



Nikkel szuperoxid dizmutáz enzimmodellek szerkezeti és SOD aktivitás vizsgálata

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Bonczidai-Kelemen Dóra

Témavezetők: Prof. Dr. Fábián István
Dr. Lihi Norbert

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Műszaki Tudományi Doktori Tanács

Kémia Doktori Iskola

Debrecen, 2026.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Műszaki Tudományi Doktori Tanács, **Kémia Tudományok Doktori Iskola K/1** programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi/műszaki doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 20.

.....

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy **Bonczidai-Kelemen Dóra** doktorjelölt **2020 - 2025.** között a fent megnevezett Doktori Iskola **K/1** programjának keretében irányítással 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, 20..

.....

a témavezetők aláírása

NIKKEL SZUPEROXID DIZMUTÁZ ENZIMMODELLEK SZERKEZETI ÉS SOD AKTIVITÁS VIZSGÁLATA

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a kémia tudományágban

Írta: Bonczidai-Kelemen Dóra okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémia doktori iskolája
(Reakciómechanizmusok és katalízis (K/1) programja) keretében

Témavezetők: Prof. Dr. Fábián István

Dr. Lihi Norbert

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök:

Dr.

tagok:

Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 20...

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek *Prof. Dr. Fábián Istvánnak* és *Dr. Lihi Norbertnek*, hogy a kutatócsoporthoz való csatlakozásom óta támogatják munkámat és segítik a szakmai fejlődésemet. Köszönettel tartozom azért, hogy bízattak a PhD képzés elkezdésére és szakmai útmutatásukkal lehetővé tették, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.

Hálás köszönet illeti *Dr. May Nóra Veronikát*, a Természettudományi Kutatóközpont munkatársát, aki nélkülözhetetlen segítséget nyújtott az ESR spektrumok felvételében és kiértékelésében.

Köszönettel tartozom a kollégáimnak, *Dr. Simon Fruzsínának*, *Vargáné Dr. Szalóki Dórának*, *Dr. Forgács Attilának*, *Dr. Szabó Máriának*, *Molnárné Horváth Ágnesnek*, *Diószegi Róbertnek*, *Kiss Eszternek* és *Angyal Dávidnak*, hogy minden felmerülő elméleti és gyakorlati kérdésben számíthattam rájuk és barátságos légkört teremtettek a laboratóriumban. Köszönöm a *HUN-REN-DE Összetett Homogén és Heterogén Fázisú Kémiai Reakciók Mechanizmusa Kutatócsoport* minden egykori és jelenlegi tagjának, hogy tudásukkal és tapasztalataikkal segítették a munkámat.

Köszönöm *Dr. Gáspár Attila* tanszékvezetőnek, hogy biztosította a szükséges feltételeket a tanszéken végzett munkámhoz, illetve köszönöm a segítséget a CE-MS és MS vizsgálatok elvégzésében és kiértékelésében.

Köszönöm *Nagyné Dombi Gizella* tanszéki irodavezetőnek a mindnapos ügyintézés során nyújtott segítségét.

Végtelenül hálás vagyok a *családomnak*: a *szüleimnek*, hogy mindig bízattak arra, hogy tovább képezsem magam és hogy mindig vállalkoztak egy kis gyermekfelügyeletre, ha szükség volt rá; a *húgomnak*, aki a magánélet mellett a laboratóriumban is segítségemre áll; és főként a *Férjemnek* és a *Kislányomnak*, akik szeretetteljes légkört biztosítanak az otthoni környezetben, végig kísérték ezen az úton és mindig velem örülnek a sikereimnek.

A doktori értekezés a Kulturális és Innovációs Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a KDP-2020 pályázati program támogatásával valósult meg. A munka a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíjának és a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal STARTING25 152343 sz. pályázatának támogatásával készült.

Tartalomjegyzék

Az értekezésben előforduló rövidítések.....	1
1. Bevezetés és célkitűzés	3
2. Irodalmi előzmények	5
2.1. Az oxidatív stressz.....	5
2.2. A reaktív oxigén származékok (ROS)	7
2.2.1. Szuperoxid gyökanion ($O_2^{\cdot-}$).....	7
2.2.2. Hidrogén-peroxid (H_2O_2)	10
2.2.3. Hidroxil gyök ($OH^{\cdot}$).....	10
2.2.4. Szingulett oxigén ($^1O_2$).....	11
2.3. Szuperoxid dizmutáz (SOD) enzimek	11
2.3.1. Vas- és mangán szuperoxid dizmutáz (FeSOD és MnSOD) enzimek.....	12
2.3.2. Réz-cink szuperoxid dizmutáz (CuZnSOD) enzimek.....	12
2.3.3. Nikkel szuperoxid dizmutáz (NiSOD) enzim	13
2.4. NiSOD enzimmodellek.....	16
2.5. A nikkel biológiai szerepe és koordinációs kémiája	17
2.6. A peptidek koordinációs kémiája	18
2.6.1. A hisztidin tartalmú peptidek koordinációs kémiája.....	18
2.6.2. A cisztein tartalmú peptidek komplexképző sajátságai.....	22
2.6.3. Vegyes kötőhelyű (hisztidin és cisztein) peptidek komplexképző sajátságai	23
3. Kísérleti körülmények.....	27
3.1. Felhasznált vegyszerek	27
3.2. pH-potenciometria	29
3.3. UV-látható spektroszkópia	31
3.4. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia	32
3.5. ESR spektroszkópia.....	33
3.6. NMR spektroszkópia	34
3.7. ESI-TOF-MS tömegspektrometria	35
3.8. Tömegspektrométerrel kapcsolt kapilláris elektroforézis (CE-MS).....	35
3.9. A SOD aktivitás mérése	36
4. Kísérleti eredmények és értékelésük.....	38
4.1. A vizsgált peptidek és Ni(II)-komplexeinek termodinamikai és szerkezetvizsgálati jellemzői	38

4.1.1. A kilenc aminosavból felépülő peptidek és Ni(II)-komplexeik	38
4.1.2. A wtNiSOD-dim peptid és Ni(II)-komplexeinek jellemzése	55
4.2. A peptidek Ni(III)-komplexeinek szerkezetvizsgálata ESR spektroszkópiával	60
4.3. A peptidek Ni(II)-komplexeinek SOD aktivitás vizsgálata.....	69
4.3.1. A peptidek SOD aktivitás vizsgálata a McCord-Fridovich módszerrel	69
4.3.2. A szekvenciális stopped-flow technikán alapuló SOD aktivitás mérési módszer fejlesztése	71
4.3.3. A peptidek Ni(II)-komplexeinek SOD aktivitás vizsgálata stopped-flow technikával	74
5. Összefoglalás	86
6. Summary	90
7. Hivatkozások.....	94
8. Függelék.....	103

