koordinációs mód | $lg\beta$ | $lg\beta$ |
| NiHL | | | | 13,08 |
| Ni ₂ L ₂ | 24,62(4) | 2x(NH ₂ ,N ⁻ ,S ⁻) | | |
| NiL | | | 5,27 | 7,62 |
| NiH ₂ L ₂ | 32,81(7) | (NH ₂ ,N ⁻ ,S ⁻) + S ⁻ | | |
| NiHL ₂ | 25,1(2) | (NH ₂ ,N ⁻ ,S ⁻) + S ⁻ (2. ligandum aminocsoportja deprotonált) | | |
| NiH ₁ L ₂ | 7,1(3) | (NH ₂ ,N ⁻ ,S ⁻) + S ⁻ (a másik két tiolát deprotonált) | | |
| NiH ₁ L | 2,80(8) | (NH ₂ ,N ⁻ ,S ⁻ , S ⁻) | -2,96 | 1,10 |
| NiH ₂ L | | | -11,03 | |
| NiH ₃ L | | | -21,08 | |
| Ni ₂ H ₂ L | -1,8(1) | (NH ₂ ,N ⁻ ,S ⁻) + (S ⁻ ,N ⁻) | | |
| Ni ₂ H ₃ L | -9,88(6) | (NH ₂ ,N ⁻ ,S ⁻) + (S ⁻ ,N ⁻ ,N ⁻) | | |
| Ni ₂ H ₄ L | -19,7(1) | (NH ₂ ,N ⁻ ,S ⁻) + (S ⁻ ,N ⁻ ,N ⁻ ,N ⁻) | | |

Ligandumfelesleget tartalmazó rendszer esetében fiziológias pH-n az uralkodó részecske a $[\text{NiH}_2\text{L}_2]$ protonált biszkomplex, melyben az egyik ligandum ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}^-$) donorcsoportjain és valószínűleg a másik ligandum (S^-) donorcsoportján keresztül koordinálódik a fémionhoz, a

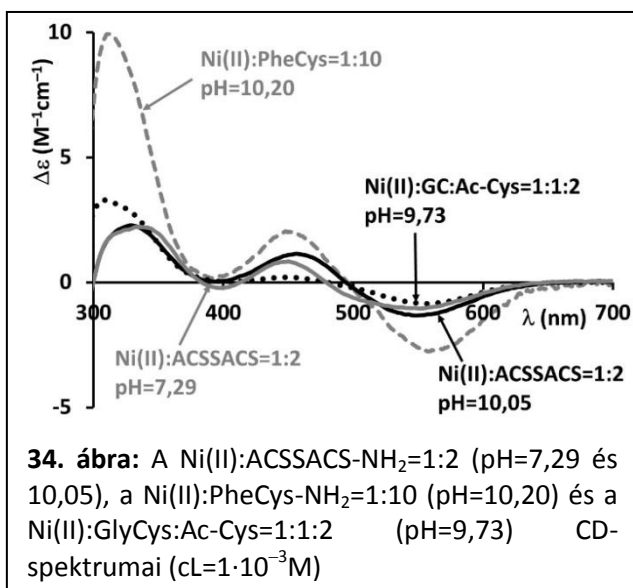


33. ábra: A Ni(II):ACSSACS-NH₂=1:2 arányú rendszer részecseeloszlási diagramja

nem koordinálódó donorcsoportok pedig protonáltak. Ezzel a komplexszel párhuzamosan képződik a $[\text{Ni}_2\text{L}_2]$ 1:1 arányú dimer részecske, de ez ligandumfelesleg esetén kisebb mennyiségben jelenik meg, mint ekvimoláris oldatban (33. ábra).

Nagyobb pH-n, az ammóniumcsoport deprotonálódásával kialakul a $[\text{NiHL}_2]^-$, majd átfedő lépésben a két tiolcsoport deprotonálódásával a $[\text{NiH}_{-1}\text{L}_2]^{3-}$ komplex. Ezeknek a folyamatoknak a lejátszódását támasztják alá a deprotonálódási folyamatokra jellemző pK értékek. A $pK(\text{NiH}_2\text{L}_2 \rightleftharpoons \text{NiHL}_2 + \text{H}^+) = \lg\beta(\text{NiH}_2\text{L}_2) - \lg\beta(\text{NiHL}_2) = 7,71$ érték az ammóniumcsoport deprotonálódására, míg a $pK(\text{NiHL}_2 \rightleftharpoons \text{NiH}_{-1}\text{L}_2 + 2\text{H}^+)_{\text{átlag}} = (\lg\beta(\text{NiHL}_2) - \lg\beta(\text{NiH}_{-1}\text{L}_2))/2 = 9,0$ a tiolcsoportok deprotonálódására utal. Ezen részecskékkel párhuzamosan képződik a $[\text{NiH}_{-1}\text{L}]^-$ is, de az csak kis mennyiségben jelenik meg.

Ezek alapján a $[\text{NiH}_2\text{L}_2]$, a $[\text{NiHL}_2]^-$ és $[\text{NiH}_{-1}\text{L}_2]^{3-}$ komplexekben a koordinációs mód azonos ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}^- + \text{S}^-$), csak a deprotonálódott



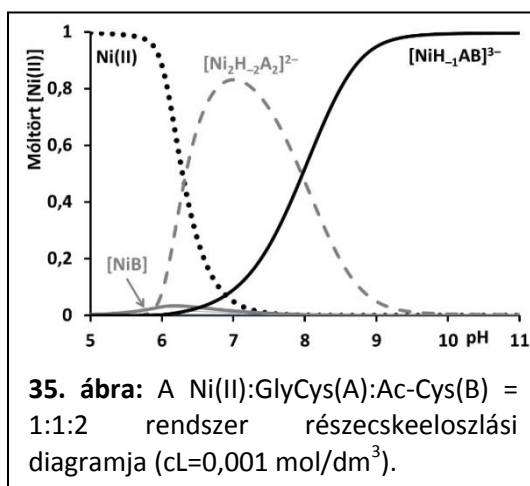
34. ábra: A Ni(II):ACSSACS-NH₂=1:2 (pH=7,29 és 10,05), a Ni(II):PheCys-NH₂=1:10 (pH=10,20) és a Ni(II):GlyCys:Ac-Cys=1:1:2 (pH=9,73) CD-spektrumai (cL=1·10⁻³M)

donorcsoportok száma változik. Ezt alátámasztja, hogy a ligandumfelesleget tartalmazó rendszerben a pH növelésével a CD-spektrum alakja nem, csak az intenzitása változik (**34. ábra**).

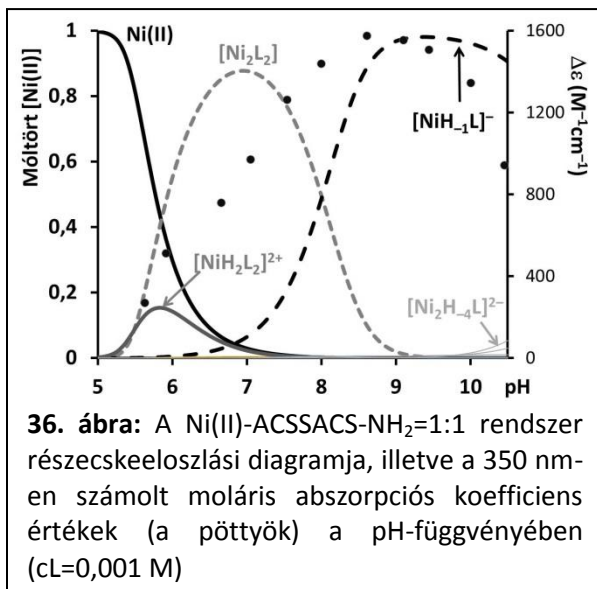
A koordinációs mód igazolásához különböző modellvegyületeket vizsgáltunk. A Ni(II):PheCys = 1:10 arányú oldatának 10,2-es pH-n felvett CD-spektruma a $[\text{NiH}_{-1}\text{L}_2]^{3-}$ komplexhez rendelhető [55]. A PheCys ligandum $[\text{NiH}_{-1}\text{L}_2]^{3-}$ részecskéjében a koordinációs mód azonos az ACSSACS-NH₂ ligandum $[\text{NiH}_{-1}\text{L}_2]^{3-}$ komplexével [161], melyet alátámaszt a két rendszer CD-spektrumának jó egyezése (**34. ábra**).

A $[\text{NiH}_2\text{L}_2]$, a $[\text{NiHL}_2]^-$ és $[\text{NiH}_{-1}\text{L}_2]^{3-}$ komplexek koordinációs módjának további igazolására 9,82 pH-n felvettem a Ni(II):GlyCys:Ac-Cys=1:1:2 arányú vegyes ligandumú rendszer CD-spektrumát, valamint elvégeztem a Ni(II):GlyCys:Ac-Cys=1:1:1 vegyes ligandumú rendszer pH-potenciometriás vizsgálatát. A kapott adatokból meghatároztuk az $[\text{NiH}_{-1}\text{AB}]^{3-}$ vegyes komplex stabilitási állandóját: $\lg \beta = 6,31(8)$, (M = Ni(II), A = GlyCys, B = Ac-Cys). Ebben a vegyes komplexben kialakuló kötési mód szintén jól modellezi az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}^- + \text{S}^-)$ koordinációs módot, ugyanis a keletkező komplex kialakulásában részt vesz mindkét ligandum

tiolátcsoportja, valamint a GlyCys dipeptid N-terminális amino- és amidnitrogén donorcsoportja is. A Ni(II):GlyCys:Ac-Cys= 1:1:2 rendszerben keletkező komplexek eloszlását a **35. ábra** mutatja be. Látható, hogy pH ~ 10,0 körül 100%-ban a vegyes komplex van jelen. A Ni(II)-GlyCys-Ac-Cys vegyes ligandumú rendszer



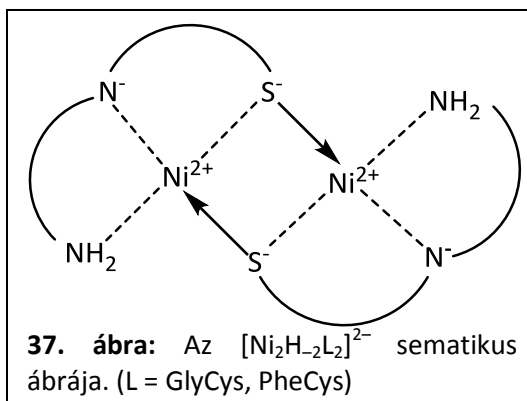
spektrumának alakja és a moláris abszorpciós értékek közelsége így alátámasztja, hogy mindkét tiolátcsoport rész vesz a koordinációban.



36. ábra: A Ni(II)-ACSSACS-NH₂=1:1 rendszer részecskeeloszlási diagramja, illetve a 350 nm-en számolt moláris abszorpciós koefficiens értékek (a pöttyök) a pH-függvényében (cL=0,001 M)

A nikkel(II)-ACSSACS-NH₂ 1:1 arányú rendszer esetében fiziológiás pH körül (~6,0-os és 7,5-es pH között) az uralkodó komplex a [Ni₂L₂] dimer részecske (**36. ábra**), melyben a ligandumok a fémionhoz a 2x(NH₂,N⁻,S⁻) donoratomokkal tioláthídon keresztül koordinálnak, és a ligandumokban lévő C-

terminális tiolcsoportok még protonáltak. Ez a koordinációs mód megegyezik a Ni(II):GlyCys = 1:1 és a Ni(II):PheCys = 1:1 rendszerekben fiziológiás pH körül kialakuló [Ni₂H₋₂L₂]²⁻ összetételű komplexek koordinációs módjával, mely rendszerek esetében mindkét



37. ábra: Az [Ni₂H₋₂L₂]²⁻ sematikus ábrája. (L = GlyCys, PheCys)

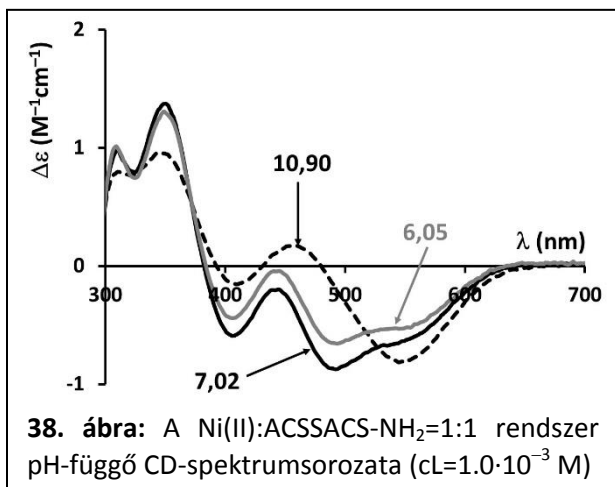
fémionhoz egy-egy ligandum (NH₂,N⁻,S⁻) koordinációval kötődik, és a két egység tioláthídon keresztül alakítja ki a dimer szerkezetet (**37. ábra**).

Ezt a koordinációs módot igazolja a Ni(II):ACSSACS-NH₂ = 1:1 és a Ni(II):GlyCys = 1:1 rendszerek UV-Vis spektrumainak jó egyezése is (*24. táblázat*).

24. táblázat: A Ni(II) ACSSACS-NH₂ és GlyCys ligandumokkal alkotott 1:1 arányú rendszereinek UV-Vis spektrofotometriás adatai.

| átmenet | ACSSACS-NH ₂ | | | GlyCys [161] | | |
|--------------------|-------------------------|-----|------|--------------|------|------|
| | λ | ε | pH | λ | ε | pH |
| d→d | 457 | 246 | | 464 | 285 | |
| S→Ni ²⁺ | 350 | 970 | 7,05 | 344 | 1784 | 8,94 |

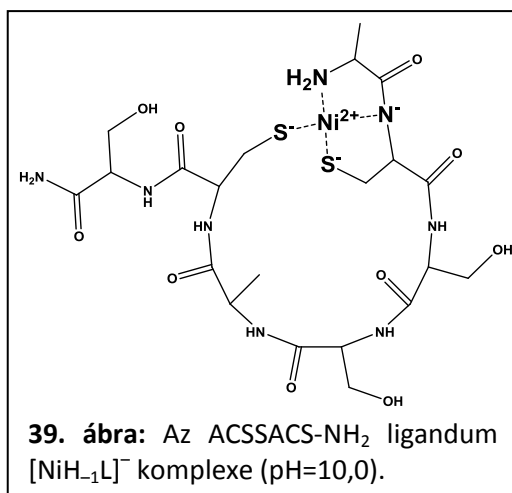
A pH emelésével fokozatosan kialakul a $[\text{NiH}_1\text{L}]^-$ komplex, vagyis a dimer szerkezet átrendeződik. Ennek a dimer-monomer átalakulásnak a folyamatát jól



nyomon lehet követni az ekvimoláris rendszer pH-függő UV-Vis spektrumainak 350 nm-en számolt moláris abszorpciós koefficiens értékeivel (38. ábra). A $\text{S}^- \rightarrow \text{Ni(II)}$ töltésátviteli sáv intenzitásának csökkenése nem párhuzamos a $[\text{Ni}_2\text{L}_2]$ komplex mennyiségének

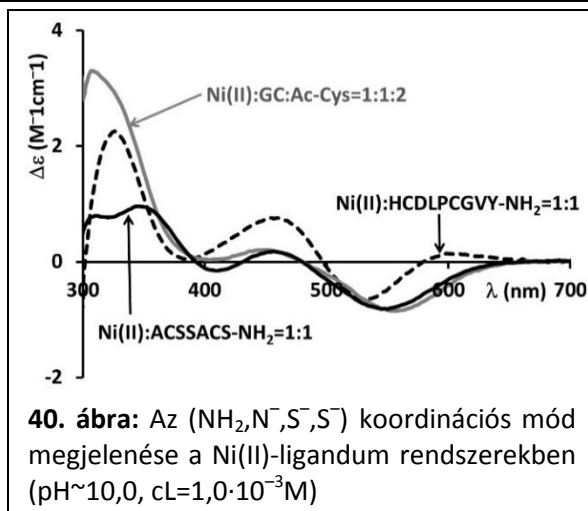
csökkenésével, eltolódik a nagyobb pH felé. Emiatt feltételezhető a $[\text{Ni}_2\text{H}_1\text{L}_2]^-$ komplex megjelenése is, ám ezt a részecskét pH-potenciometriás mérések során kimutatni nem tudtuk. Továbbá ezt igazolja a Ni(II):ACSSACS-NH₂ = 1:1 rendszer pH-függő CD-spektrumsorozata is (38. ábra). A 6,05-ös és 7,02-es pH-n felvett CD-spektrumok alakja jó egyezésben áll egymással, mivel a vizsgált pH-tartományban még a dimer szerkezetű $[\text{Ni}_2\text{L}_2]$ komplex van jelen. Ettől jelentősen eltér az erősen lúgos, 10,90-es pH-n felvett CD-spektrum, ahol feltételezhetőleg már csak a monomer szerkezetű $[\text{NiH}_1\text{L}]^-$ részecske van.