Az értekezésben előforduló rövidítések

Ala, A	α -alanin
Asp, D	aszparaginsav
CE-MS	tömegspektrométerrel kapcsolt kapilláris elektroforézis készülék
CuZnSOD	réz-cink szuperoxid dizmutáz
Cys, C	cisztein
CD	cirkuláris dikroizmus
CE	kapilláris elektroforézis
COX	ciklooxigenáz
DFT	<i>Density Functional Theory</i> (sűrűségfunkcionál-elmélet)
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNP	2,4-dinitrofenil
DNS	dezoxiribonukleinsav
EDTA	etil-diamin-tetraecetsav
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (elektroporlasztásos ionizáció)
ESR	elektronspin rezonancia
FeSOD	vas szuperoxid dizmutáz
Gly, G	glicin
HEPES	4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-etánszulfonsav
His, H	hisztidin
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IC_{50}	50%-os inhibícióhoz tartozó komplex koncentráció
Im	imidazol
KO ₂	kálium-szuperoxid
Leu, L	leucin
LMCT	<i>Ligand to Metal Charge Transfer</i> (ligandum - fém töltésátvitel)
LOX	lipoxigenáz
Lys, K	lizin
MD	<i>Molecular Dynamics</i> (molekuladinamika)
MnSOD	mangán szuperoxid dizmutáz
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (tömegspektroszkópia)

Nikkel szuperoxid dizmutáz enzimmodellek szerkezeti és SOD aktivitás vizsgálata

NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-hidrid
NBT	nitrokék-tetrazónium-klorid
NiSOD	nikkel szuperoxid dizmutáz
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (mágneses magrezonancia)
O ₂ ^{•-}	szuperoxid gyökanion
Pen	penicillamin
Phe, F	fenilalanin
Pro, P	prolin
ROS	reaktív oxigén származékok
SOD	szuperoxid dizmutáz
SOR	szuperoxid reduktáz
TOF	<i>Time of Flight</i> (repülési idő)
Tos	tozil
Tyr, Y	tirozin
Val, V	valin
wtNiSOD	HisCysAspLeuProCysGlyValTyr
wtNiSOD-CC	CysCysAspLeuProCysGlyValTyr
wtNiSOD-dim	HisCysAspLeuProCysGlyValTyr-Lys-TyrValGlyCysProLeuAspCysHis
wtNiSOD-HC	HisCysAspLeuProHisGlyValTyr
wtNiSOD-HH	HisHisAspLeuProCysGlyValTyr
wtNiSOD-Pen	HisPenAspLeuProCysGlyValTyr
Xaa, Yaa	egységes aminosav rövidítések

1. Bevezetés és célkitűzés

Az oxigén metabolizmusa során szuperoxid gyökanion ($O_2^{\cdot-}$) képződik, mely a reaktív oxigén származékok legjelentősebb képviselője. A $O_2^{\cdot-}$ közvetlenül vagy közvetve is képes károsítani a biomolekulákat, mely oxidatív stressz kialakulásához vezet. A molekuláris oxigén megjelenésével körülbelül egyidőben jelentek meg a különböző antioxidáns hatású enzimek is. Ezek közül a szuperoxid dizmutáz (SOD) enzimek ma is kiemelkedő fontosságúak a különféle életformák fennmaradásához.¹ A SOD enzimek a $O_2^{\cdot-}$ koncentrációját szabályozzák, megelőzve a felhalmozódásukhoz köthető káros hatásokat. A SOD enzimek központi centrumukban olyan fémionokat tartalmaznak, melyek egy elektronos oxidációja/redukciója könnyen megvalósul. A fémcentrumok reakcióba lépnek a $O_2^{\cdot-}$ -nal, ennek eredményeként a fémionok két oxidációs állapota egy redoxiciklusban folyamatosan átalakul egymásba. A központi fémion oxidált és redukált formája egyaránt reagál a gyökanionnal és sor kerül a $O_2^{\cdot-}$ hatékony bomlására. Így egy dizmutálási ciklus során két ekvivalens $O_2^{\cdot-}$ bomlik el a SOD enzimek által katalizált reakcióban és termékként oxigén és hidrogén-peroxid képződik. Különböző biológiai rendszerekben más és más központi fémion található a SOD enzimekben. A szakirodalomban széles körben tanulmányozott vas-, mangán és réz-cink SOD-okon kívül nikkel tartalmú SOD (NiSOD) enzimek is léteznek.

A NiSOD enzimet a 1990-es évek közepén fedezték fel a felsoroltak közül utolsóként.² A NiSOD enzimek szerkezetükben és aminosav szekvenciájukban is jelentősen különböznek a többi SOD enzimtől. Megállapították, hogy a NiSOD enzim homohexamer, vagyis hat monomer egységből épül fel, melyek mindegyike egy nikkeliont tartalmaz. A peptidek N-terminálistól számított első hat aminosava tartalmazza az összes olyan funkciós csoportot, amely a fémion koordinálásában részt vesz és a SOD aktivitásért felelős. Ezt a szekvenciát nikkel-kötő huroknak nevezzük.³ Az eddigi tanulmányok részletesen leírják a NiSOD enzimek felépítését, azonban a dizmutálási reakció pontos mechanizmusa nem tisztázott.

A PhD munkám során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a nikkel-kötő hurokban található fontosabb donorcsoportok szerepét a fémion megkötésében és a $O_2^{\cdot-}$ nikkelkomplexek által katalizált bomlásában. Ennek érdekében a NiSOD enzim első kilenc aminosavából felépülő modell (wtNiSOD: HCDLPCGVY) több mutánsát vizsgáltuk különböző termodinamikai és szerkezetvizsgálati módszerekkel. A hisztidin, a ciszteinek és az N-terminális aminocsoport az elsődleges fémkötőhelyei a natív NiSOD enzimet modellező peptidfragmensnek, így munkánk

Nikkel szuperoxid dizmutáz enzimmodellek szerkezeti és SOD aktivitás vizsgálata

során hisztidin - cisztein, cisztein - hisztidin, cisztein - penicillamin és hisztidin - arginin pontmutációt tartalmazó, valamint az N-terminális aminocsoport metilezésével kapott, kilenc aminosavból álló modelleket vizsgáltunk.

A NiSOD enzim hat fémion megkötésére alkalmas, azonban a szakirodalomban eddig közölt és az előbb felsorolt modellek is csak egy fémion megkötésére képesek, így munkánk során célunk volt egy olyan peptid vizsgálata is, amely több fémion megkötésére is képes.

További célul tűztük ki, hogy részletesen tanulmányozzuk a wtNiSOD és az előzőleg felvázolt peptidek nikkelkomplexeinek reakcióját a $O_2^{\cdot-}$ -nal. A szakirodalomban széles körben alkalmazott SOD-aktivitás mérési módszerek alkalmazásának számos hátránya van, ezért egy új SOD aktivitás mérési módszer fejlesztését is terveztük, mely során részletesebb képet kaphatunk ezen peptidek nikkelkomplexei és a $O_2^{\cdot-}$ között lejátszódó reakció kinetikájáról és mechanizmusáról.

2. Irodalmi előzmények

2.1. Az oxidatív stressz

Az oxidatív stressz egy olyan jelenség, amelyet a reaktív oxigén származékok (ROS) termelése és felhalmozódása közötti egyensúlyhiány okoz a sejtekben és szövetekben, amit a szervezet nem képes szabályozni. Bár a ROS-ok számos biológiai szempontból fontos szerepet töltenek be kis koncentrációban (pl.: sejtjelzés), felhalmozódásuk különböző szervi rendellenességekkel hozható összefüggésbe. A ROS-ok általában az oxigén-anyagcsere melléktermékeként keletkeznek, azonban a környezeti stresszforrások (pl.: az UV-sugárzás, az ionizáló sugárzás, a szennyező anyagok, a nehézfémek) és a xenobiotikumok jelentős mértékben hozzájárulnak a megnövekedett ROS-termelődéshoz. ⁴

Az oxidatív stresszel összefüggésbe hozható betegségek két csoportba sorolhatók. Az első csoportba a daganatos elváltozások és a cukorbetegség tartozik, melyek esetében a vázizom mitokondriumai a megnövekedett ROS-termelés fő helyszínei. ⁵ Ezekben az esetekben kimutatták, hogy az extracelluláris glükózkoncentráció kóros megemelkedése a mitokondriális ROS-termelés növekedését okozza. Ezt mitokondriális oxidatív stressznek is nevezzük, ami terápiás beavatkozás nélkül tömeges vázizomsorvadáshoz vezethet. ⁶ A másik csoportba sorolhatók a krónikus gyulladás, a HIV fertőzés, az érlemezés, az ischaemiás-reperfúziós károsodás és az alvási apnoe. Ezen elváltozások a NADPH-oxidáz túlzott stimulációjával járnak, mely során a megnövekedett ROS-szint vagy az intracelluláris glutationszint változásai gyakran olyan kóros változásokkal társulnak, amelyek a jelátviteli kaskádok és/vagy a génexpresszió szabályozási zavarára utalnak. Ezeket gyulladásos oxidatív állapotoknak is nevezik. ^{5, 7}

Az oxidatív stressz által kiváltott DNS-károsodás az egyik fő oka a daganatos megbetegedések kialakulásának. A DNS-oxidáció egyik melléktermékeként hidrolizált DNS-bázisok keletkeznek, melyek a fiziológiai transzkriptomikai profil megváltoztatásával és génmutációk előidézésével gátolják a normális sejtnövekedést. ⁸ Az oxidatív stressz egyéb módosulásokat is okozhat a DNS-szerkezetében, például bázis- és cukorléziókat, DNS-fehérje keresztkötéseket, száltöréseket és bázismentes helyeket. A dohányzás, a környezeti szennyező anyagok és a krónikus gyulladás oxidatív DNS-károsodást eredményezhetnek, amelyek hozzájárulhatnak a tumor kialakulásához. ⁹ Ezen kívül bizonyos életmódbeli tényezők okozta oxidatív stressz is hozzájárulhat a rákos megbetegedésekhez, például összefüggést találtak az étrendi zsírfogyasztás és a különböző rákos megbetegedések okozta halálozási ráta között. ¹⁰

Statisztikai adatok alapján a világ vezető halálokai közé tartoznak a szív- és érrendszeri megbetegedések. Ezek közül számos esetben az oxidatív stressz elsődleges vagy másodlagos kiváltó oknak tekinthető.¹¹ A legjelentősebb megbetegedés az érlemezés, mely az artériák érfalának lokális megvastagodásával jár. Ezekben az esetekben valószínűleg az erek belső hámrétege (endotél) sérül és erre válaszként monociták halmozódnak fel az érfalon. Bár a magas plazma koleszterinszintet összefüggésbe hozzák az érlemezéssel, az ereket elzáró plakkok kialakulásához valóban a kissűrűségű lipoproteinek oxidációjára van szükség.¹²

Az oxidatív stressz szerepet játszik különféle neurológiai betegségek kialakulásában, mint például a Parkinson-kór, az Alzheimer-kór, az amiotrófiás laterálszklerózis, a szklerózis multiplex, a depresszió és a memóriavesztés. Az Alzheimer-kór esetében számos kísérleti és klinikai kutatás kimutatta, hogy az oxidatív károsodás kulcsszerepet játszik az idegsejtek pusztulásában és a demencia progressiójában.¹³ A β -amiloid egy toxikus peptid, amely gyakran megtalálható az Alzheimer-kórban szenvedő betegek agyában. Ez a módosulat szabadgyökök hatására termelődik, és ismert, hogy legalább részben felelős az Alzheimer-kór kialakulása és progressiója során megfigyelt neurodegenerációért.¹⁴

Számos kutatás rámutatott, hogy a szisztémás és lokális krónikus gyulladás által előidézett tüdőbetegségek, mint például az asztma és a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), összefüggésben állnak az oxidatív stresszel.¹⁵ Ismert, hogy az oxidánsok fokozzák a gyulladást a különböző kinázok aktiválásán keresztül, amelyek olyan útvonalakat és transzkripciós faktorokat érintenek, mint az NF-kappa B és az AP-1.

A reumatoid arthritis egy krónikus gyulladásos rendellenesség, amely az ízületeket és a környező szöveteket érinti. A gyulladás helyén lévő szabad gyökök fontos szerepet játszanak a szindróma kialakulásában és a progressiójában, amit az érintett betegek ízületi folyadékában megnövekedett izoprosztán- és prosztaglandinszint is bizonyít.¹⁶

Az oxidatív stressz számos, a vesefunkciót érintő betegségben is szerepet játszik, mint például a vesegyulladás és a veseelégtelenség. Ezek következtében magas lehet a vizelet fehérjeszintje, illetve a mérgeanyagok – amelyek normális esetben a vizelettel távoznak – felhalmozódnak a vérben. Az oxidatív stressz krónikusan hat a vese szövetekre, ennek eredményeként gyulladás alakul ki. Ez a hegszövetek felhalmozódásával jár, amely károsítja a szervfunkciókat és potenciálisan veseelégtelenséghez vezethet.¹⁷

Látható tehát, hogy az oxidatív stressz számos krónikus és akár halált okozó betegség megjelenéséhez vezethet. Az oxidatív stressz állapot kialakulásáért a reaktív oxigén származékok felhalmozódása tehető felelőssé, így fontos ismernünk ezen részecskék tulajdonságait. A következő alfejezetben a ROS-ok legjelentősebb képviselőinek képződését, valamint fizikai-kémiai és biológiai hatását tárgyalom.