A $[\text{NiH}_1\text{L}]^-$ már ~9,0-es pH-tól az uralkodó részecske, melyben a koordináció a peptid ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}^-, \text{S}^-$) donorcsoportjain keresztül valósul meg úgy, hogy az N-terminális vég ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}^-$) csoportjai a Ni(II)-ionhoz koordinálva kialakítják a stabil (5,5)-tagú csatolt kelátrendszert, a C-terminális S^- csoport koordinációja révén pedig kialakul még egy makrokelát gyűrű (39. ábra),



Ezt a koordinációs módot támasztják alá a ~10,0-es pH-n elvégzett CD-spektroszkópiás mérések (40. ábra). Korábban már vizsgálták a Ni(II)-SOD-enzimet modellező Ni(II):HCDLPCGVY-NH₂

rendszert, és megállapították, hogy a pH-potenciometriás vizsgálatok során csak



monokomplexek képződnek, és a lúgos pH-tartományban keletkező [NiH₁L]⁴⁻ komplexben a koordinációs mód (NH₂,N⁻,S⁻,S⁻) [162]. Ezen peptid N-terminális ciszteinjének pozíciója megegyezik az ACSSACS-NH₂ peptidben lévő N-terminális cisztein pozíciójával, valamint a két peptidben a ciszteinek távolsága is azonos. A Ni(II):ACSSACS-NH₂ = 1:1 arányú rendszer CD-spektrumának alakja jó egyezésben áll a Ni(II):HCDLPCGVY-NH₂ = 1:1 és a Ni(II):GlyCys:Ac-Cys = 1:1:2 arányú rendszerek CD-spektrumával. Ennek oka, hogy a különböző ligandumok Ni(II)-ionnal alkotott adott komplexeiben a koordinálódó donorcsoportok azonosak (25. táblázat), csak kémiai környezetük tér el egymástól.

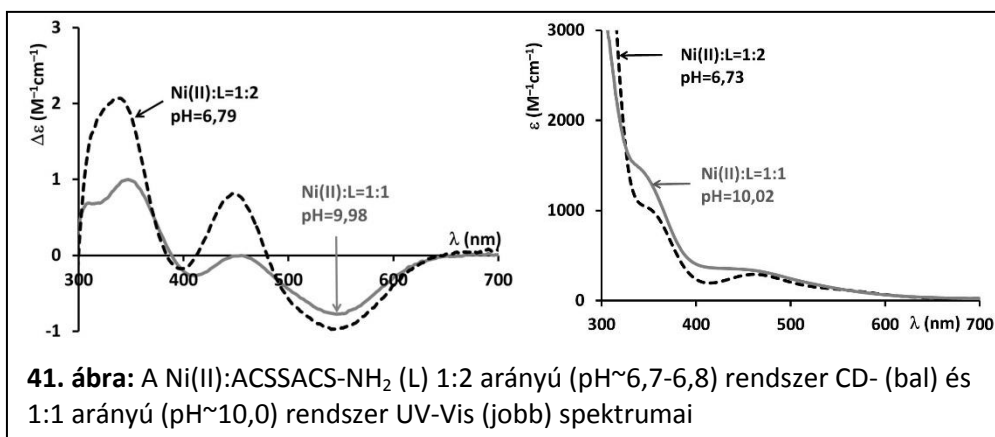
25. táblázat: A ligandumok Ni(II)-ionnal alkotott rendszereinek (NH₂,N⁻,S⁻,S⁻) koordinációs módú komplexei ~10,0-es pH körül.

| Vizsgált rendszer | pH | Komplex |
|---|-----------|-------------------------------------|
| Ni(II):ACSSACS-NH ₂ =1:1 | ~9,0-10,0 | [NiH ₁ L] ⁻ |
| Ni(II):HCDLPCGVY-NH ₂ =1:1 [162] | ~10,0 | [NiH ₁ L] ⁴⁻ |
| Ni(II)GlyCys(A):Ac-Cys(B)=1:1:2 | ~10,0 | [NiAH ₁ B] ³⁻ |

Az [NiH₁L]⁻ komplex stabilitási állandója nagyobb, mint az ADAAC-NH₂ és az AHAAAC-NH₂ ligandumok NiH₁L komplexeinek stabilitási állandói. Az AHAAAC-NH₂ esetében a síknégyszetes szerkezetű [NiH₁L] az uralkodó részecske 7,0-es pH felett, melyben az (NH₂,N⁻,N_{im},S⁻) koordinációs módot UV-Vis spektrofotometriával igazolták, vagyis hasonlóan az ACSSACS-NH₂ [NiH₁L]⁻

komplexéhez, az N-terminális rész ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{int}}/\text{S}^-$) koordinációja mellett a C-terminális tiolátcsoport is rész vesz a fémion megkötésében.

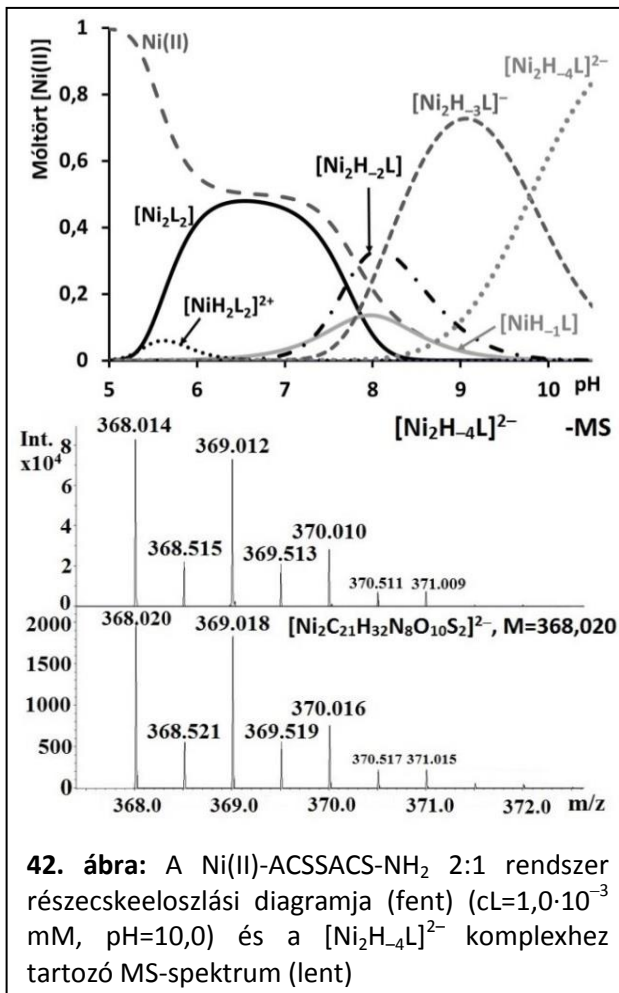
A $\text{Ni(II):ACSSACS-NH}_2 = 1:1$ rendszer lúgos oldatában ($\text{pH} = 9,0-10,0$) képződő $[\text{NiH}_1\text{L}]^-$ komplexében, és a $\text{Ni(II):ACSSACS-NH}_2 = 1:2$ gyengén savas pH-n ($\text{pH} \sim 6,0-7,0$) képződő $[\text{NiH}_2\text{L}_2]$ komplexében azonos donorcsoportok, vagyis az ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}^-, \text{S}^-$) csoportok koordinálják a fémiont, melyet mind a CD-, mind az UV-Vis spektrumok alakjának hasonlósága alátámaszt (**41. ábra**).



A Ni(II)-ligandum 2:1 arányú rendszerben fiziológiás pH körül (~5,5-7,5 pH között) az uralkodó részecske a $[\text{Ni}_2\text{L}_2]$ komplex (42. ábra). A pH növelésével az N-terminális ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}^-$)

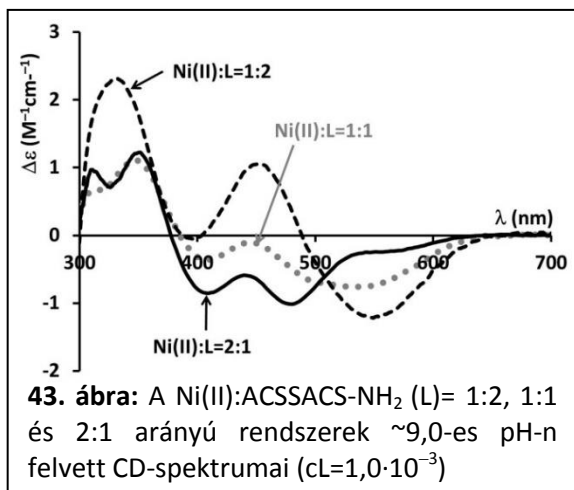
és a C-terminális (S^-, N^-) donorcsoportok részvételével fokozatosan kialakul a kétmagvú $[\text{Ni}_2\text{H}_2\text{L}_2]^{2-}$ részecske.

A pH további növelésével még egy amidnitrogén deprotonálódik. Így az N-terminális ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}^-$) és a C-terminális ($\text{S}^-, \text{N}^-, \text{N}^-$) donorcsoportokon keresztül kialakul a $[\text{Ni}_2\text{H}_3\text{L}]^-$



42. ábra: A Ni(II)-ACSSACS-NH₂ 2:1 rendszer részecskeeloszlási diagramja (fent) ($c_L=1,0 \cdot 10^{-3}$ mM, pH=10,0) és a $[\text{Ni}_2\text{H}_4\text{L}]^{2-}$ komplexhez tartozó MS-spektrum (lent)

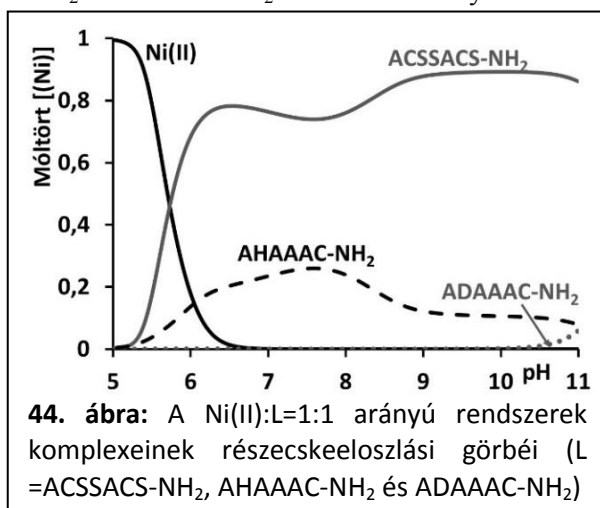
komplex, mely 9,0-es pH-n az uralkodó részecske. Erősen lúgos oldatban egy újabb amidnitrogén deprotonálódik, kialakítva a $[\text{Ni}_2\text{H}_4\text{L}]^{2-}$ részecskét, melynek létezését tömegspektrometriás méréssel is igazoltuk (42. ábra).



A kétmagvú komplexek kialakulását igazolja az is, hogy a ~9,0-es pH-n felvett Ni(II):ACSSACS-NH₂ = 1:2 és 1:1 arányú rendszerek CD-spektrumaitól jelentősen eltér a fémionfelesleget tartalmazó rendszerben szintén 9,0-es pH-n felvett, CD-spektrum (43. ábra). Összevetve az ACSSACS-NH₂,

az AHAAAC-NH₂ és az ADAAC-NH₂ ligandumok Ni(II)-komplexeinek stabilitását, egyértelműen a két tiolátcsoportot tartalmazó ligandum esetében képződnek a legstabilabb komplexek. Ezt jól szemlélteti a 44. ábra, ahol a Ni(II):ACSSACS-NH₂:AHAAAC-NH₂:ADAAC-NH₂ = 1:1:1 arányú rendszer

predominancia görbéi láthatóak. A hisztidint és ciszteint tartalmazó ligandumok kisebb stabilitású komplexet képeznek. A tiolátcsoport mellett karboxilát donorcsoportot tartalmazó ligandum Ni(II)-komplexei pedig elhanyagolhatóak a másik két rendszerhez képest (44. ábra).



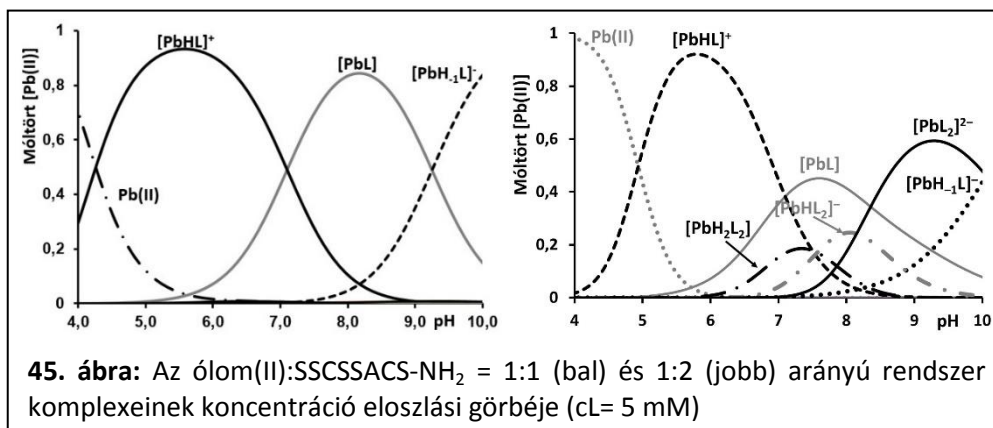
4.3.3. Az SSCSSACS-NH₂ peptid

4.3.3.1. A ligandum Pb(II)-komplexei

A Pb(II):SSCSSACS-NH₂=1:2, 1:1,5 és 1:1 arányú rendszerek pH-potenciometriás vizsgálatát végeztük el, melyek során csapadékképződést nem tapasztaltunk. A harmadik helyen ciszteint tartalmazó oktapeptid ólom(II)ion komplexeinek vizsgálatát kiegészítettük a kadmium(II)-, cink(II)- és nikkell(II)ion komplexeinek vizsgálatával. Az első három fémionnal alkotott komplexek stabilitási állandóinak értékeit a 26. táblázat tartalmazza.

26. táblázat: Az SSCSSACS-NH₂ ólom(II)-, kadmium(II)- és cink(II)komplexeinek stabilitási állandói ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,20\text{ M KNO}_3$)

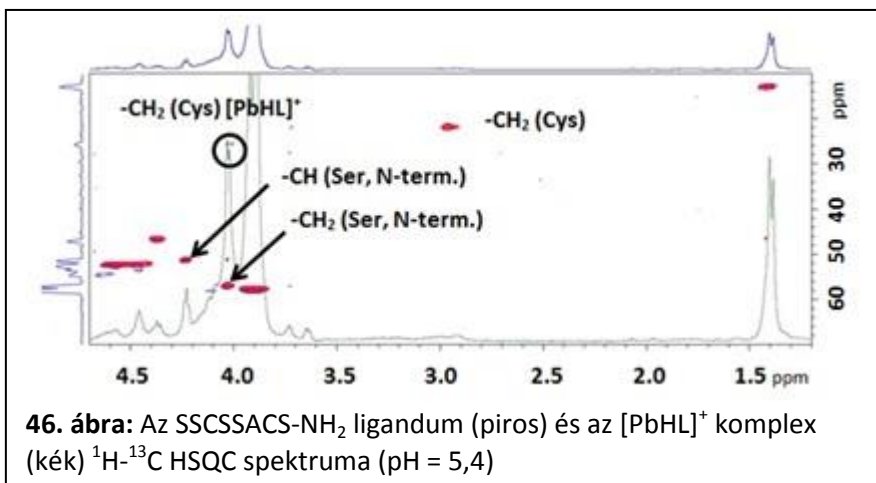
| | Pb(II) | Cd(II) | Zn(II) |
|--|----------|----------|----------|
| [MHL] ⁺ | 17,76(1) | 18,15(2) | 15,56(2) |
| [ML] | 10,66(3) | 11,77(5) | 8,54(6) |
| [MH ₁ L] ⁻ | 1,41(4) | 1,69(5) | 0,61(3) |
| [MH ₂ L] ²⁻ | | | -9,53(4) |
| [M ₂ H ₃ L ₃] ⁺ | | 56,6(2) | |
| [MH ₂ L ₂] | 31,61(6) | | 30,69(3) |
| [MHL ₂] ⁻ | 24,04(7) | 26,61(7) | |
| [ML ₂] ²⁻ | 15,89(6) | 17,6(1) | 16,60(6) |
| pK(MHL/ML) | 7,10 | 6,38 | 7,02 |
| pK(ML/MH ₁ L) | 9,25 | 10,08 | 7,93 |
| pK(MH ₂ L ₂ /MHL ₂) | 7,57 | | 7,04 |
| pK(MHL ₂ /ML ₂) | 8,15 | 8,97 | |
| lg(K ₁ /K ₂) ^H | 3,91 | | 0,43 |
| lg(K ₁ /K ₂) | 5,43 | 5,94 | 0,48 |



Az Pb(II)-komplexek összetétele és a komplexképződési folyamatok gyakorlatilag megegyeznek az Pb(II)-ACSSACS-NH₂ rendszerrel, mono- és biszkomplexek is képződnek (45. ábra).

Az [PbHL]⁺ komplexben a két cisztein oldallánc tiolátcsoportja koordinálódik az ólom(II)ionhoz, a terminális aminocsoport pedig protonált formában van jelen, melyet ¹H-¹³C HSQC spektrummal is bizonyítottuk (46. ábra).

A



szabad ligandum és az Pb(II):ligandum rendszer spektrumát pH=5,0-n rögzítettük, ahol utóbbinál az [PbHL]⁺ az uralkodó részecske.

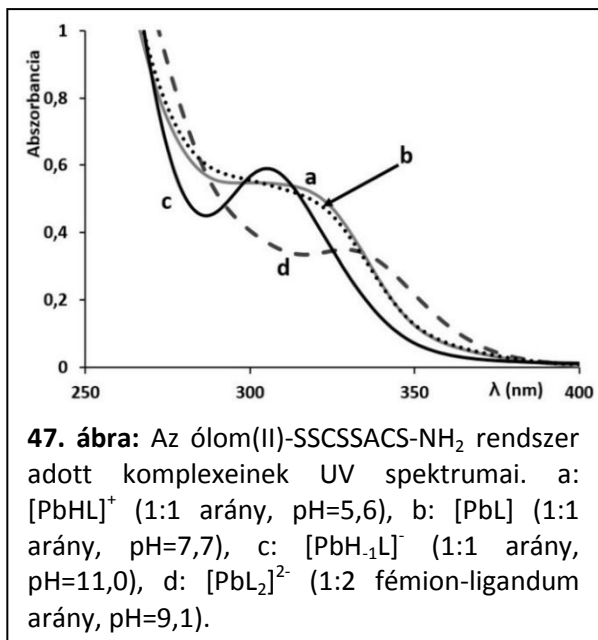
Az ólom(II)ion hozzáadásával az N-terminális szerin -CH₂ és -CH csoportok keresztcsúcsainak pozíciója nem változik a szabad liganduméhoz képest, ami alátámasztja, hogy a ligandum terminális ammóniumcsoportja nem koordinálódik az [PbHL]⁺ komplexben.

Ezzel szemben a cisztein metilén csoportjának keresztcsúcsa szignifikánsan eltolódik, ami bizonyítja mindkét tiolátcsoport ólom(II)ionhoz való koordinációját. A pH emelésével a ¹H NMR spektrumokban a szabad ligandumhoz képest kis különbség figyelhető meg az N-terminális szerin -CH jelének eltolódásában, melynek alapján nem zárható ki az -NH₂ csoport gyenge kölcsönhatása.

Az SSCSSACS-NH₂ és az ACSSACS-NH₂ komplexeinek spektrális paraméterei nagyon hasonlítanak egymásra (22. táblázat), szintén alátámasztva a (S⁻,S⁻) koordinációs módot az [PbHL]⁺ és [PbL] részecskékben, és a (S⁻,S⁻)+S⁻ koordinációs módot a biszkomplexeiben. Ez a koordinációs mód stabilizálja a komplexeket, és megakadályozza a fémion hidrolízisét.

Az SSCSSACS-NH₂ különböző komplexeire jellemező

spektrumok a 47. ábrán láthatóak. A pH ~10,0 ekvimoláris oldatban vegyes hidroxidkomplex képződik.



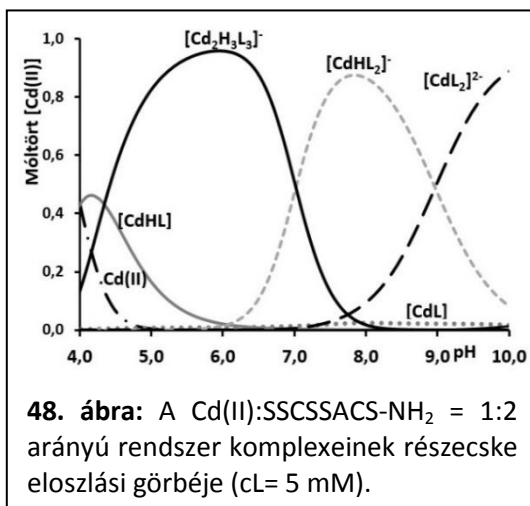
4.3.3.2. A ligandum Cd(II)- és Zn(II)-komplexei

A Cd(II)- és Zn(II):SSCSACS-NH₂ rendszer komplexeinek összetétele nagyon hasonlít az Pb(II)-iont tartalmazó rendszerhez. Az egyetlen különbség a Cd(II):SSCSACS-NH₂ rendszer polinukleáris [Cd₂H₃L₃]⁺ komplexének kialakulása (48. ábra).

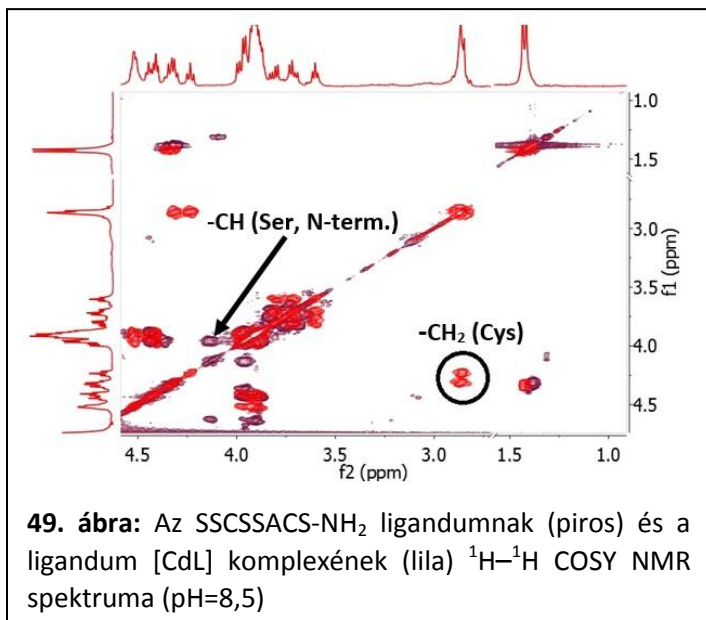
A részletes vizsgálatok viszont egyéb eltéréseket is mutatnak az ugyanolyan összetételű komplexek koordinációs módjai között.

A monokomplexek esetében mindkét tiolátcsoport koordinálódik mind a

kadmium(II)ionhoz, mind pedig a cink(II)ionhoz. A pK(CdHL/CdL) érték (26.



48. ábra: A Cd(II):SSCSACS-NH₂ = 1:2 arányú rendszer komplexeinek részecske eloszlási görbéje (cL= 5 mM).



49. ábra: Az SSCSACS-NH₂ ligandumnak (piros) és a ligandum [CdL] komplexének (lila) ¹H-¹H COSY NMR spektruma (pH=8,5)

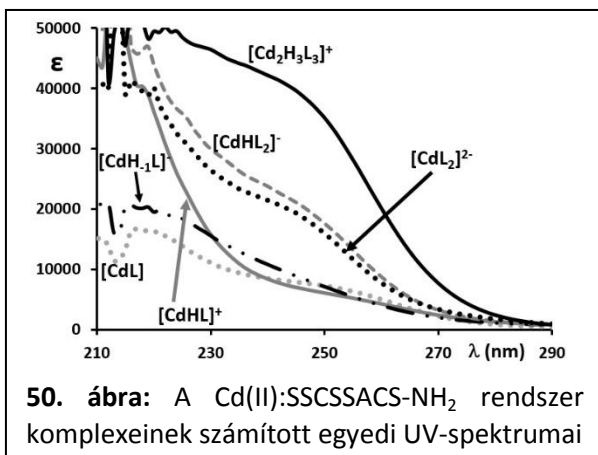
táblázat) kisebb, mint a szabad ligandum pK_{amino} értéke, ami a terminális aminocsoport gyenge kölcsönhatására utal. A ligandum, valamint a Cd(II):SSCSACS-NH₂ ekvimoláris oldatban pH 8,5-nél felvett ¹H-¹H COSY spektrumok szintén megerősítik a

feltételezett kötémódot, ugyanis a fémion jelenléte jelentős változást okoz a cisztein -CH₂ csoportjának dublettjeiben (49. ábra). Ezek a jelek a legérzékenyebbek a peptid tiolcsoportjának deprotonálódására és koordinációjára. Emellett ezen a pH-n

már az N-terminális szerin -CH protonjának jelénél is tapasztalható egy kisebb mértékű eltolódás.

Az ACSSACS-NH₂ Cd(II)- és Zn(II)-komplexeihez hasonlóan 4S⁻ koordinációjú Cd(II)- és Zn(II)-biszkomplexek képződnek, ami eltérő az Pb(II):SSCSSACS-NH₂ rendszerben képződő biszkomplextől.

A mono- és biszkomplexekben a két, illetve négy tiolátcsoport koordinációját UV-spektrofotometriás mérésekkel is alátámasztottuk. A szabad ligandumot tartalmazó oldatnak és a Cd(II):SSCSSACS-NH₂ = 1:2 arányú rendszer oldatának



50. ábra: A Cd(II):SSCSSACS-NH₂ rendszer komplexeinek számított egyedi UV-spektrumai

spektrumsorozata azt mutatja, hogy mind a szabad ligandum deprotonálódását, mind pedig a Cd(II)-komplexek kialakulását egy a 230-240 nm hullámhossztartományban megjelenő UV-sáv kíséri.

A ligandum deprotonált formájának és a különböző

kadmium(II)komplexeknek az egyedi spektrumait a PSEQUAD programmal számoltuk ki (50. ábra).

Az UV spektroszkópiás mérések alapján számított moláris abszorpciókoefficienseket a 27. táblázatba gyűjtöttem össze, kiegészítve néhány összehasonlító adattal.

27. táblázat: A ligandumok Cd(II)-komplexeinek UV spektroszkópiás paramétereit.

| részecskék | SSCSSACS-NH ₂ | | ADAAAC-NH ₂ [146] | |
|---|--------------------------|---|------------------------------|---|
| | λ_{\max} (nm) | ϵ (M ⁻¹ ·cm ⁻¹) | λ_{\max} (nm) | ϵ (M ⁻¹ ·cm ⁻¹) |
| L ²⁻ | 232 | 12000 | 232 | 6400 |
| [CdHL] ⁺ | 238 | 9300 | 232 | 5000 |
| [CdL] | 238 | 8800 | 232 | 5200 |
| [CdH ₁ L] ⁻ | 238 | 11600 | 232 | 5300 |
| [Cd ₂ H ₃ L ₃] ⁺ | 238 | 43000 | | |
| [CdH ₂ L ₂] | | | 232 | 9000 |
| [CdHL ₂] ⁻ | 238 | 24700 | 232 | 11300 |
| [CdL ₂] ²⁻ | 238 | 22200 | 232 | 10700 |

Az SSCSSACS-NH₂ ligandum moláris abszorpciós koefficiens értéke közel áll a monokomplexekre jellemző értékekhez, a biszkomplexekre kapott paraméterek viszont kétszeresei a szabad ligandum moláris abszorpciós koefficienshez viszonyítva. Mind a szabad ligandum, mind pedig a mono- és biszkomplexek UV spektroszkópiás paraméterei összhangban vannak a korábban már vizsgált, egy ciszteint tartalmazó ADAAAC-NH₂ hexapeptid értékeivel [146] (27. táblázat), ahol a 2S⁻ koordinált kadmium(II)komplexek moláris abszorpciós koefficiensei 9000 és 11300 M⁻¹·cm⁻¹ tartományba esnek.

A Cd(II)–SSCSSACS-NH₂ rendszerben a mono- és biszkomplexeken kívül polinukleáris részecskéket is leírtunk. Ezekben a részecskében a tiolátcsoport hídligandumként viselkedik. A polinukleáris részecskék keletkezését korábban már számos cisztein és penicillamin származék jelenlétében bizonyították, mint például a Cys-OMe, Ac-Cys és Ac-Pen ligandumok komplexeiben is [140]. Az oktapeptid esetében a polinukleáris komplexek kialakulását egyrészt UV spektroszkópiás mérésekkel támasztottuk alá. Látható a 26. táblázatban, hogy a [Cd₂H₃L₃]⁺ részecskékhez igen nagy moláris abszorpciós koefficiens tartozik, ami a polinukleáris szerkezetre utal. Másrészt hasonló következtetések vonhatóak le a Cd(II):SSCSSACS-NH₂ = 1:2 arányú rendszerének ¹H NMR spektrumai alapján is. A pH=5,0-ön felvett spektrumban a két cisztein metilén protonjaihoz két jel tartozik: a 2,96 ppm-nél lévő, élesebb csúcs a nem-koordinált ciszteinnek felel meg, míg a 3,12 ppm-nél lévő széles csúcs a koordinált cisztein -CH₂ csoportjához tartozik. Ez azt jelenti, hogy a komplexben a Cd(II)-ligandum arány kisebb, mint 1:2, ami összhangban van a polimer komplexben kialakuló Cd(II)-ligandum 1:1,5 aránnyal.

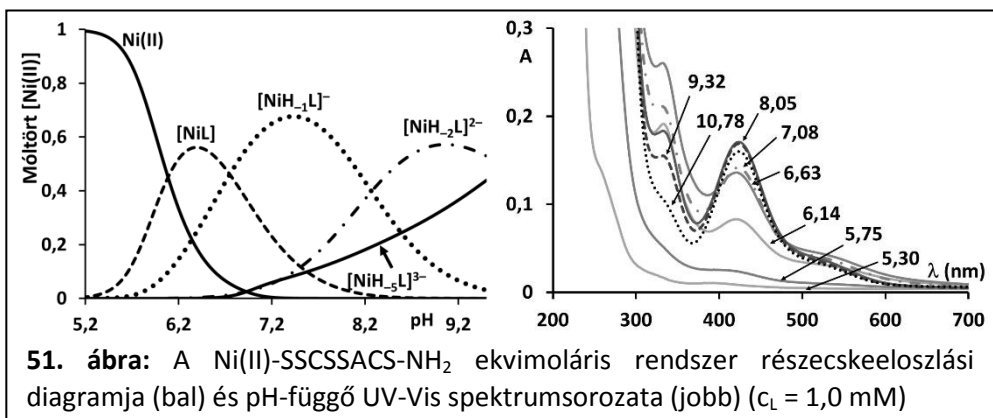
4.3.3.3. A ligandum Ni(II)-komplexei

A Ni(II):SSCSACS-NH₂ rendszer vizsgálata során elvégeztük az 1:2, az 1:1 és a 2:1 fémion-ligandum arányú oldatok pH-potenciometriás és spektroszkópiás méréseit is. Csapadék egyik esetben sem vált ki a vizsgált pH-tartományban (pH~3,0-11,0), az oldat színe ~5,5-ös pH-tól kezdődően sárgás, majd lúgos pH-n sárgásbarna színűvé alakult. Az SSCSACS-NH₂ nikkel(II)komplexeinek stabilitási állandóit a 28. táblázat tartalmazza. A táblázatba bekerültek összehasonlításképpen a GlyGlyCys és az AlaAlaCys ligandum nikkel(II)komplexeinek irodalmi adatai is.