2.2. A reaktív oxigén származékok (ROS)

Biológiai rendszerek anyagcsere-folyamatai során reaktív oxigén származékok képződnek, melyek megnövekedett koncentrációja összefüggésbe hozható számos, az előző alfejezetben részletezett megbetegedéssel. A ROS-ok családjába tartozik a szuperoxid gyökanion ($O_2^{\bullet-}$), a hidrogén-peroxid (H_2O_2), a hidroxil gyök ($OH^{\bullet}$) és a szingulett oxigén ($^1O_2$).¹⁸ Ezen származékokat a legtöbb esetben káros hatásai miatt tartjuk számon, de megfelelően kis koncentrációban szükség van rájuk a szervezetben. Nélkülözhetetlenek a kórokozókkal szembeni védekezésben és az intracelluláris jelátviteli kaszkádokban.⁴

2.2.1. Szuperoxid gyökanion ($O_2^{\bullet-}$)

Biológiai úton a szuperoxid gyökanion két fő forrásból keletkezhet: a mitokondriális légzési láncból és a fagocita nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-oxidázból (NADPH-oxidáz).¹⁹ A $O_2^{\bullet-}$ képződhet a sejtlegzés útján, lipoxigenázok (LOX) és ciklooxygenázok (COX) által az arachidonsav-anyagcsere során, valamint endotél- és gyulladásos sejtek által.²⁰ Ezen felül az oxigén négy elektronos redoxi reakciója, mint a biológiai „égés” részfolyamatai során szintén képződik $O_2^{\bullet-}$, melyet a (2.2.1.1) egyenleten láthatunk.



Az oxidatív stressz okozta megbetegedések jelentős részét a szuperoxid káros hatásainak tulajdonítják, mivel számos részecskével reakcióba léphet további káros gyököket generálva, de közvetlenül is károsíthatja a biomolekulákat. Összefüggésbe hozták a Parkinson-kór és a rákos megbetegedések kialakulásával, illetve fontos szerepe van a DNS-károsodásban is.²¹ A szuperoxid anion jótékony hatásáról is szólnak tanulmányok, például gátolhatja a rákos sejtek növekedését.²²

A szuperoxid gyökanion egy kis méretű anion, mely vízben oldódik és négy vízmolekula erős hidrogénkötésekkel solvatálva.²³ A hidroperoxil (HO_2) a $O_2^{\bullet-}$ protonált formája, mely gyenge savnak tekinthető 4,8-es pK_a értékkel. Ezen pH alatt a HO_2 a domináns részecske, amely oxidáló-

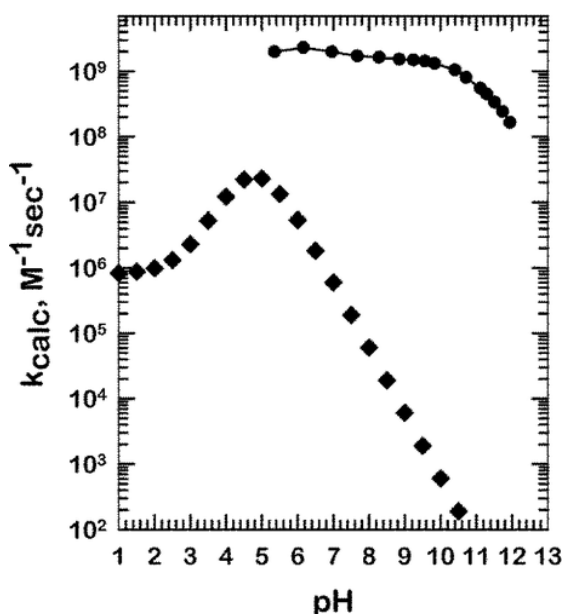
és redukálószerként is viselkedhet; spontán bomlásának termékei a hidrogén-peroxid és az oxigén a (2.2.1.2) reakcióegyenlet alapján képződnek, a másodrendű reakció sebességi állandója $k_{\text{spont}} = 8,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.²⁴



A diszproporciós reakció sebessége pH = 4,8-en a leggyorsabb, ahol a HO_2 és $\text{O}_2^{\cdot-}$ ekvimoláris mennyiségben van jelen. A reakció a (2.2.1.3) egyenlet szerint játszódik le, melynek sebességi állandója $k_{\text{spont}} = 9,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.²⁴



A lúgos pH-tartományban $\text{O}_2^{\cdot-}$ van jelen, ami ilyen körülmények között meglehetősen stabil. Egyes redukált fémiont (pl.: Fe^{2+} , Mn^{2+}) tartalmazó komplexek gyors oxidatív addíciós reakcióba léphetnek a $\text{O}_2^{\cdot-}$ -nal és elősegíthetik a diszproporcióját. Ilyen komplexek találhatóak meg a szuperoxid dizmutáz (SOD) és szuperoxid reduktáz (SOR) enzimekben. Az 1. ábra a $\text{O}_2^{\cdot-}$ pH-függő bomlásának, valamint a CuZnSOD enzim által katalizált reakciójának sebességi állandóit hasonlítja össze, mely alapján látható, hogy a SOD enzimek jelentősen gyorsítják a $\text{O}_2^{\cdot-}$ bomlását.²⁴



1. ábra: A szuperoxid gyökianion spontán bomlásának (négyzet) és a CuZnSOD enzim által katalizált bomlásának (kör) pH-függő sebességi állandói²⁴

A $\text{O}_2^{\cdot-}$ kémiai és biológiai hatásainak vizsgálatához szükséges, hogy stabil és reprodukálható módszer álljon rendelkezésre az előállításra. A szakirodalomban megtalálható legtöbb módszer