28. táblázat: A ligandumok nikkel(II)komplexeinek stabilitási állandói ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,20\text{ M KCl}$)

| komplexek | SSCSACS-NH ₂ | | GGC [73] | AAC [55] |
|--|-------------------------|---|-------------|-------------|
| | <i>lgβ</i> | koordinációs mód | <i>lgβ</i> | <i>lgβ</i> |
| [NiHL] ⁺ | | | 13,67 | 13,6 |
| [NiL] | 8,89(4) | (NH ₂ ,N ⁻ ,S ⁻) | | |
| [NiH ₁ L] ⁻ | 2,14(6) | (NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,S ⁻) | | |
| [NiH ₂ L] ²⁻ | -6,13(15) | (NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,S ⁻) | -5,36 | -4,47 |
| [Ni ₂ H ₃ L] ³⁻ | -22,62(60) | (NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,S ⁻) + (S ⁻ , N ⁻ ,N ⁻ ,N ⁻) | | |

A Ni(II):SSCSACS-NH₂ = 1:1 fémion-ligandum arányú rendszerekben savas pH-tartományban (~5,2-5,6 pH körül) képződik a [NiL] komplex, melyben a fémionhoz a ligandum az (NH₂,N⁻,S⁻) donorcsoportokon keresztül koordinálódik. Ezzel szinte



párhuzamosan alakul ki a [NiH₁L]⁻ komplex is (51. ábra), ahol a ligandumban a második amidnitrogén is deprotonálódik. Így a koordinációs mód az (NH₂,N⁻,N⁻,S⁻) donorcsoportokon keresztül valósul meg. Ezen komplex szerkezete stabilisabb, mint

a [NiL] komplexé, mivel a donoratomok telítik a Ni(II)-ion koordinációs szféráját. A komplexekben az aminocsoport tölti be a horgonycsoport szerepét, a ligandum C-terminálishoz közeli tiolcsoportja még protonált. A komplexek síknégyzetes szerkezetűek, melyre a síknégyzetes nikkell(II)komplexekre jellemző sárgás oldat elektrongerjesztési színekéből is következtethetünk. A $[\text{NiH}_1\text{L}]^-$ komplex képződésével párhuzamosan nő a 426 nm hullámhosszához tartozó abszorpciós csúcs, melynek maximumát 8,05-ös pH-n éri el, ahol az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S}^-)$ koordinációs módú $[\text{NiH}_1\text{L}]^-$ és a $[\text{NiH}_2\text{L}]^{2-}$ komplexek vannak jelen.

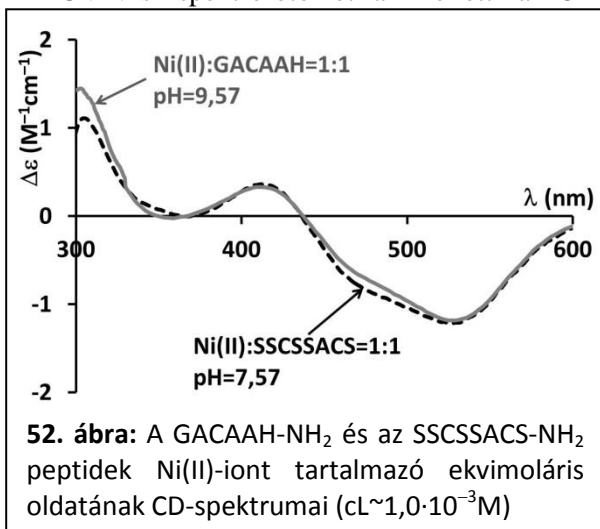
A $[\text{NiH}_2\text{L}]^{2-}$ és a $[\text{NiH}_1\text{L}]^-$ komplexek koordinációs módja azonos, különbség csak a C-terminális tiolcsoport protonáltsági fokában van. A $\text{p}K(\text{NiH}_1\text{L}/\text{NiH}_2\text{L}) = 8,55$ értéke közel azonos a szabad ligandum tiolcsoportjára jellemző $\text{p}K$ értékek átlagával (8,45), ami alátámasztja azt, hogy a komplexképződésben a C-terminális tiolátcsoport nem vesz részt.

A 8,05-ös pH-n a 423 nm-en számolt moláris abszorpciós tényező $323,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ értékű. Ez a sáv a felhasadt d-pályák közötti elektronátmenetnek felel meg (d-d átmenet). Összehasonlítva az SSCSSACS-NH₂ és a GGC, illetve AAC ligandumok $[\text{NiH}_2\text{L}]^{2-}$ komplexeinek UV-Vis spektrális adatait (29. táblázat), az értékek közel állnak egymáshoz, mely alátámasztja az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S}^-)$ koordinációs módot.

29. táblázat: A ligandumok $[\text{NiH}_2\text{L}]^{2-}$ komplexeinek UV-Vis spektrális adatai. (fém : ligandum = 1:1 arány)

| | SSCSSACS-NH ₂ | | GGC [73] | | AAC [55] | |
|-------------------------------------|--------------------------|---|-------------------|---|-------------------|---|
| | λ (nm) | ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) | λ (nm) | ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) | λ (nm) | ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) |
| d-d átmenet | 536 | 55 | 520 | 124 | | |
| d-d átmenet | 426 | 320 | 410 | 336 | 422 | 330 |
| S _x →Ni töltésátvitel | 334 | 230 | 335 | 304 | | |

Az UV-Vis spektrofotometria mellett a CD-spektroszkópiás vizsgálatok is

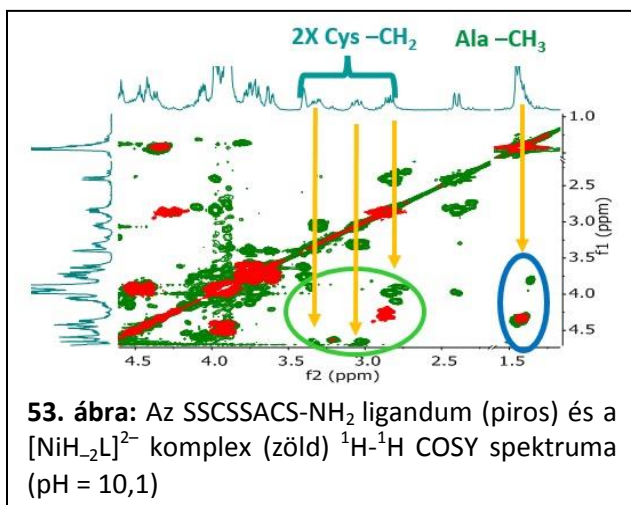


egyértelműen alátámasztják, hogy amíg a C-terminális tiolcsoport protonált, addig a kötőhelyet az N-terminális (NH₂,N⁻,N⁻,S⁻) donor-csoportok jelentik. Ezt bizonyítja az is, hogy a korábban vizsgált

Ni(II):GACAAH-NH₂ (NH₂,N⁻,N⁻,S⁻) koordinációs módú [NiH₁L]⁻ komplexének

9,57-es pH-n felvett CD-spektruma [163] gyakorlatilag megegyezik a Ni(II)-SSCSSACS-NH₂ rendszer [NiH₁L]⁻ komplexének CD-spektrumával (**52. ábra**).

A koordinációmódok további igazolására NMR spektroszkópiás vizsgálatokat



végeztünk. Az **53. ábra** az ekvimoláris oldatban pH=10,1-nél felvett ¹H-¹H COSY NMR spektrumot mutatja be, ahol már ekvimoláris oldatban is megjelenik a [NiH₂L]²⁻ komplex mellett a kétmagvú részecske. A 2D spektrum segítségével azonosítani

tudtuk a legtöbb jelet, ám az öt szerin aminosavból négynek azonos a kémiai környezete, így csak az ötödik, N-terminális szerin -CH₂ és -CH csoportjait tudtuk egyértelműen asszignálni. Míg a szabad ligandum spektrumában az N-terminális szerin -CH₂ csoportját kivéve a többi szerin -CH₂ és -CH jelei egy multipllett jelként jelennek meg, addig a nikkell(II)-iont is tartalmazó rendszerben egy másik szerin -

CH₂ és -CH jelei is eltolódnak. Ez alátámasztja azt, hogy a komplex kialakulásában részt vesz az N-terminális rész is.

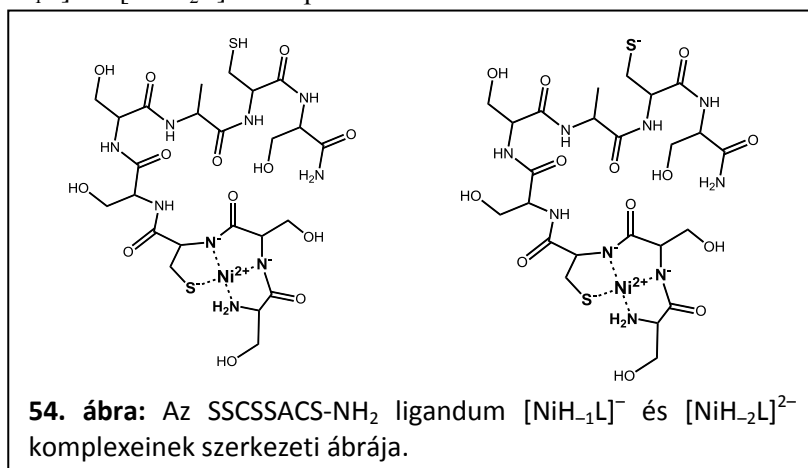
Ugyanakkor a komplexben található mindkét cisztein aminosav tiolcsoportjának jelei felhasadnak, illetve eltolódnak a szabad ligandum jeleihez képest, melynek értékeit a 30. táblázat tartalmazza.

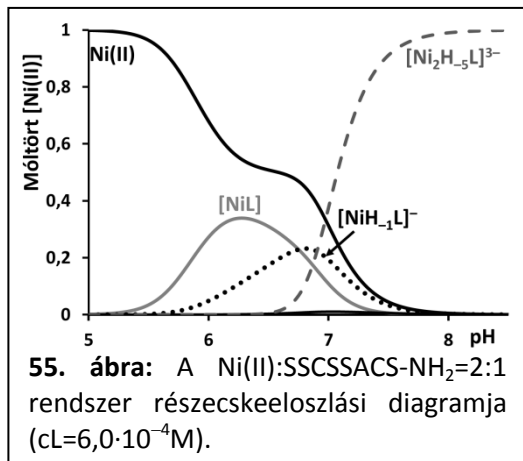
30. táblázat: az SSCSSACS-NH₂ ligandum és a L-Ni(II)=1:1 arányú rendszer ¹H NMR spektrumaiban lévő Cys -CH₂ jeleinek eltolódása a pH függvényében (c_L=0,05 mol/dm³, T = 298 K)

| SSCSSACS-NH ₂ | | SSCSSACS-NH ₂ : Ni(II) = 1:1 | |
|--------------------------|-----------------|---|--------------------------|
| pH | eltolódás (ppm) | pH | eltolódás (ppm) |
| 5,3 | 2,95 és 3,21 | 6,1 | 3,02; 3,23 és 3,31 |
| 8,0 | 2,90 | 8,0 | 2,41; 2,84; 3,06 és 3,30 |
| 10,2 | 2,86 és 2,87 | 10,2 | 2,42; 2,83; 3,06 és 3,31 |

Ezt a felhasadást és eltolódást az egymagvú és kétmagvú komplexek jelenléte okozza. Szintén a kétmagvú komplex jelenlétét támasztja alá az, hogy a Ni(II)-iont tartalmazó rendszer ¹H NMR spektrumában az alanin -CH₃ jele nem csak eltolódik, hanem fel is hasad a szabad ligandum jelével ellentétben, mely a két különböző koordinációs módú komplexhez tartozik.

Az [NiH₁L]⁻ és [NiH₂L]²⁻ komplexek feltételezett szerkezete a 54. ábrán látható.



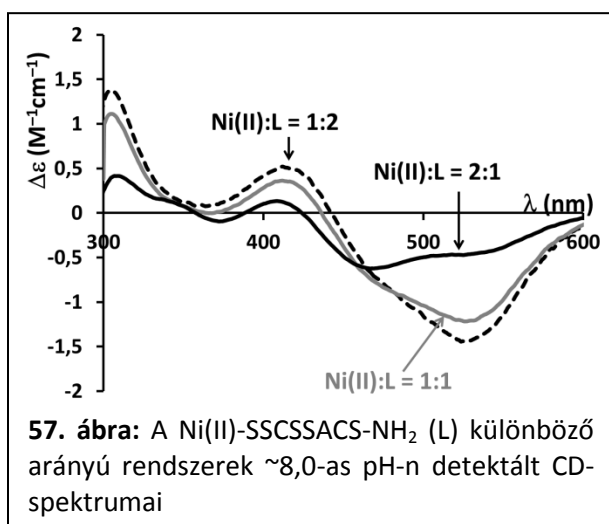
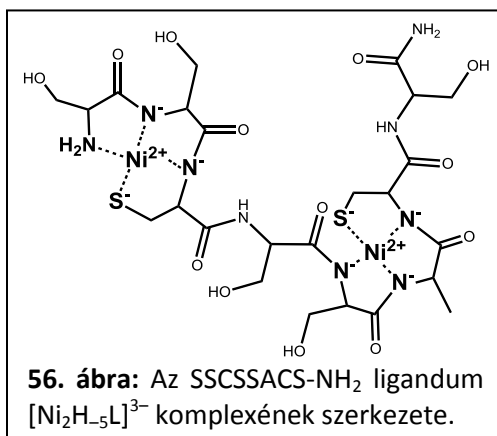


Nikkell(II)ion felesleget tartalmazó oldatban ~ 8,0-as pH-n kialakul a kétmagvú [Ni₂H₅L]³⁻ komplex, melyben a ligandum N- terminális és a C-terminális donorcsoportjai is megkötnek egy-egy Ni(II)-iont (NH₂,N⁻,N⁻,S⁻) és (S⁻,N⁻,N⁻,N⁻) donatoromokkal. Ahogy a részecskeeloszlási diagram is mutatja (55. ábra), ez az uralkodó részecske a

lúgos pH-tartományban, ahol a nikkell(II)ion koordinációs szférája telített.

Az 56. ábrán látható [Ni₂H₅L]³⁻ komplex feltételezett szerkezete.

Az 57. ábrán láthatóak a Ni(II):SSCSACS-NH₂=1:2, 1:1 és 2:1 arányú rendszerek ~8,0-as pH-n felvett CD-spektrumai, amelyek azt tükrözik, hogy a Ni(II):ligandum=1:2 és 1:1 rendszerek spektrumai közel azonosak, mivel ennél a két aránynál az uralkodó



részecske a [NiH₁L]⁻ komplex. Ezekhez képest a nikkell(II)ion felesleget tartalmazó oldat spektruma eltér. Ez megerősíti a kétmagvú komplexek jelenlétét a fémion felesleget tartalmazó oldatban.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Az élő szervezetekben bizonyos fémionok, például a cink(II)ion létfontosságú szerepet tölt be akár az enzimaktiválásban, a redoxireakciókban, vagy éppen a szerkezetalakításban. Egyes fémionokhoz, köztük a nikkel(II)ionhoz az emberi szervezetben nem társítottak létfontosságú szerepet, de mikroorganizmusokban, baktériumokban számos enzim szükséges alkotóeleme (pl. Ni-SOD enzim, CO-dehidrogenáz, ureáz enzim...), így nem zárható ki, hogy nagyon kis koncentrációban akár az emberi szervezetben is lehet létfontosságú szerepe. Ezzel szemben bizonyos fémionokat, mint például az ólom(II)- és kadmium(II)iont a toxikus fémionok közé soroljuk. Ezek képesek kiszorítani és helyettesíteni a létfontosságú fémionokat, meggátolva, illetve megváltoztatva azok funkcióját.

Célom volt olyan kistagszámú, változatos donorcsoportokat tartalmazó peptidek ólom(II)-, kadmium(II)-, nikkel(II)- és cink(II) rendszereinek szisztematikus vizsgálata, mely során feltérképezzük a toxikus, létfontosságú, és biológiailag „semleges” fémionok koordinációs kémiáját, ami lehetőséget ad az Pb(II), illetve Cd(II) szelektív megkötésére alkalmas peptidek szekvenciájának tervezésére.

Így munkám során olyan peptideket vizsgáltam, melyek donorcsoportjaik (karboxilát-, tiolát- és aminocsoport) révén képesek megkötni a toxikus fémionokat (az Pb(II)- és Cd(II)-iont). A vizsgált peptideket három csoportba oszthatjuk: aszparaginsav-tartalmú peptidek, cisztein-tartalmú peptidek, és N-terminálisan védett, cisztein-tartalmú peptidek. Egyes peptidek esetében pedig kontrollként vizsgáltam azok Zn(II)- és Ni(II)-ion megkötőképességét.

Kutatásom első részében azt vizsgáltam, hogy az oldalláncbeli karboxilátcsoportok hogyan befolyásolják a kistagszámú peptidek (di-, tri- és tetrapeptidek) ólom(II)ion megkötő képességét. Ennek során a GlyAsp, az AspAsp, az AspAspAsp és az AspAspAspAsp Pb(II)-ionnal alkotott komplexeit tanulmányoztam.

Megállapítottam, hogy minden esetben csak 1:1 összetételű, mononukleáris komplexek keletkeztek, biszkomplexet kimutatni nagy ligandumfelesleg esetén sem tudtunk. A protonált részecskékben csak az O-donoratomok vesznek részt, míg az [PbL] komplexben már az N-terminális aminocsoport is koordinálja a fémiont. A

komplexek stabilitási állandóiból egyértelműen megállapítottuk, hogy a karboxilátcsoportok számának növekedésével a keletkező komplexek stabilitása is növekedik. Ezen peptidok komplexeinek stabilitását összehasonlítva a kutatócsoportunkban korábban már vizsgált fémionokkal, megállapíthatjuk, hogy a legnagyobb stabilitású komplexeket a Cu(II) és Ni(II) képezi. Az Pb(II)-, a Zn(II)-, illetve a Co(II)-ionok közel azonos stabilitással alakítanak ki komplexeket, míg a vizsgált fémionok közül a Cd(II)-ionnal alakulnak ki a legkisebb stabilitású komplexek. Ezek alapján a stabilitási sorrend a következő: Cu(II) > Ni(II) > Pb(II) ~ Zn(II) ~ Co(II) > Cd(II).

Kutatómunkámat a cisztein-tartalmú peptidok ólom(II)komplexeinek vizsgálatával folytattam, több esetben kiegészítve a Ni(II)-, Cd(II)- és Zn(II)-komplexek vizsgálatával. A vizsgált peptidok első csoportját az egy- és két ciszteint tartalmazó N-terminálisan védett peptidok (Ac-AAAC-NH₂, Ac-SAAC-NH₂, Ac-CGAD-NH₂, Ac-CGAH-NH₂, Ac-CGAK-NH₂, Ac-SCCS-NH₂, Ac-CSC-NH₂, Ac-CGSC-NH₂, Ac-CSSC-NH₂ és Ac-CSSACS-NH₂) jelentették. Célunk volt feltérképezni azt, hogy a különböző környezetű egy- vagy több ciszteint tartalmazó peptidoknak hogyan változik a fémionmegkötő képessége, mely modellként használható a nagyobb tagszámú cisztein-tartalmú peptidok komplexképződésének vizsgálatához.

Megállapítottam, hogy az egy ciszteint tartalmazó peptidok ólom(II)komplexeiben csak a tiolátcsoport vesz részt a koordinációban, még akkor is, ha a ligandumban más donoratómot tartalmazó aminosav (lizin vagy hisztidin) is található. Néhány esetben kialakulnak a biszkomplexek is, sőt triszkomplexek képződése sem zárható ki. A komplexek jellemzően polimer szerkezetűek, melyet a fotometriás vizsgálatok egyértelműen alátámasztanak, az UV-spektrumokban megjelennek a két-, illetve három koordinált kénatomra jellemző abszorpciós maximumok.

Amennyiben a peptidben két cisztein is található, úgy mindkét aminosav tiolátcsoportja részt vesz a komplexképződésben. Biszkomplex képződését csak az Ac-SCCS-NH₂ ligandum esetében feltételeztünk, de egyik esetben sem zárhatjuk ki a polimer szerkezetű komplexek jelenlétét sem.

Az egy- és két ciszteint tartalmazó peptidok ólom(II)komplexeire vonatkozó pM értékekből ($c_L=1\cdot 10^{-5}$ M, $c_M=1\cdot 10^{-6}$ M, pH=7,4) egyértelműen látszik, hogy a két

ciszteint tartalmazó peptidek sokkal erősebben kötik meg az ólom(II)iont, mint az egy ciszteint, illetve az egy ciszteint és egy másik donorcsoportot is tartalmazó N-terminálisan védett peptidek.

Az Ac-SAAC-NH₂, az Ac-AAAC-NH₂, és az Ac-CSSACS-NH₂ peptidek Cd(II)- és Zn(II)-ionnal minden esetben bisz- vagy triszkomplexeket képeznek, ám Ni(II)-ion jelenlétében csak monokomplexek alakulnak ki. A triszkomplexek megjelenésére csak a spektrofotometriás adatokból tudunk következtetni. A nikkel(II)ion számára szintén a cisztein tioláts csoportja a horgonycsoport, de ebben az esetben a Ni(II) képes az amidnitrogének deprotonálódását elősegíteni, így ~11,0-es pH felett már a (S⁻,N⁻,N⁻,N⁻) koordinációs mód a jellemző. A két ciszteint tartalmazó peptidek esetén a [NiH₂L]²⁻ komplexben az egy ciszteint tartalmazó peptidekkel ellenben a koordináció az (S⁻,N⁻,N⁻,S⁻) donorcsoportokon keresztül valósul meg, és csak nagyobb pH-n, a [NiH₃L]³⁻ kialakulásával lép ki az egyik kén donoratomból a koordinációs szférából. A kapott eredményeket a CD-spektroszkópiás mérések egyértelműen alátámasztják.

A kutatásom harmadik részébe a szabad N-terminálisú -CXXXC- motívumú CSSACS-NH₂, ACSSACS-NH₂ és SSCSSACS-NH₂ peptidek Pb(II)- és Ni(II)-ionnal alkotott komplexeinek vizsgálatai tartoznak. Az oktapeptid esetében a vizsgálatokat kiterjesztettük a Cd(II)- és Zn(II)-ionokra is.

Az ólom(II)ion nagy stabilitású komplexeket képez mindhárom oligopeptiddel, a komplexek összetétele igen hasonló egymáshoz mindhárom esetben, ám a koordinációs módokban vannak eltérések. A CSSACS-NH₂ peptid [PbL] komplexének stabilitása nagyobb a másik két peptid [PbL] komplexének stabilitásához képest, ami a ligandum stabil háromfogú koordinációjának köszönhetően. Ha a -CXXXC- szekvencia távolabb van a molekula N-terminális részétől, az (S⁻,S⁻) donoratomból a fő kötőhely és az N-terminális aminocsoport koordinációban való részvétele jelentősen lecsökken, vagy akár elhanyagolható. A biszkomplexek kialakulását csak az ACSSACS-NH₂ és az SSCSSACS-NH₂ peptidek esetében figyeltük meg. A legfőbb különbség ezen biszligandum komplexek között az, hogy az Pb(II)-ionhoz 3S⁻ donoratomból keresztül koordinálódik a ligandum, míg a Cd(II) és Zn(II) esetében a CdH_xL₂ és a ZnH_xL₂

komplexekre a $2x(S^-,S^-)$ ($x = 0-2$) koordinációs mód a jellemző, melyre magyarázat a kialakuló komplexek eltérő geometriája.

Ni(II)-iont tartalmazó rendszerben a CSSACS-NH₂ peptid esetén csapadékképződés miatt pH-potenciometriás módszerrel csak a $[NiH_2L_2]$ komplexet tudtuk meghatározni, melyben a koordinációs mód: $2X(NH_2,S^-)$. A híg oldatok spektrofotometriás vizsgálata ugyanakkor azt is tükrözte, hogy a második cisztein tiolcsoportjának deprotonálódásával párhuzamosan polimer szerkezetű komplexek is képződnek. A híg oldatok CD-spektroszkópiás vizsgálata pedig azt igazolta, hogy erősen lúgos pH-tartományban a C-terminális cisztein lesz a fő kötőhely a Ni(II)-ion számára és (S^-,N^-,N^-,S^-) vagy (N^-,N^-,N^-,S^-) koordinációs módú komplexek képződnek.

Az ACSSACS-NH₂ ligandumban az N-terminális rész a fő kötőhely a Ni(II)-ion számára, a fémiont az (NH_2,N^-,S^-) donorcsoportok koordinálják. Ezzel a koordinációval azonban nem telítődik a Ni(II)-ion koordinációs szférája. Így ligandumfelesleg esetén biszkomplex képződik, ahol a második ligandum a tiolátcsoport két donoratomján keresztül telíti a fémion koordinációs szféráját, míg ekvimoláris oldatban két (NH_2,N^-,S^-) koordinálta egység kapcsolódik tioláthídon keresztül dimer szerkezetű komplexek kialakulásával. Lúgos pH-tartományban a C-terminális rész tiolcsoportjának deprotonálódását követően ez a csoport telíti a Ni(II) koordinációs szféráját, megbontva a ligandumfelesleg jelenlétében kialakuló biszkomplexet, illetve az ekvimoláris oldatban képződött dimer szerkezetű komplexeket. Fémion felesleg jelenlétében az ACSSACS-NH₂ és az SSCSSACS-NH₂ peptideknél is mind az N-terminális rész, mind a C-terminális tiolátcsoport kötőhelyet jelentenek a fémionok számára, így lehetőség van kétmagvú komplexek képződésére. Amennyiben a tiolátcsoport a harmadik helyen van, szintén az N-terminális rész az elsődleges kötőhely a Ni(II)-ion számára, és az (NH_2,N^-,N^-,S^-) donorcsoportok telítik a Ni(II) koordinációs szféráját, így széles pH-tartományban az egymagvú $[NiH_1L]^-$ komplex az uralkodó részecske. Ugyanakkor az oktapeptid esetén 9-es pH fölött ekvimoláris oldatban is jelentős mennyiségben megjelenik a kétmagvú részecske.

Összességében megállapíthatjuk, hogy a két ciszteint tartalmazó peptidek nagy stabilitással kötik az Pb(II) és Cd(II)-ionokat. A kistagszámú védett peptidek azonban a rosszul oldódó komplexek képződése miatt önmagukban nem alkalmasak a fenti két fémion szelektív megkötésére, ugyanakkor a két ciszteint tartalmazó motívumot beépítve egy nagyobb peptidmolekulába, már szelektivitás érhető el. Azok a peptidek képesek leginkább szelektíven megkötni az Pb(II)- és Cd(II)-ionokat a létfontosságú Zn(II)-ionnal szemben, amelyben a ciszteinek egymáshoz két vagy három aminosav távolságban helyezkednek el az N-terminális aminocsoporttól távolabb, így kötőhelyként gyakorlatilag csak a cisztein oldalláncbeli tiolátcsoportjai szolgálnak. Ezek ismeretében olyan peptidek tervezése és szintézise irányába érdemes a vizsgálatokat folytatni, amelyekben a két cisztein mellett további oldalláncbeli donorcsoportot tartalmazó aminosavakat építünk, ami lehetővé teszi a peptid fémionkötő képességének finomszabályozását is.

6. SUMMARY

In living organisms, certain metal ions, such as zinc(II)ion, play an essential role in either enzyme activation, redox reactions, or even structural transformation. Some metal ions, including nickel (II) ions, have not been associated with an essential role in the human body, but are essential components of many enzymes in microorganisms and bacteria (eg Ni-SOD enzyme, CO dehydrogenase, urease enzyme ...), so it cannot be excluded that they can play a vital role in the human body at very low concentrations. However, certain metal ions such as lead(II)- and cadmium(II)ions are classified as toxic metal ions. They can displace and substitute vital metal ions, inhibiting or altering their function.

My goal was to systematically investigate the lead(II), cadmium(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of small peptides with diverse donor groups, in order to map the coordination of toxic, vital and biologically "neutral" metal ions, providing a possibility to design sequences of peptides with selective bindings towards Pb(II) and Cd(II).

Therefore, during my work, I studied peptides that are can bind toxic metal ions (Pb (II) and Cd (II) ions) through their donor groups (carboxylate, thiolate and amine). The investigated peptides can be divided into three groups: peptides containing aspartic acid, cysteine-containing peptides, and N-terminally protected cysteine-containing peptides. In the case of some peptides, the binding ability to Zn(II) and Ni(II) were tested for comparison.

In the first part of my research work, I studied the effect of side chain carboxylate groups on the binding ability of small peptides (GlyAsp, AspAsp, AspAspAsp and AspAspAspAsp) towards the lead(II)ion.

It was found that in each case only 1: 1 mononuclear complexes were formed, and the existence of bis complexes was not detected even in case of a large excess of ligand. In the protonated species only the O-donor atoms are bound, while in the [PbL] complex the N-terminal amino group also coordinates the metal ion. Based on the stability constants of the complexes, it was clearly established that as the number of carboxylate groups increased, the stability of the resulting complexes also

increased. From the comparison of the stability of the complexes with those of the previously studied peptides, it can be concluded that the most stable complexes are formed with Cu(II) and Ni(II). Pb(II) -, Zn(II)- and Co(II) ions with almost the same stability, while Cd(II) ion forms the least stable complexes. Based on these results the stability order is the following: Cu(II) > Ni(II) > Pb(II)~Zn(II)~Co(II) > Cd(II).

I continued my research work by examining the lead(II) complexes of cysteine-containing peptides, in some cases completed with the analysis of Ni(II), Cd(II) and Zn(II) complexes. The first group of peptides was the N-terminally protected peptides containing one and two cysteines (Ac-AAAC-NH₂, Ac-SAAC-NH₂, Ac-CGAD-NH₂, Ac-CGAH-NH₂, Ac-CGAK-NH₂, Ac-SCCS-NH₂, Ac-CSC-NH₂, Ac-CGSC-NH₂, Ac-CSSC-NH₂ and Ac-CSSACS-NH₂). Our goal was to find out how the metal ion binding ability of peptides is related to their sequence. Moreover these peptides serve as a model for larger membered cysteine containing peptides.

We have found that only the thiolate group is involved in the binding of lead(II) ion, even if the ligand contains an amino acid (lysine or histidine) with another donor group. In some cases, bis(ligand)complexes are also formed, and even the formation of tris(ligand) complexes cannot be excluded. Typically, the complexes have a polymeric structure, which is clearly confirmed by UV spectrophotometric measurements.

If two cysteines are present in the peptide, the thiolate groups of both amino acids are involved in the complex formation. The formation of the bis(ligand) complex was assumed only in the case of the Ac-SCCS-NH₂ ligand, but the presence of polymer structured complexes cannot be excluded in any of cases.

From the pM values for lead(II) complexes of one and two cysteine-containing peptides ($c_L = 1 \cdot 10^{-5}$ M, $c_M = 1 \cdot 10^{-6}$ M, pH = 7,4), it is clear that the peptides with the two cysteines binds lead(II)ions much more strongly than N-terminally protected peptides containing one cysteine or one cysteine and another donor group.