molekuláris oxigénből (O_2) állítja elő, amely történhet elektrokémiai redukcióval²⁵, fotokémiai úton²⁶ vagy fémoxidok felületén²⁷. Széles körben azonban szuperoxid sók aprotikus oldószerekben történő oldásával állítják elő a szuperoxid gyökiont. A felhasználás függvényében alkálifém (pl.: NaO_2 , KO_2) vagy alkáliföldfém-sókat (pl.: $Ca(O_2)_2$) használnak, de léteznek kvaterner ammóniumion alapú szuperoxid sók is, mint a tetrabutilammónium-szuperoxid (TBAS) és a trimetilfenilammónium-szuperoxid (TMAS).²⁸ A szuperoxid sók közül a kálium-szuperoxid terjedt el legszélesebb körben előnyös tulajdonságai miatt (pl.: nagyobb tisztaság). Más szuperoxid sókhoz képest jobb az oldhatósága szerves oldószerekben, ami koronaéter jelenlétében tovább növelhető.²⁹ Az aprotikus oldószerek közül a dimetil-szulfoxid (DMSO) az egyik legelterjedtebb, mert nem lép reakcióba a $O_2^{\cdot-}$ -nal és nagyobb oldott szuperoxid anion koncentráció érhető el. Emellett a DMSO gyógyászati alkalmazásai is ismertek, ami tovább növeli az alkalmazásának előnyeit.³⁰ A szintetikus úton előállított DMSO az USA-ban és Európában elfogadott oldószer a gyógyszerek előállítása során. Emellett alkalmazott terápiás módszer a fájó hólyag szindróma (intersticiális cystitis) kezelésére a húgycsőn a húgyhólyagba juttatott DMSO, amely csökkenti a gyulladást.³¹ Vizes oldatokban a szuperoxid gyökiont élettartalma jelentősen kisebb, mint aprotikus oldószerekben.²⁹ Ugyanakkor számos tanulmány számolt be vizes oldatokban $O_2^{\cdot-}$ képződéséről, például: hidrogén-peroxid és nátrium-hidrogén-karbonát reakciójában³², erősen lúgos oldatban perjodát és az oldott oxigén reakciójában³³, xantin-oxidáz és xantin reakciójában³⁴. A K_3 -vitamin elektrokémiai úton redukálható, ami képes katalizálni az oxigén molekulák redukcióját $O_2^{\cdot-}$ -dá.³⁵ A természetes vízben oldott egyes szerves anyagok elnyelik az ultraibolya (UV) sugárzást és gerjesztett állapotba kerülnek, majd a gerjesztett részecske egy elektront ad át a vízben oldott oxigénnek és $O_2^{\cdot-}$ -t képez.³⁶ Egy tanulmány szerint szuperoxid gyökiont állítható elő nátrium-hidroxid és hidrogén-peroxid reakciójában. Ekkor nátrium-peroxid keletkezik, amely a hidrogén-peroxid feleslegével reagálva szuperoxidot eredményez. Bár szilárd nátrium-szuperoxid nem preparálható ki ezzel a módszerrel, de a kis költségvetésű kiindulási anyagok és a vizes közeg ígéretessé teszi az alkalmazását.³⁷

A biokémiai reakciók tanulmányozásán kívül a szuperoxid gyökiont számos esetleges felhasználási módját vizsgálták: veszélyes vegyi anyagok, például halogénezett szénhidrogének megsemmisítésére³⁸, hidrofób szennyezőanyagok és nemvizes fázisú folyadékok lebontására³⁹; köztiterméként oxidatív gyógyszermetabolizmusok képződésében⁴⁰, valamint széles körben használják szerveskémiai reakciókban⁴¹⁻⁴³.

2.2.2. Hidrogén-peroxid (H_2O_2)

A hidrogén-peroxid tiszta formában halványkék színű folyadék, mely jól elegyedik vízzel és könnyen átjut a sejtmembránon.⁴⁴ Erős oxidálószer, mely vízre és oxigén molekulára bomlik. Tulajdonságai miatt széles körben használják az egészségügyben antibakteriális és antimikrobiális szerként.⁴⁵ A hidrogén-peroxid az emlősök szervezetében enzimatis és nem enzimatis folyamatban is képződhet. A mitokondriális légzési útvonalban az oxigén redukciójában képződő szuperoxid anionból H_2O_2 keletkezik.⁴⁶ A szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimek képesek a $O_2^{\cdot-}$ -t detoxifikálni a mitokondriális térben, valamint a citoplazmában és az extracelluláris térben is jelen vannak.⁴⁷ A SOD enzimek a dizmutálási ciklusban a fémion oxidációjával egy időben hidrogén-peroxiddá redukálják a szuperoxid aniont. A H_2O_2 -nak az emlősök szervezetében a redoxi jelátvitelben és a szabályozásban van szerepe.⁴⁸ A reaktív oxigén származékok közül a legstabilabb és igazoltan részt vesz a fehérjefunkció szabályozásában.⁴⁹ A hidrogén-peroxid nagyobb koncentrációban károsíthatja a glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz enzimet, ezáltal akadályozza a glikolízis második szakaszát.⁵⁰ A hidrogén-peroxid a képződésének helyétől, a koncentrációjától, valamint képződésének és bomlásának kinetikájától függően jelátviteli molekulaként működhet vagy oxidatív károsodást okozhat a biomolekulákban.⁴⁴ A H_2O_2 nem enzimatis lebontása a Fenton-reakción keresztül történik, az enzimatis eltávolítást pedig a katalázok, a glutation-peroxidázok és a peroxiredoxinok végzik.⁵¹ Megfelelő körülmények között a hidrogén-peroxidból hidroxilgyök vagy hipoklórossav képződhet.⁵²

2.2.3. Hidroxil gyök ($OH^{\cdot}$)

A hidroxil gyök a legreaktívabb a ROS-ok között. Rövid felezési ideje van ($\sim 10^{-9}$ s), így keletkezési helyéhez közel fejt ki káros hatását, de szinte minden szerves molekulával reagál.⁵³ A hidroxil gyök *in vivo* több különböző útvonalon képződhet. Ezek közül a Fenton-reakció a legjelentősebb, mely során átmenetifém ionok (főként a Fe^{2+}) és hidrogén-peroxid reakciójában képződik a $OH^{\cdot}$. Ezzel szorosan összekapcsolódik a Haber-Weiss ciklus, mely egy Fenton-reakcióból és a Fe^{3+} -ion szuperoxid gyökionon általi redukciójából áll.⁵⁴ Továbbá $OH^{\cdot}$ képződhet bizonyos körülmények között a H_2O_2 homolízisével, illetve a vízmolekula ionizáló sugárzás általi hasadásával.⁴⁴ A hidroxil gyök a DNS-ben lévő mind a négy purin- és pirimidinbázist képes oxidálni, ezáltal jelentős DNS-károsító hatása van.^{55, 56} A fibrinogén polimerizációja fibrinné a véralvadás fontos lépése. Azonban felfedezték, hogy Fe^{3+} -ionok jelenlétében képződő $OH^{\cdot}$ oldhatatlan fibrinszerű csapadékot hozhat

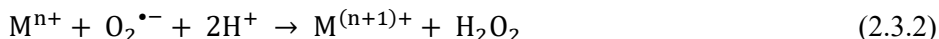
létre, melynek lerakódását számos degeneratív betegség (pl.: cukorbetegség, érlelmeszesedés, rák) esetében megfigyelték.⁵⁴

2.2.4. Szingulett oxigén ($^1\text{O}_2$)

A $^1\text{O}_2$ kémiai vagy fotokémiai útvonalakon energiaátadással képződhet több különböző energiaállapotú oxigénszármazékkal együtt.⁵⁷ A nagy energiájú sugárzások (pl.: röntgen- vagy γ -sugarak) a víz- vagy oxigénmolekula ionizációjával hoznak létre gyökös ROS származékokat, amelyek $^1\text{O}_2$ képződéséhez vezethetnek. Ezen kívül a mieloperoxidáz által termelt hipoklorit és a hidrogén-peroxid reakciójában⁵⁸; a lipid-peroxidok vagy peroxidáz gyökök Russel-mechanizmus szerinti lebontásában⁵⁹, a szuperoxid gyökanion és hidrogén-peroxid reakciójában⁶⁰ vagy a peroxonitrit anion bomlásakor⁶¹ szintén kialakulhat a $^1\text{O}_2$ részecske. A szingulett oxigén elektrofil tulajdonságú és megtámadja a vegyületek π - kötéseit, ennek eredményeként az addíciós reakcióban a C-C kettős kötés átrendeződése játszódhat le. Ezáltal az n-alkénnel hidropoxidot, az 1,4-addíciós reakcióban pedig endoperoxidot képez. Ezen kívül oxidatív módon károsítja a biomolekulákat, például az aminosavakat, a nukleinsavakat⁶² és a lipideket⁶³, valamint közvetett módon egyéb ROS-okat generálva is kifejti káros hatásait. Az aminosavak közül az aromás hisztidin, tirozin és triptofán, valamint a kén tartalmú cisztein és metionin különösen érzékenyek a $^1\text{O}_2$ általi oxidációra. Az aminosavak oxidatív módosulásai a fehérjék tulajdonságainak megváltozását, ezáltal az enzimaktivitás csökkenését és a sejtszerkezet felbomlását eredményezik.⁶⁴

2.3. Szuperoxid dizmutáz (SOD) enzimek

A SOD enzimek az élő szervezetben a szuperoxid gyökanion koncentrációjának szabályozásában vesznek részt, a dizmutálási ciklusban csökkentik ezen káros részecske koncentrációját. Minden ismert SOD enzim egy metalloenzim, melyek egyelektronos oxidációs - redukciós átalakulásuk során két ekvivalens $\text{O}_2^{\bullet-}$ -ot alakítanak át egy-egy ekvivalens hidrogén-peroxiddá és oxigénné (2.3.1) és (2.3.2) egyenletek alapján.⁶⁵ Ezen kívül a $\text{O}_2^{\bullet-}$ spontán bomlása is lejátszódik a vizes közegben (2.3.3) egyenlet szerint.



Három nagy SOD enzim családot különböztetünk meg a központi fémion minősége és a fehérje komplexek általános szerkezete alapján. Ilyen módon megtalálhatóak vas- vagy mangán-tartalmú, réz-cink- és nikkel-tartalmú SOD enzimek.

2.3.1. Vas- és mangán szuperoxid dizmutáz (FeSOD és MnSOD) enzimek

A földi élet kialakulásakor a redukáló közeg minimális mennyiségű molekuláris oxigént tartalmazott. A nagy kéntartalom jelentős mértékben befolyásolta a fémek oldhatóságát, ezáltal a biológiai hasznosulásukat is.⁶⁶ A FeSOD-ok ezen okokból kifolyólag az első SOD enzimnek tekinthetők és a mai napig a leggyakoribbak az aerob és anaerob baktériumtörzsekben.⁶⁷ Továbbá magasabb rendű élőlényekben, archeákban⁶⁸, egysejtű élőlényekben⁶⁹ és növényekben⁷⁰ is azonosítottak FeSOD enzimeket. A mangán tartalmú SOD enzimek szintén megtalálhatóak ezekben az élőlényekben, de általánosságban a FeSOD az alacsonyabb, míg a MnSOD a magasabb rendű élőlényekben fordul elő, például az emberi mitokondriumban is. A FeSOD és MnSOD közel 50%-os szekvenciahomológiát mutat, az aktív helyeik közel azonosak, de a mangán szubsztituált FeSOD és vas szubsztituált MnSOD a legtöbb esetben inaktív.⁷¹ Azonban azonosították a SOD enzimeknek egy olyan csoportját, melyek vasat és mangánt is képesek koordinálni és ugyanazon ligandum vas- és mangán-komplexe is rendelkezik SOD aktivitással.⁷² A FeSOD és MnSOD egyaránt előfordul dimer- és tetramer formában. A homodimer kb. 45kDa tömegű, ahol minden monomernek van egy α -hélix N-terminális doménje valamint egy C-terminális doménje, amely egy α -hélixekkel körülvett háromszálú β -lemezből áll.⁷³ A fémionokat az egyes monomerekben egy feszült trigonális bipiramis geometriában koordinálja három hisztidin és egy aszparaginsav aminosav, valamint egy vízmolekula vagy OH^- -ion.⁷⁴ Mindkét enzim esetében a fémionok oxidációs száma +2-es és +3-as között változik a dizmutálási ciklusban, azonban a redoxipotenciál jelentősen eltér a két fémion esetében. Ezt a tényezőt a különböző Fe- és MnSOD enzimek dizmutálási reakciójában a peptidlánc bizonyos aminosavainak kölcsönhatásával lehet kiküszöbölni, a 69-es és 146-os pozícióban levő hisztidin és/vagy glutamin aminosavakkal kialakított hidrogén kötések révén.⁷⁵