In the Cd(II)- and Zn(II)-Ac-SAAC-NH₂, Ac-AAAC-NH₂, and Ac-CSSACS-NH₂ systems bis- or tris(ligand) complexes are formed, but in the presence of Ni(II)ion only mono complexes are present.

For the nickel(II) ion the cysteine thiolate group behaves as an anchor group, and the Ni(II) is able to promote the deprotonation of the amide nitrogens, above pH > 11,0. The coordination mode is: (S⁻,N⁻,N⁻,N⁻). Within the [NiH₂L]²⁻ complex, in the case of two cysteine-containing peptides, as opposed to their one cysteine-containing counterparts, coordination happens via the (S⁻,N⁻,N⁻,S⁻) donor set. At higher pH the N-terminal thiolate sulphur is substituted with amide nitrogen donoratom resulting in [NiH₃L]³⁻ species. [NiH₃L]³⁻. The results obtained are clearly confirmed by CD spectroscopy measurements.

The third part of my research was to study the Pb(II) and Ni(II) complexes of free N-terminal CSSACS-NH₂, ACSSACS-NH₂ and SSCSSACS-NH₂ peptides with -CXXXC- motif. For octapeptide, the studies were extended to Cd(II) and Zn(II) ions.

Lead(II) ion forms highly stable complexes with all three oligopeptides, the stoichiometry of the complexes is similar in all three cases, but there are differences in coordination modes. The stability of the [PbL] complex of the CSSACS-NH₂ peptide is higher than that of the other two peptides due to the stable tridental coordination of the ligand. If the -CXXXC- sequence is farther away from the N-terminal part of the molecule, the (S⁻,S⁻) donor set is the primary binding site and the participation of N-terminal amino group. The formation of bis-ligand complexes was observed for ACSSACS-NH₂ and SSCSSACS-NH₂ peptides. The main difference between the bis(ligand) metal complexes is that the ligand is coordinated to the Pb(II) ions via 3S⁻ donor atoms, while for Cd(II) and Zn(II) CdH_xL₂ and ZnH_xL₂ (x = 0-2) are present with the 2x(S⁻, S⁻) coordination mode, owing to the different geometry of the complexes.

In the the Ni(II)-CSSACS-NH₂ system, only the [NiH₂L₂] complex was determined because of the precipitation. The coordination mode of this complex is: 2x(NH₂,S⁻). The spectrophotometric analysis of diluted solutions also reflected the formation of polynuclear complexes in parallel with the deprotonation of the second thiol group of cysteine. The CD spectroscopy of dilute solutions showed that in the strongly alkaline pH range, the C-terminal cysteine would be the major binding site for the Ni(II) ion and (S⁻, N⁻, N⁻, S⁻) or (N⁻, N⁻, N⁻, S⁻) coordinated complexes are formed.

In the case of ACSSACS-NH₂ ligand, the N-terminal part is the major binding site for the Ni(II) ion, the metal ion is coordinated by the (NH₂, N⁻, S⁻) donor groups. However, this coordination does not saturate the coordination sphere of the Ni(II) ion. Thus, in the presence of a ligand excess, a bis complex is formed, where the second ligand saturates the metal ion coordination sphere through the sulfur donor atom of the thiolate group, whereas in the equimolar solution two (NH₂, N⁻, S⁻) coordinate units are connected via thiol bridge forming dimeric complexes. In the alkaline pH range, after the deprotonation of the thiol group of the C-terminal part, this group saturates the Ni(II) coordination sphere, disrupting the bis(ligand) complex formed in the presence of the ligand excess and the dimeric complexes existing in the equimolar solution. In the presence of excess metal ion, both the N-terminal part and the C-terminal thiolate group of the ACSACS-NH₂ and SSCSSACS-NH₂ peptides serve as a binding site for the metal ions, and dinuclear complexes are formed. If the thiolate group is in the third position, the N-terminal part is the primary binding site for the Ni(II) ion, and the (NH₂, N⁻, N⁻, S⁻) donor groups saturate the Ni(II) coordination sphere. Thus, in a wide pH range, the mononuclear [NiH₁L] complex dominates. In equimolar solution of the octapeptide, however, a significant amount of dinuclear species was also formed above pH 9.

To sum up the two cysteine-containing peptides can bind Pb(II) and Cd(II) ions with high stability. However, the small peptides with protected N-termini alone are not suitable for selective binding of the two aforementioned metal ions due to the formation of poorly soluble complexes. By building of two cysteine containing motifs into a larger peptide molecule, higher selectivity can be achieved.

The peptides most capable of the selective binding of Pb(II) and Cd(II) ions compared with the essential Zn(II) ion are those, in which the cysteines are spaced apart at two or three amino acid distances away from the N-terminal amino group, thus practically only the cysteine side chain thiolate groups serves as binding site.

Having acquired these informations, it is worthwhile to continue the design and synthesis of peptides in which in addition to the two cysteines other amino acid residues containing side chain donors are present, which also makes it possible to fine-tune the metal ion binding ability of the peptide.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] E.S. Claudio, H. Arnold Godwin, J.S. Magyar, *Fundamental Coordination Chemistry, Environmental Chemistry, and Biochemistry of Lead(II)*, Progress in Inorganic Chemistry, 51 (2003) 1-144.
- [2] P.G. Harrison, *The structural chemistry of bivalent germanium, tin and lead*, Coordination Chemistry Reviews, 20 (1976) 1-36.
- [3] R.B. Martin, *Metal ion stabilities correlate with electron affinity rather than hardness or softness*, Inorganica Chimica Acta, 283 (1998) 30-36.
- [4] N.C. Li, R.A. Manning, *Some Metal Complexes of Sulfur-containing Amino Acids*, Journal of the American Chemical Society, 20 (1955) 5225-5228.
- [5] G.R. Lenz, A.E. Martell, *Metal Chelates of Some Sulfur-containing Amino Acids*, Biochemistry, 3 (1964) 745-750.
- [6] K. Nag, P. Banerjee, *Equilibrium studies on metal-peptide systems—I: Polarographic determination of association constants of cadmium(II), zinc(II) and lead(II) complexes of glycylglycine*, Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, 36 (1974) 2145-2149.
- [7] D.L. Rabenstein, B.J. Fuhr, *Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. IV. Kinetics of partial dissociation of the cadmium and zinc complexes of 1,3-propylenediaminetetraacetic acid*, Inorganic Chemistry, 11 (1972) 2430-2435.
- [8] D.A. Gidlow, *Lead toxicity*, Occupational Medicine, 54 (2004) 76-81.
- [9] D. Seyferth, *The Rise and Fall of Tetraethyllead. 2.*, Organometallics, 22 (2003) 5154-5178.
- [10] B.P. Lanphear, K. Dietrich, P. Auinger, C. Cox, *Cognitive deficits associated with blood lead concentrations <10 microg/dL in US children and adolescents*, Public Health Reports, 115 (2000) 521-529.
- [11] V. Shukla, P. Shukla, A. Tiwari, *Lead poisoning*, Indian Journal of Medical Specialities, 9 (2018) 146-149.
- [12] M. Blanusá, V. M. Varnai, M. Piasek, K. Kostial, *Chelators as Antidotes of Metal Toxicity: Therapeutic and Experimental Aspects*, Current Medicinal Chemistry, 12 (2005) 2771-2794.
- [13] J.M. Ordemann, R.N. Austin, *Lead neurotoxicity: exploring the potential impact of lead substitution in zinc-finger proteins on mental health*, Metallomics, 8 (2016) 579-588.
- [14] D.J. Hare, N.G. Faux, B.R. Roberts, I. Volitakis, R.N. Martins, A.I. Bush, *Lead and manganese levels in serum and erythrocytes in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: results from the Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle Flagship Study of Ageing*, Metallomics, 8 (2016) 628-632.
- [15] M. Damek-Poprawa, K. Sawicka-Kapusta, *Histopathological changes in the liver, kidneys, and testes of bank voles environmentally exposed to heavy metal emissions from the steelworks and zinc smelter in Poland*, Environmental Research, 96 (2004) 72-78.
- [16] F. Khalil-Manesh, H.C. Gonick, E.W.J. Weiler, B. Prins, M.A. Weber, R.E. Purdy, *Lead-Induced Hypertension: Possible Role of Endothelial Factors*, American Journal of Hypertension, 6 (1993) 723-729.

- [17] J. Bressler, K. Kim, T. Chakraborti, G. Goldstein, *Molecular Mechanisms of Lead Neurotoxicity*, *Neurochemical Research*, 24 (1999) 595-600.
- [18] O. Andersen, *Principles and Recent Developments in Chelation Treatment of Metal Intoxication*, *Chemical Reviews*, 99 (1999) 2683-2710.
- [19] J. Aaseth, O.P. Ajsuvakova, A.V. Skalny, M.G. Skalnaya, A.A. Tinkov, *Chelator combination as therapeutic strategy in mercury and lead poisonings*, *Coordination Chemistry Reviews*, 358 (2018) 1-12.
- [20] G. Bjorklund, J. Mutter, J. Aaseth, *Metal chelators and neurotoxicity: lead, mercury, and arsenic*, *Archives of Toxicology*, 91 (2017) 3787-3797.
- [21] T. Kitazawa, T. Kikuyama, M. Takeda, T. Iwamoto, *Silica-mimetic polymorphism of the Cd(CN)₂ host lattice depending on the guest G in Cd(CN)₂·xG clathrates*, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (1995) 3715-3720.
- [22] J. Kim, D. Whang, Y.-S. Koh, K. Kim, Two new [Cd(CN)₂]_n frameworks with linear channels of large, elongated hexagonal cross-section: structures of cadmium cyanide-guest (guest = dmf and Me₂SO) clathrates, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (1994) 637-638.
- [23] I. Sóvágó, K. Várnagy, *Cadmium(II) Complexes of Amino Acids and Peptides*, in *Cadmium: From Toxicity to Essentiality*, A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel Editors. (2013) Springer Netherlands: Dordrecht. p. 275-302.
- [24] T. Umemura, Y. Wako, *Pathogenesis of Osteomalacia in Itai-itai Disease*, *Journal of Toxicologic Pathology*, 19 (2006) 69-74.
- [25] K. Byber, D. Lison, V. Verougstraete, H. Dressel, P. Hotz, *Cadmium or cadmium compounds and chronic kidney disease in workers and the general population: a systematic review*, *Critical Reviews in Toxicology*, 46 (2016) 191-240.
- [26] J.-C. Amiard, C. Amiard-Triquet, S. Barka, J. Pellerin, P.S. Rainbow, *Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers*, *Aquatic Toxicology* 76 (2006) 160–202.
- [27] M. J. Maroney, S. Ciurli, *Nonredox Nickel Enzymes*, *Chemical Reviews*, 114 (2014) 4206-4228.
- [28] J. B. Sumner, *The isolation and crystallization of the enzyme urease: preliminary paper*, *Journal of Biological Chemistry*, 69 (1926) 435-441.
- [29] D. Witkowska, M. Rowinska-Zyrek, G. Valensin, H. Kozłowski, *Specific poly-histidyl and poly-cysteil protein sites involved in Ni²⁺ homeostasis in Helicobacter pylori. Impact of Bi³⁺ ions on Ni²⁺ binding to proteins. Structural and thermodynamic aspects*, *Coordination Chemistry Reviews*, 256 (2012) 133-148.
- [30] D. J. Evans and C. J. Pickett, *Chemistry and the hydrogenases*, *Chemical Society Reviews*, 32 (2003) 268-275.
- [31] J. Wuerges, J.-W. Lee, Y.-I. Yim, H.-S. Yim, S.-O. Kang, K. D. Carugo, *Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (2004) 8569-8574.
- [32] J.G. Kusters, A.H.M. van Vliet, E.J. Kuiper, *Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection*, *Clinical Microbiology Reviews*, 19 (2006) 449–490.
- [33] M. Rowinska-Zyrek, D. Witkowska, D. Valensin, W. Kamysz, H. Kozłowski, *The C terminus of HspA—a potential target for native Ni(II) and Bi(III) anti-ulcer drugs*, *Dalton Transactions*, 39 (2010) 5814-5826.
- [34] L. Nyitáry, G. Pál, *A biokémia és molekuláris biológia alapjai* (2013) 235.
- [35] B.L. Vallee, *Zinc and Metalloenzymes*, *Advances in Protein Chemistry*, 10 (1955) 317-384.

- [36] E.E. Rickli, S.A.S. Ghazanfar, B.H. Gibbson, J.T. Edsall, *Carbonic Anhydrases from Human Erythrocytes*, The Journal of Biological Chemistry, 239 (1964) 1065-1078.
- [37] D.W. Christianson, *Carboxypeptidase A*, Accounts of Chemical Research, 22 (1989) 62-69.
- [38] D.W. Christianson, R.S. Alexander, *Carboxylate-histidine-zinc interactions in protein Structure and function*, Journal of the American Chemical Society, 111 (1989) 6412-6419.
- [39] K. Kluska, J. Adamczyk, A. Krezel, *Metal binding properties, stability and reactivity of zinc fingers*, Coordination Chemistry Reviews, 367 (2018) 18-64.
- [40] D.W. Christianson, *Structural biology of zinc*, Advances in Protein Chemistry, 42 (1991) 281-355.
- [41] I. Sóvágó, A. Gergely, B. Harman, T. Kiss, *Complexes of sulphur-containing ligands-II – Binary and ternary complexes of D-penicillamine and L-cysteine with nickel(II) and zinc(II) ions*, Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, 41 (1979) 1629-1633.
- [42] M. Raics, N. Lihi, A. Laskai, C. Kállay, K. Várnagy, I. Sóvágó, *Nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes of hexapeptides containing separate histidyl and cysteinyl binding sites*, New Journal of Chemistry, 40 (2016) 5420-5427.
- [43] N. Lihi, Á. Grenács, S. Timári, I. Turi, I. Bányai, I. Sóvágó, K. Várnagy, *Zinc(II) and cadmium(II) complexes of N-terminally free peptides containing two separate cysteinyl binding sites*, New Journal of Chemistry, 39 (2015) 8364-8372.
- [44] H. Dobbie, W.O. Kermack, *Complex-Formation between Polypeptides and Metals 3. The reaction between cupric ions and diglycylglycine*, Biochemical Journal, 59 (1955) 257-264.
- [45] R.B. Martin, M. Chamberlin, J.T. Edsall, *The Association of Nickel(II) Ion with Peptides*, Journal of the American Chemical Society, 82 (1960) 495-498.
- [46] I. Sóvágó, K. Ősz, *Metal ion selectivity of oligopeptides*, Dalton Transactions, (2006) 3841-3854.
- [47] R. Ferrari, S. Bernés, C.R. de Barbarin, G. Mendoza-Díaz, L. Gasque, *Interaction between Glyglu and Ca^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} and Zn^{2+} in solid state and aqueous solution. Crystal structures of poly[aqua-1,2- κ -O-di[lead(gly-gluH)]bis(perchlorate)] and poly[bisglycylglutamic-cadmium(II) tetrahydrate]*, Inorganica Chimica Acta, 339 (2002) 193-201.
- [48] H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowski, *Specific structure–stability relations in metallopeptides*, Coordination Chemistry Reviews, 184 (1999) 319-346.
- [49] I. Sóvágó, C. Kállay, K. Várnagy, *Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes*, Coordination Chemistry Reviews, 256 (2012) 2225-2233.
- [50] T.G. Appleton, *Donor atom preferences in complexes of platinum and palladium with amino acids and related molecules*, Coordination Chemistry Reviews, 166 (1997) 313-359.
- [51] R.B. Martin, and W.C. Hutton, *Predominant nitrogen-bound hydrogen exchange via Oxygen-protonated amide*, Journal of the American Chemical Society, 95 (1973) 4752-4754.
- [52] D.W. Appleton, T.P.A. Kruck, B. Sarkar, *A comparative study of Zn(II) and Co(II) binding to glycy-l-tyrosine, a pseudosubstrate for carboxypeptidase A*, Journal of Inorganic Biochemistry, 10 (1979) 1-8.

- [53] P. Tsiveriotis, N. Hadjiliadis, *Studies on the interaction of histidyl containing peptides with palladium(II) and platinum(II) complex ions*, Coordination Chemistry Reviews, 190-192 (1999) 171-184.
- [54] I. Sóvágó, T. Kiss, K. Várnagy, B. Decock-Le Révérend, *Cobalt(II) and zinc(II) complexes of cysteine containing dipeptides*, Polyhedron, 7 (1988) 1089-1093.
- [55] K. Cherifi, B. Decock-Le Reverend, K. Varnagy, T. Kiss, I. Sovago, C. Loucheux, H. Kozlowski, *Transition metal complexes of L-cysteine containing Di- and tripeptides*, Journal of Inorganic Biochemistry, 38 (1990) 69-80.
- [56] I. Sóvágó, E. Farkas, A. Gergely, *Studies on transition-metal-peptide complexes. Part 7. Copper(II) complexes of dipeptides containing L-histidine*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, (1982) 2159-2163.
- [57] C. Kállay, I. Sóvágó, K. Várnagy, *Nickel(II) complexes of oligopeptides containing aspartyl and glutamyl residues. Potentiometric and spectroscopic studies*, Polyhedron, 26 (2007) 811-817.
- [58] E.J. Billo, *Solution equilibria of copper(II) and nickel(II) complexes of leucyl tripeptides*, Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, 40 (1978) 1971-1972.
- [59] V. Józszai, I. Sóvágó, *Palladium(II) complexes of oligopeptides containing aspartyl and glutamyl residues*, Polyhedron, 30 (2011) 2114-2120.
- [60] T. Szabó-Plánka, Zs. Árkosi, A. Rockenbauer, L. Korecz, *An ESR study of the copper(II)-glycyl-L-serine and copper(II)-L-seryl-glycine systems by the simultaneous analysis of multi-component isotropic spectra. Formation constants and coordination modes*, Polyhedron, 20 (2001) 995-1003.
- [61] T. Kiss and Z. Szücs, *Studies on transition-metal-peptide complexes. Part 12. Copper(II) complexes of dipeptides containing phenylalanine and tyrosine*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions (1986) 2443-2447.
- [62] L.D. Pettit, I. Steel, T. Kowalik, H. Kozlowski, M. Bataille, *Specific binding of the tyrosine residue in copper(II) complexes of Tyr-Pro-Gly-Tyr and Tyr-Gly-Pro-Tyr*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions (1985) 1201-1205.
- [63] H. Kozlowski, *Spectroscopic and magnetic resonance studies on Ni(II), Cu(II) and Pd(II) complexes with Gly-Leu-Tyr and Tyr-Gly-Gly tripeptides*, Inorganica Chimica Acta, 31 (1978) 135-140.
- [64] L.D. Pettit, A.Q. Lyons, *Thermodynamics of formation of binuclear complexes of some sulphur-containing dipeptides with silver(I) and copper(II). Crystal structure of a methionyl-S-methylcysteine complex of copper(II)*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions (1986) 499-503.
- [65] B. Bóka, Z. Nagy, K. Várnagy, I. Sóvágó, *Solution equilibria and structural characterisation of the palladium(II) and mixed metal complexes of peptides containing methionyl residues*, Journal of Inorganic Biochemistry, 83 (2001) 77-89.
- [66] K. Várnagy, B. Bóka, I. Sóvágó, D. Sanna, P. Marras, G. Micera, *Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) and nickel(II) complexes of tripeptides of methionine*, Inorganica Chimica Acta, 275-276 (1998) 440-446.
- [67] W.J. Puspita, A. Odani, O. Yamauchi, *Copper(II)-dipeptide complexes containing an acidic and a basic amino acid residue. Side chain effects on structures and stabilities*, Journal of Inorganic Biochemistry, 73 (1999) 203-213.
- [68] G. Fusch, E.C. Hillgeris, B. Lippert, *Interaction of the lysine side chain amino group with CuII in (glycyl-L-lysine₂-)Cu*, Inorganica Chimica Acta, 217 (1994) 33-38.

- [69] P.G. Daniele, E. Prenesti, G. Ostacoli, *L- γ -glutamyl-L- ϵ -lysine and L-glutamyl-L- ϵ -lysine coordination properties towards copper(II) and nickel(II) in aqueous solution*, Journal of Inorganic Biochemistry, 61 (1966) 165-177.
- [70] C. Kállay, K. Várnagy, I. Sóvágó, D. Sanna, G. Micera, *Potentiometric and spectroscopic studies on transition metal complexes of GlyLys(Gly) and Asp- ϵ -Lys*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions (2002) 92-98.
- [71] O. Yamauchi, A. Odani, M. Takani, *Metal–amino acid chemistry. Weak interactions and related functions of side chain groups*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions (2002) 3411-3421.
- [72] C.G. Ágoston, K. Várnagy, A. Bényei, D. Sanna, G. Micera, I. Sóvágó, *Solution equilibria and structural characterisation of the transition metal complexes of glycyl-L-cysteine disulfide*, Polyhedron, 19 (2000) 1849-1857.
- [73] H. Kozłowski, B. Decock-Le Révérend, D. Ficheux, C. Loucheux, I. Sovago, *Nickel(II) complexes with sulfhydryl containing peptides. Potentiometric and spectroscopic studies*, Journal of Inorganic Biochemistry, 29 (1987) 187-197.
- [74] H. Kozłowski, J. Urbanska, I. Sóvágó, K. Várnagy, A. Kiss, J. Spichala, K. Cherifi, *Cadmium ion interaction with sulphur containing amino acid and peptide ligands*, Polyhedron, 9 (1990) 831-837.
- [75] N.C. Li, R.A. Manning, *Some Metal Complexes of Sulfur-containing Amino Acids*, Journal of American Chemical Society, 77 (1955) 5225-5228.
- [76] A. Krezel, W. Bal, *Coordination chemistry of glutathione*, Acta Biochimica Polonica 46 (1999) 567.
- [77] G. Brookes, L.D. Pettit, *Thermodynamics of formation of complexes of copper(II) and nickel(II) ions with glycylhistidine, β -alanylhistidine, and histidylglycine*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions (1975) 2112-2117.
- [78] E. Farkas, I. Sóvágó, A. Gergely, *Studies on transition-metal–peptide complexes. Part 8. Parent and mixed-ligand complexes of histidine-containing dipeptides*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions (1983) 1545-1551.
- [79] E. Farkas, I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely, *Studies on transition-metal–peptide complexes. Part 9. Copper(II) complexes of tripeptides containing histidine*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions (1984) 611-614.
- [80] S.L. Best, T.K. Chattopadhyay, M.I. Djuran, R.A. Palmer, P.J. Sadler, I. Sóvágó, K. Várnagy, *Gold(III) and palladium(II) complexes of glycylglycyl-L-histidine: crystal structures of $[AuIII(Gly-Gly-L-His-H_2)]Cl \cdot H_2O$ and $[PdII(Gly-Gly-L-His-H_2)] \cdot 1.5H_2O$ and $His\epsilon NH$ deprotonation*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions (1997) 2587-2596.
- [81] G.P. Glusker, *Structural Aspects of Metal Liganding to Functional Groups in Proteins*, Advances in Protein Chemistry, 42 (1991) 1-76.
- [82] E. Farkas, B. Bóka, B. Szócs, A.J. Godó, I. Sóvágó, *Effect of the types and arrangements of donor atoms on Pb(II) versus Zn(II) binding preference of selected amino acids, peptides and derivatives*, Inorganica Chimica Acta, 423 (2014) 242-249.
- [83] A. Gergely, E. Farkas, *Studies on transition-metal–peptide complexes. Part 6. Influence of side-chain donor group on the equilibrium and thermodynamics of binary and ternary copper(II)–dipeptide complexes*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions (1982) 381-386.
- [84] A.M. Corrie, M.L.D. Touche, D.R. Williams, *Thermodynamic considerations in coordination. Part XIV. Formation constants for lead(II)–amino-acid complexes and their use in computing the complexing competition between lead(II) and in vivo*

- essential metal ions, and in computer evaluation of ligands currently employed as lead(II) chelating therapeutics*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions (1973) 2561-2565.
- [85] Y. Khayat, M. Cromer-Morin, J-P. Scharff, *Stability constants for lead(II) complexes of glycine, serine, aspartic acid and glycyl-L-leucine*, Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, 41 (1979) 1496-1498.
- [86] G. Battistuzzi, M. Borsari, L. Menabue, M. Saladini, M. Sola, *Amide Group Coordination to the Pb²⁺ Ion*, Inorganic Chemistry, 35 (1996) 4239-4247.
- [87] N. Lihi, M. Lukács, M. Raics, G. Szunyog, K. Várnagy, C. Kállay, *The effect of carboxylate groups on the complexation of metal ion with oligopeptides – Potentiometric investigation*, Inorganica Chimica Acta, 472 (2018) 165-173.
- [88] M. Capdevila, R. Bofill, Ò. Palacios, S. Atrian, *State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century*, Coordination Chemistry Reviews, 256 (2012) 46– 62.
- [89] S.G. Bell, B.L. Vallee, *The Metallothionein/Thionein System: An Oxidoreductive Metabolic Zinc Link*, ChemBioChem, 10 (2009) 55.
- [90] D.L. Wong, M.E. Merrifield-MacRae, M.J. Stillman, *Lead(II) Binding in Metallothioneins*, Metal Ions in Life Sciences, 17 (2017) 241–269.
- [91] M.J. Stillman, *Metallothioneins*, Coordination Chemistry Reviews, 144 (1995) 461-511.
- [92] H.J. Church, J.P. Day, R.A. Braithwaite, S.S. Brown, *Binding of lead to a metallothionein-like protein in human erythrocytes*, Journal of Inorganic Biochemistry, 49 (1993) 55-68.
- [93] W. Qu, B.A. Diwan, J. Liu, R.A. Goyer, T. Dawson, J.L. Horton, M.G. Cherian, M.P. Waalkes, *The Metallothionein-Null Phenotype Is Associated with Heightened Sensitivity to Lead Toxicity and an Inability to Form Inclusion Bodies*, 160 (2002) 1047–1056.
- [94] Ó. Palacios, A. Leiva-Presa, S. Atrian, R. Lobinski, *A study of the Pb(II) binding to recombinant mouse Zn7-metallothionein I and its domains by ESI TOF MS*, Talanta, 72 (2007) 480–488.
- [95] W. Bernhard, M. Good, M. Vašák, J.H.R. Kägi, *Spectroscopic studies and characterization of metallothioneins containing mercury, lead and bismuth*, Inorganica Chimica Acta, 79 (1983) 154-155.
- [96] K.B. Nielson, C.L. Atkin, D.R. Winge, *Distinct metal-binding configurations in metallothionein*, Journal of Biological Chemistry, 260 (1985) 5342-5350.
- [97] Bóka Beáta, *Tioéter- és imidazolcsoportot tartalmazó peptidek fémkomplexeinek vizsgálata*, Doktori értekezés, Debrecen (2003).
- [98] M. Kirberger, J.J. Yang, *Structural differences between Pb²⁺- and Ca²⁺-binding sites in proteins: Implications with respect to toxicity*, Journal of Inorganic Biochemistry, 102 (2008) 1901–1909.
- [99] C.S. Fullmer, S. Edelstein, R.H. Wasserman, *Lead-binding properties of intestinal calcium-binding proteins*, Journal of Biological Chemistry, 260 (1985) 6816-6819.
- [100] H. Ouyang, H.J. Vogel, *Metal ion binding to calmodulin: NMR and fluorescence studies*, BioMetals, 11 (1998) 213-222.
- [101] L. Li, J. Wu, M. Zhao, Y. Wang, H. Zhang, X. Zhang, L. Gui, J. Liu, N. Mair, S. Peng, *Poly- α,β -DL-Aspartyl-L-Cysteine: A Novel Nanomaterial Having a Porous Structure, Special Complexation Capability for Pb(II), and Selectivity of Removing Pb(II)*, Chemical Research In Toxicology, 25 (2012) 1948-1954.

- [102] E. Stokstad, *Stalled Trial for Autism Highlights Dilemma of Alternative Treatments*, Science, 321 (2008) 326.
- [103] V. Pachauri, G. Saxena, A. Mehta, D. Mishra, S.J.S. Flora, *Combinational chelation therapy abrogates lead-induced neurodegeneration in rats*, Toxicology and Applied Pharmacology, 240, (2009) 255-264.
- [104] P.A. Meyer, M.J. Brown, H. Falk, *Global approach to reducing lead exposure and poisoning*, Mutation Research, 659 (2008) 166–175.
- [105] H. Zhang, Y. Wang, M. Zhao, J. Wu, X. Zhang, L. Gui, M. Zheng, L. Li, J. Liu, S. Peng, *Synthesis and In Vivo Lead Detoxification Evaluation of Poly- α,β -DL-aspartyl-L-methionine*, Chemical Research in Toxicology, 25 (2012) 471-477.
- [106] L. Gui, M. Zhao, Y. Wang, Y. Wang, Y. Qin, L. Lia, S. Peng, *Synthesis, nano-features, ex vivo anti-platelet aggregation and in vivo antithrombotic activities of poly- α,β -DL-aspartyl-L-arginine*, Medicinal Chemistry Communication, 3 (2012) 102-108.
- [107] I. Sóvágó, K. Várnagy, N. Lihi, Á. Grenács, *Coordinating properties of peptides containing histidyl residues*, Coordination Chemistry Reviews, 327–328 (2016) 43–54.
- [108] Á. Grenács, D. Sanna, I. Sóvágó, *Copper(II) and nickel(II) binding sites of peptide containing adjacent histidyl residues*, Journal of Inorganic Biochemistry, 151 (2015) 87–93.
- [109] P. Gockel, R. Vogler, H. Vahrenkamp, *Solution Behavior and Zinc Complexation of Dipeptides Made up Solely from Histidine and Cysteine*, Chemische Berichte, 129 (1996) 887-895.
- [110] P. Gockel, R. Vogler, M. Gelinsky, A. Meißner, H. Albrich, H. Vahrenkamp, *Zinc complexation of cyclic dipeptides containing cysteine and/or histidine*, Inorganica Chimica Acta, 323 (2001) 16–22.
- [111] A. Jancsó, D. Szunyogh, F.H. Larsen, P.W. Thulstrup, N.J. Christensen, B. Gyurcsik, L. Hemmingsen, *Towards the role of metal ions in the structural variability of proteins: Cd^{II} speciation of a metal ion binding loop motif*, Metallomics, 3 (2011) 1331-1339.
- [112] N.K. Sarkar, D.D. Clarke, H. Waelsch, *An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins*, Biochimica et Biophysica Acta, 25 (1957) 451-452.
- [113] J.E. Folk, *Mechanism of Action of Guinea Pig Liver Transglutaminase: VI. ORDER OF SUBSTRATE ADDITION*, Journal of Biological Chemistry, 244 (1969) 3707-3718.
- [114] M.V. Nurminskaya, A.M. Belkin. *Cellular Functions of Tissue Transglutaminase*, International Review Of Cell And Molecular Biology, 294 (2012) 1-97.
- [115] V.C. Yee, L.C. Pedersen, I. Le Trong, P.D. Bishop, R.E. Stenkamp, D.C. Teller, *Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91 (1994) 7296-7300.
- [116] S.N. Prasanna Murthy, S. Iismaa, G. Begg, D.M. Freymann, R.M. Graham, L. Lorand, *Conserved tryptophan in the core domain of transglutaminase is essential for catalytic activity*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99 (2002) 2738-2742.
- [117] M.P. Savoca, E. Tonoli, A.G. Atobatele, E.A.M. Verderio, *Biocatalysis by Transglutaminases: A Review of Biotechnological Applications*, Micromachines, 9 (2018) 1-23.