2.3.2. Réz-cink szuperoxid dizmutáz (CuZnSOD) enzimek

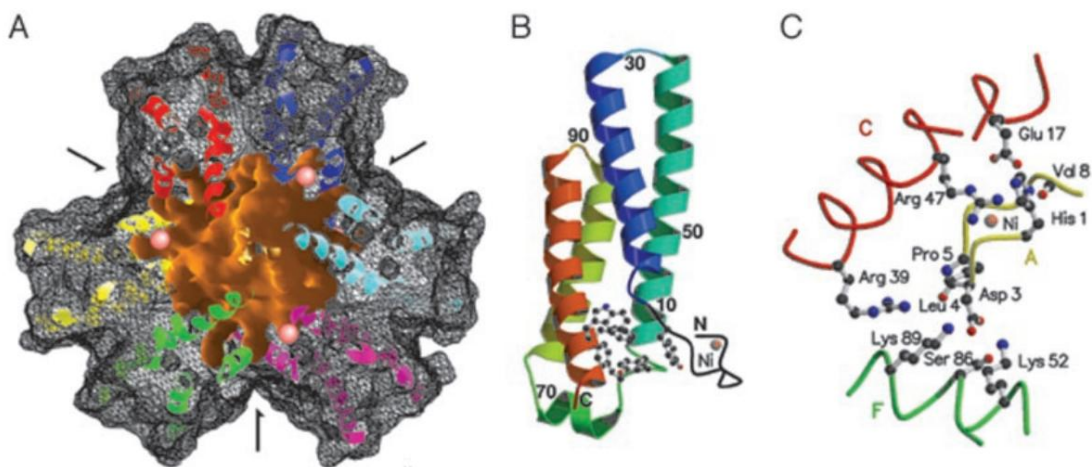
A Föld légkörének redukálóról oxidálóra való megváltozása növelte a réz és a cink biohasznosíthatóságát. Ez az enzimesalád réz- és cinkionokat tartalmaz és úgy vélik, ezek a legmodernebb formái a SOD enzimeknek.¹ A CuZnSOD-ok széles körben elterjedtek, megtalálhatóak a növény- és állatfajokban⁷⁶, valamint az emberi sejtmagban, a citoplazmában⁷⁷, a

mitokondriális intermembrán térben, a kloroplasztban⁷⁸ és még az extracelluláris mátrixban is. A CuZnSOD-ok baktériumokban is előfordulnak, de sokkal alacsonyabb szinten expresszálódik és csak bizonyos Gram-negatív fajokban találhatók meg.⁷⁹ A réz-cink tartalmú SOD enzimek nem találhatók meg archeákban és egysejtű élőlényekben, ami szintén alátámasztja ezen enzimek későbbi kialakulásának elméletét. A szarvasmarha vörösvértestből izolált CuZnSOD volt az első SOD enzim, amiről leírták, hogy katalizálja a $O_2^{\cdot-}$ bomlását.⁸⁰ A CuZnSOD-nak két izoformája létezik: a dimer forma, az intracelluláris CuZnSOD (SOD1), amely főként a citoplazmában, valamint a tetramer forma, az extracelluláris CuZnSOD (SOD3), amely az extracelluláris térben található meg.⁸¹ A SOD1 és SOD3 gén különböző génben kódolódik: az emberi SOD1 gén a 21.⁸², míg a SOD3 gén a 4. kromoszómán lokalizálható.⁸³ A SOD1 dimerként két alegységből épül fel, melyek egyenként 153 aminosavból állnak és mindkét alegység aktív centrumában található egy-egy Cu(II)- és Zn(II)-ion.⁸⁴ A cinkiont három hisztidin és egy aszparaginsav, míg a rézionot négy hisztidin koordinálja. Ezek közül az egyik hisztidin hídként köti össze a két fémiont az imidazol gyűrű nitrogénjein keresztül.⁸⁵ A Cu(II)-ion környezetében továbbá található még két vízmolekula is. A szuperoxid gyökanyon bontásában a rézionok vesznek részt, míg a cinkion a fehérje megfelelő szerkezetének kialakításáért felelős, valamint fokozza az enzim aktivitását.⁸⁴ A dizmutálási ciklusban a réz oxidációs száma +2-es és +1-es között változik.

2.3.3. Nikkel szuperoxid dizmutáz (NiSOD) enzim

A különböző *Streptomyces* fajokból izolált SOD enzim nikkeliót tartalmaz az aktív centrumban, ez a legkésőbb felfedezett SOD enzimsalád.² A NiSOD alacsonyabb rendű élőlényekben, tengeri cianobaktériumokban és algákban fordul elő. Úgy gondolták, hogy a SOD enzimekben a fémion redoxipotenciáljának a fémkomplexek és a $O_2^{\cdot-}$ közötti oxidációs és redukciós reakciójának (2.3.1. és 2.3.2. egyenletek) potenciálja közé kell esnie (~ 360 mV, pH=7). Ez a feltétel a Fe-, Mn- és CuZnSOD-ok esetében teljesül (300 ± 100 mV), az egyelektronos redoxi reakciókban a fémcentrumok vesznek részt. Ilyen módon a Fe^{2+} -, Mn^{2+} - és Cu^{2+} -ionok akvakomplex formában is rendelkeznek SOD-aktivitással⁸⁶, míg a $Ni(H_2O)_6^{2+/3+}$ standard redoxipotenciálja ($> +2V$) ezt nem teszi lehetővé, ezért váratlan a Ni(II)-ion SOD enzim fémcentrumaként való megjelenése. Azonban megállapították, hogy a nikkeltartó huroknak nevezett szekvenciából (HCDLPCGVY, amelyet a szakirodalomban gyakran wtNiSOD rövidítéssel is jelölnek, ahol a wt előtag az angol *wild-type* kifejezésből származik) álló peptidnek, amely a NiSOD enzim N-terminális végét alkotja, 286 mV a redoxipotenciálja a nikkelióval képződő komplexében, amely redoxipotenciál finomhangolásáért főként a Ni-S⁻ kölcsönhatás a felelős.⁸⁷

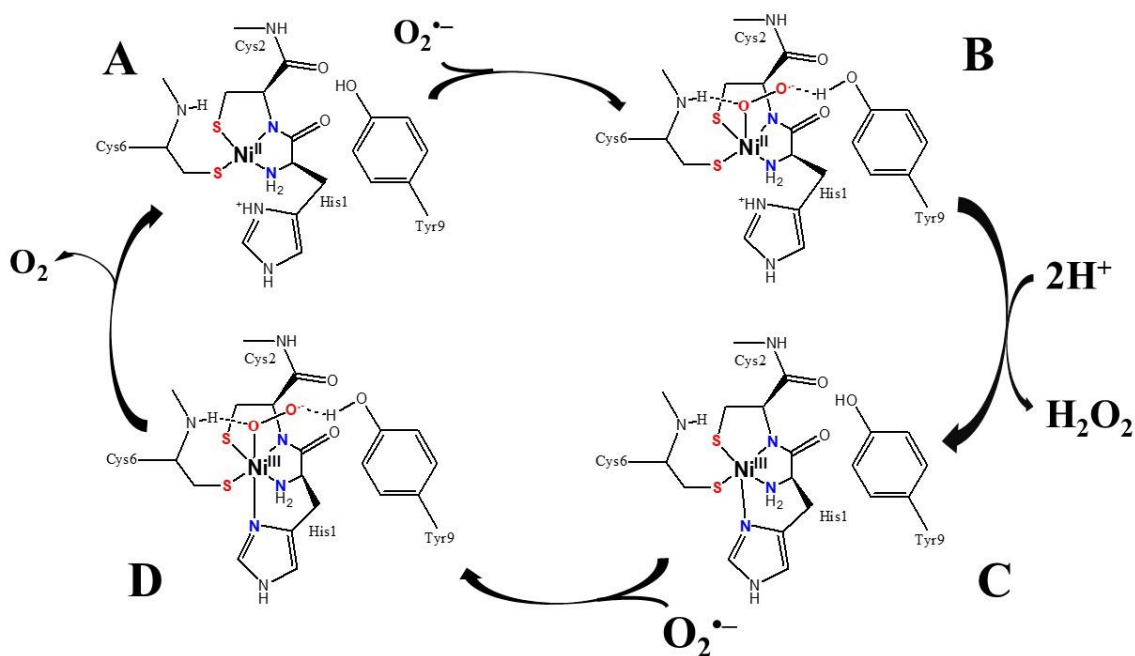
A NiSOD enzim vizes oldatokban homohexamerként van jelen. A hexamer gömb alakú, amelynek külső átmérője 72 Å, belső átmérője pedig 23 Å (2A. ábra), a belső üreg az oldószer molekulák számára átjárható. Az egyes alegységek 117 aminosavból épülnek fel, melyek nagy része egy négy hélixből álló szerkezetbe rendeződik, valamint az N-terminális végén található a kilenc aminosavból álló nikkel-kötő hurok (2B. ábra). Az egyes alegységeket első sorban hidrofób kölcsönhatások stabilizálják, a határfelületen található aminosavak nagy részének hidrofób oldallánca van. Az egyes alegységek hélicei a környező alegységek aktív centrumával állnak kölcsönhatásban, így stabilizálva annak szerkezetét (2C. ábra).⁸⁸