- [118] H. Ando, M. Adachi, K. Umeda, A. Matsuura, M. Nonaka, R. Uchio, H. Tanaka, M. Motoki, *Purification and Characteristics of a Novel Transglutaminase Derived from Microorganisms*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 53 (1989) 2613-2617.
- [119] G. Gran, *Determination of the equivalent point in the potentiometric titrations*, *Acta Chemica Scandinavica*, 4 (1950) 559-577.
- [120] R.B Merrifield, *Solid-phase peptide-synthesis – Some problems and improvements*, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 170 (1975) 30.
- [121] G. Barany, N. Kneibcordnier, D.G. Mullen, *Solid-phase peptide-synthesis – A silver anniversary report*, *International Journal of Peptide and Protein Research*, 30 (1987) 705-739.
- [122] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *SUPERQUAD – an improved general program for computation of formation-constants from potentiometric data*, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* (1985) 1195-1200.
- [123] L. Zékány, I. Nagypál, *PSEQUAD: A comprehensive program for the evaluation of potentiometric and/or spectrophotometric equilibrium data using analytical derivatives*, *Computational methods for the determination of formation constants*, D. Leggett (Ed) Plenum Press, New York (1985) 291-353.
- [124] H.M. Irving, M.C. Miles, L.D. Pettit, *A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titration using a glass electrode*, *Analytica Chimica Acta*, 38 (1967) 475-488.
- [125] G. Eriksson, *Algorithm for the computation of aqueous multicomponent, multiphase equilibria*, *Analytica Chimica Acta – Computer Techniques and Optimization*, 3 (1979) 375-383.
- [126] R.N. Sylva, P. L. Brown, *The hydrolysis of metal ions. Part 3. Lead(II)*, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* (1980) 1577-1581.
- [127] M. Vasak, J.H.R. Kaegi, H.A.O. Hill, *Zinc(II), cadmium(II), and mercury(II) thiolate transitions in metallothionein*, *Biochemistry*, 20 (1981) 2852–2856.
- [128] W.N. Perera, G. Hefter, P.M. Sipos, *An Investigation of the Lead(II)–Hydroxide System*, *Inorganic Chemistry*, 40 (2001) 3974–3978.
- [129] F. Jalilehvand, N.S. Sisombath, A.C. Schell, G.A. Facey, *Lead(II) Complex Formation with L-Cysteine in Aqueous Solution*, *Inorganic Chemistry*, 54 (2015) 2160–2170.
- [130] W. Bae, R.K. Mehra, *Metal-binding characteristics of a phytochelatin analog (Glu-Cys)₂Gly*, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 68 (1997) 201-210.
- [131] M. Matzapetakis, B.T. Farrer, T.-C. Weng, L. Hemmingsen, J.E. Penner-Hahn, V.L. Pecoraro, *Comparison of the Binding of Cadmium(II), Mercury(II), and Arsenic(III) to the de Novo Designed Peptides TRI L12C and TRI L16C*, *Journal of the American Chemical Society*, 124 (2002) 8042-8054.
- [132] J.W. Chang, R.B. Martin *Visible circular dichroism of planar nickel ion complexes of peptides and cysteine and derivates*, *The Journal of Physical Chemistry*, 73 (1969) 4277-4283.
- [133] R.B. Martin, J.M. Tsangaris, J.W. Chang, *Double octant rule for planar transition metal ion complexes*, *Journal of the American Chemical Society*, 90 (1968) 821-823.
- [134] J.M. Tsangaris, J.W. Chang, R.B. Martin, *Ultraviolet circular dichroism of cupric and nickel ion complexes of amino acids and peptides*, *Journal of the American Chemical Society*, 91 (1969) 726-731.

- [135] H. Sigel, R.B. Martin, *Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands*, Chemical Reviews, 82 (1982) 385-426.
- [136] W.A. Thomas, *Unravelling molecular structure and conformation—the modern role of coupling constants*, Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 30 (1997) 183-207.
- [137] S. Braun, H.-O. Kalinowski, S. Berger, *100 and More Basic NMR Experiments: A Practical Course*, Journal of Natural Products, 60 (1997) 656-657.
- [138] K. Ösz, G. Lente, C. Kállay, *New Protonation Microequilibrium Treatment in the Case of Some Amino Acid and Peptide Derivatives Containing a Bis(imidazolyl)methyl Group*, The Journal of Physical Chemistry B, 109 (2005) 1039-1047.
- [139] L. Gasque, S. Bernes, R. Ferrari, C.R. de Barbarin, Ma. de Jesus Giterrez, G. Mendoza-Diaz, *Complexation of lead(II) by l-aspartate: crystal structure of polymeric Pb(aspH)(NO₃)*, Polyhedron, 19 (2000) 649-653.
- [140] C. Kállay, K. Várnagy, G. Micera, D. Sanna, I. Sóvágó, *Copper(II) complexes of oligopeptides containing aspartyl and glutamyl residues. Potentiometric and spectroscopic studies*, Journal of Inorganic Biochemistry, 99 (2005) 1514-1525.
- [141] G. Szunyog, K. Várnagy, *Lead(II) complexes of oligopeptides containing two cysteine residues*, Inorganica Chimica Acta, 472 (2018) 157–164.
- [142] K.P. Neupane, V.L. Pecoraro, *Pb-207 NMR spectroscopy reveals that Pb(II) coordinates with glutathione (GSH) and tris cysteine zinc finger proteins in a PbS₃ coordination environment*, Journal of Inorganic Biochemistry, 105 (2011) 1030-1034.
- [143] Pálinkás Dóra Csilla, *Ciszteín tartalmú tetrapeptidek Ni(II)-, Zn(II)- és Cd(II)-komplexei*, Tudományos diákköri dolgozat (2018).
- [144] L.I. Szekeres, S. Bálint, G. Galabács, I. Kálomista, T. Kiss, F.H. Larsen, L. Hemmingsen, A. Jancsó, *Hg²⁺ and Cd²⁺ binding of a bioinspired hexapeptide with two cysteine units constructed as a minimalistic metal ion sensing fluorescent probe*, Dalton Transactions, 48 (2019) 8327-8339.
- [145] V. Dorcák, A. Krezel, *Correlation of acid-base chemistry of phytochelatin PC2 with its coordination properties towards the toxic metal ion Cd(II)*, Dalton Transactions, 11 (2003) 2253-2259.
- [146] N. Lihi, M. Lukács, D. Szűcs, K. Várnagy, I. Sóvágó, *Nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes of peptides containing separate aspartyl and cysteinyl residues*, Polyhedron, 133 (2017) 364-373.
- [147] A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel, *Cadmium: From Toxicity to Essentiality*, Metal Ions in Life Sciences, 11 (2013) 311-313.
- [148] H. Kozłowski, J. Urbanska, I. Sóvágó, K. Várnagy, A. Kiss, J. Sychala, K. Cherifi, *Cadmium ion interaction with sulphur containing amino acid and peptide ligands*, Polyhedron, 9 (1990) 831-837.
- [149] Á. Dávid, C. Kállay, D. Sanna, N. Lihi, I. Sóvágó, K. Várnagy, *Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) complexes of rat amylin fragments. The anchoring ability of specific non-coordinating side chains*, Dalton Transaction, 44 (2015) 17091-17099.
- [150] J.-F. Galey, B. Decock-Le Reverend, A. Lebkirk, L.D. Pettit, S.I. Pyburn, H. Kozłowski, *Specific interactions of the β-carboxylate group of the aspartic acid residue in oligopeptides containing one, two or three such residues with copper(II)*

- ions. *A potentiometric and spectroscopic study*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transaction (1991) 2281-2287.
- [151] Á. Grenács, N. Lihi, I. Sóvágó, K. Várnagy, *The influence of penicillamine/cysteine mutation on the metal complexes of peptides*, Dalton Transaction, 46 (2017) 13472-13481.
- [152] Bökönyi Kinga, *Tiolcsoportot tartalmazó modell ligandumok nikkell(II)komplexeinek CD-spektroszkópiás vizsgálata*, Szakdolgozat (2016).
- [153] I. Sóvágó and R.B. Martin, *Transition Metal Ion Included Deprotonation of Amide Hydrogens in Sulfhydryl Containing Compounds*, Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, 43 (1981) 425-429.
- [154] J.C. Payne, M.A. Horst, H.A. Godwin, *Lead Fingers: Pb²⁺ Binding to Structural Zinc-Binding Domains Determined Directly by Monitoring Lead–Thiolate Charge-Transfer Bands*, Journal of American Chemical Society, 121 (1999) 6850-6855.
- [155] A.B. Ghering, L.M.M. Jenkins, B.L. Schenk, S. Deo, R.A. Mayer, M.J. Pikaart, J.G. Omichinski, H.A. Godwin, *Spectroscopic and Functional Determination of the Interaction of Pb²⁺ with GATA Proteins*, Journal of American Chemical Society, 127 (2005) 3751-3759.
- [156] J.S. Magyar, T.C. Weng, M.S. Charlotte, D.F. Dye, B.W. Rous, J.C. Payne, B.M. Bridgewater, A. Mijovilovich, G. Parkin, J.M. Zaleski, J.E. Penner-Hahn, H.A. Godwin, *Reexamination of Lead(II) Coordination Preferences in Sulfur-Rich Sites: Implications for a Critical Mechanism of Lead Poisoning*, Journal of American Chemical Society, 127 (2005) 9495-9505.
- [157] P.T. Erskine, E.M.H. Duke, I.J. Tickle, N.M. Senior, M.J. Warren, J. B. Cooper, *MAD analyses of yeast 5-aminolaevulinate dehydratase: their use in structure determination and in defining the metal-binding sites*, Acta Crystallography Section D, 56 (2000) 421-430.
- [158] C.W. Nogueira, F.A. Soares, P.C. Nascimento, D. Muller, J.B.T. Rocha, *2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium-induced inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase*, Toxicology, 184 (2003) 85-95.
- [159] V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, A.F. Martins, J.B.T. Rocha, *Effects of Cadmium, Lead, Mercury and Zinc on δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity from Radish Leaves*, Biologia Plantarum, 45 (2001) 85-89.
- [160] M. Matzapetakis, D. Ghosh, T.-C. Weng, J.E. Penner-Hahn, V.L. Pecoraro, *Peptidic models for the binding of Pb(II), Bi(III) and Cd(II) to mononuclear thiolate binding sites*, Journal of Biological Inorganic Chemistry, 11 (2006) 876-890.
- [161] Davaadorj Erdenedavaa, *Ciszteint tartalmazó peptidok Ni(II)-komplexei*, Szakdolgozat (2018).
- [162] N. Lihi, G. Csire, B. Szakács, N.V. May, K. Várnagy, I. Sóvágó, I. Fábrián, *Stabilization of the Nickel Binding Loop in NiSOD and Related Model Complexes: Thermodynamic and Structural Features*, Inorganic Chemistry, 58 (2019) 1414-1424.
- [163] Laskai Aliz, *Hisztidint és ciszteint tartalmazó peptid átmenetifémekkel történő oldategyensúlyi vizsgálata*, Diplomamunka (2017).

8. FÜGGELÉK

Az értekezés alapját képző közlemények:

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények

1. Györgyi Szunyog, Katalin Várnagy: *Lead(II) complexes of oligopeptides containing two cysteine residues*, Inorganica Chimica Acta, 472 (2018) 157-164.

Impakt faktor: 2,433

2. Norbert Lih, Márton Lukács, Mária Raics, Györgyi Szunyog, Katalin Várnagy, Csilla Kállay: *The effect of carboxylate groups on the complexation of metal ion with oligopeptides*, Inorganica Chimica Acta, 472 (2018) 165-173.

Impakt faktor: 2,433

Tudományos folyóiratban még meg nem jelent közlemények

1. Györgyi Szunyog, Alíz Laskai, Dóra Szücs, Imre Sóvágó and Katalin Várnagy: A comparative study on the nickel binding ability of peptides containing separate cysteinyl residues, *Dalton Transactions* (közlésre benyújtva, revízió alatt).

Az értekezés témájához kapcsolódó előadások:

1. Szunyog Györgyi, Várnagy Katalin: *Ciszteín-tartalmú peptidek Ni(II)-komplexei*, 53. Komplexkémiai Kollokvium, Velence, 2019. május 21 - 23.

2. Szunyog Györgyi: *Az ólom(II) és a nikkell(II)-ion koordinációs kémiájának összehasonlítása ciszteint tartalmazó peptideken keresztül*, Tavaszi szél konferencia, Győr, 2018. május 4 - 6.

3. Györgyi Szunyog, Katalin Várnagy: *Metal complexes of cysteine containing peptides*, International Symposium on Metal Complexes (ISMEC 2016), Barcelona, Spanyolország, 2016. június 7 - 10. (flash presentation)

4. Szunyog Györgyi: *Ciszteín tartalmú peptidek ólom(II)komplexeinek potenciometriás és spektroszkópiás vizsgálata*, 50. Komplexkémiai Kollokvium, Balatonvilágos, 2016. május 30 - június 1.

5. Szunyog Györgyi: *Ciszteín tartalmú peptidek ólom(II)komplexeinek potenciometriás és spektroszkópiás vizsgálata*, Tavaszi szél konferencia, Budapest, 2016. április 15 - 17.

6. Várnagy Katalin, Lihi Norbert, Raics Mária, Grenács Ágnes, Szunyog Györgyi, Timári Sarolta, Turi Ildikó, Sóvágó Imre: *Az oldalláncok hatása a ciszteín tartalmú peptidok fémionmegkötő képességének szelektivitására*, MKE 2. Nemzeti Konferencia, Hajdúszoboszló, 2015. augusztus 31 - szeptember 2.

7. Várnagy Katalin, Lihi Norbert, Grenács Ágnes, Szunyog Györgyi, Raics Mária, Timári Sarolta, Sóvágó Imre: *A ciszteín tartalmú peptidok fémionmegkötő képességének szelektivitása*, 49. Komplexkémiái Kollokvium, Siófok, 2015. május 26 - 28.

Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek:

1. Katalin Várnagy, Györgyi Szunyog, Dóra Csilla Pálinkás: *Nickel(II) Complexes of Peptides Containing Cysteinyll Residues*, 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC), Interlaken, Svájc, 2019. augusztus 11 - 16.

2. Györgyi Szunyog, Dóra Csilla Pálinkás, Katalin Várnagy: *Nickel(II) complexes of peptides containing cysteinyll residues*, International Symposium on Metal Complexes 2019 (ISMEC), Debrecen, Magyarország, 2019. június 11 - 14.

3. Györgyi Szunyog, Katalin Várnagy: *Nickel(II) complexes of peptides containing cysteinyll residues*, 35th International Conference on Solution Chemistry (ICSC), Szeged, Magyarország, 2018. augusztus 26 – 30.

4. Katalin Várnagy, Györgyi Szunyog: *Lead complexes of cysteine containing peptides*, International Symposium on Metal Complexes (ISMEC 2017), Dijon, Franciaország, 2017. július 11 - 15.

5. Györgyi Szunyog, Katalin Várnagy: *Lead complexes of cysteine containing peptides*, 14 th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC14), Toulouse, Franciaország, 2017. június 7 - 10.

6. Györgyi Szunyog, Katalin Várnagy: *Lead(II) complexes of cysteine containing peptides*, 13th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC), Budapest, Magyarország, 2016. augusztus 28 - szeptember 1.

7. Györgyi Szunyog, Márton Lukács, Norbert Lihi, Ágnes Grenács, Katalin Várnagy: *Metal complexes of cysteine containing peptides*, International Symposium on Metal Complexes (ISMEC 2016), Barcelona, Spanyolország 2016. június 7 - 10.

8. Norbert Lihi, Ágnes Grenács, Sarolta Timári, Ildikó Turi, Györgyi Szunyog, Katalin Várnagy, Imre Sóvágó: *Metal ion selectivity of cysteine containing peptides*, 13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC13), Galway, Írország, 2015. június 2 - 15.

Az értekezés témájához nem kapcsolódó poszterek:

1. Márton Lukács, Györgyi Szunyog, Ágnes Grenács, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo, Katalin Várnagy, Imre Sóvágó: *Metal Ion Binding Ability of the Free N-termini of Tau Protein: Appraisal of Preference by Solution Equilibrium Study*, International Symposium on Metal Complexes 2019 (ISMEC), Debrecen, Magyarország, 2019. június 11 – 14.

2. Márton Lukács, Györgyi Szunyog, Norbert Lihi, Ágnes Grenács, Giuseppe Pappalardo, Katalin Várnagy: *Copper(II) complexes of peptides mimicking the Tau protein binding sites*, 35th International Conference on Solution Chemistry (ICSC), Szeged, Magyarország, 2018. augusztus 26 – augusztus 30.