- 2. ábra:** A NiSOD enzim szerkezete a különböző szinteken. A: A NiSOD enzim gömbszerű szerkezete. B: Egy alegység négy hélixből és a nikkel-kötő hurokból álló része. C: Az A-val jelölt alegység nikkel-kötő hurkának szerkezetét a C és F jelölésű alegységek stabilizálják.⁸⁸

A NiSOD peptidlánc N-terminális végének szekvenálása során megállapították, hogy jelentősen eltérő aminosav készlete van, mint az előzőekben ismertetett SOD családoknak.² A Fe/MnSOD-ok és CuZnSOD-ok szerkezetüket tekintve számos közös tulajdonsággal rendelkeznek: hisztidin és aszparaginsav aminosavakból származó N- és O⁻-donoratomok koordinálják a fémiont, melyhez egy további vízmolekula vagy hidroxid-ion is kötődik.^{74, 85} Ezzel szemben NiSOD enzimben N- és S⁻-donoratomok koordinálják a fémiont: a Ni(II)-ionhoz az N-terminális aminocsoport, az első amid nitrogén, valamint a második és hatodik helyen álló cisztein tiolát-csoportjai kötődnek, így síknégyszetes geometria alakul ki. A tiolát-csoportok jelenléte az aktív centrumban példa nélküli a többi SOD enzim körében, mivel érzékeny az oxidációra, azonban számos nikkel-tartalmú enzimre

jellemző a Ni-S⁻ koordináció fiziológias körülmények között.⁸⁹ A vizsgált nikkeltartalmú fehérjék közül azonban csak a redoxi-aktív enzimekre jellemző a tiolat koordináció, ezért feltételezik, hogy a redoxi-aktív nikkeltartalmú fehérjék kialakulásának feltétele a Ni-S⁻ koordinatív kötés jelenléte.⁸⁹ Megállapították, hogy az ötödik helyen lévő prolin szerepe kulcsfontosságú a cisz-konformáció kialakulásához, a Cys6 koordinációja csak ebben a szerkezetben valósulhat meg.⁹⁰ A dizmutálási ciklusban a Ni(II)-ion oxidálódik Ni(III)-ionná egy protoncsatolt elektrontranszfer mechanizmus szerint. Az enzim oxidált állapotában az első helyen lévő hisztidin imidazol nitrogénje axiális pozícióban koordinálódik a Ni(III)-ionhoz, ezáltal négyzetes piramisos geometria alakul ki. Ezen megfontolások szerint javaslatot tettek a dizmutálási ciklus mechanizmusára az eddig megismert SOD-ok alapján, amelyet a 3. ábra mutat be.⁹⁰



3. ábra: A NiSOD enzim dizmutálási ciklusának mechanizmusa.⁹⁰

A 3. ábrán A-val jelölt Ni(II)-komplex síknégyzetes geometriájú. A dizmutálási ciklus első lépésében egy $O_2^{\cdot-}$ koordinálódik a fémionhoz, melyet hidrogén kötással stabilizál egy amid hidrogén és a kilencedik helyen lévő tirozin fenolos hidroxilcsoportja (B komplex). Az adduktumból ezután egy hidrogén-peroxid távozik miközben megváltozik a nikkeltartalmú fehérje oxidációs állapota és a His1 imidazol nitrogénjének axiális koordinációjával négyzetes piramisos komplex alakul ki (C komplex). A következő lépésben egy újabb $O_2^{\cdot-}$ koordinációjával egy oktaéderes szerkezet alakul ki, melyben a gyökiont ismét az amid hidrogén és a tirozin fenolos hidroxilcsoportja

rögzíti a D-vel jelölt formában. A dizmutálási ciklus utolsó lépésében egy oxigénmolekula távozásával visszajutunk a síknégyzetes Ni(II)-komplexhez.⁹⁰

2.4. NiSOD enzimmodellek

A NiSOD enzim N-terminális végének első kilenc aminosava (HisCysAspLeuProCysGlyValTyr) alkotja a nikkelt kötés hurkot. Ezek közül az első hat aminosavból (HCDLPC) álló peptid nikkelt-komplexről megállapították, hogy a NiSOD enzimre jellemző koordinációs móddal és SOD aktivitással rendelkezik.⁹¹ Ez a tény megkérdőjelezi az előző alfejezet végén felvázolt reakcióséma helyességét a dizmutálási reakció mechanizmusára. A szakirodalomban eddig a NiSOD enzim számos modelljét vizsgálták annak érdekében, hogy felderítsék az egyes aminosavak szerepét a fémion megkötésében, a megfelelő szerkezet kialakításában és a dizmutálási reakcióban.

Neupane és munkatársai H₂N-XCDLPCG összetételű peptidek nikkeltkomplexeit vizsgálták, ahol az X hisztidint, aszparaginsavat vagy alanint jelölt. A hisztidin cseréje nem befolyásolta jelentősen a peptid Ni(II)-kötő képességét, azonban a SOD aktivitásuk csökkent a pontmutációval: az aszparaginsav tartalmú modell esetében ez kis mértékű, míg az alanint első helyen tartalmazó mutáns esetében egy nagyságrendű csökkenés volt tapasztalható a McCord-Fridovich módszerrel meghatározott IC₅₀ értékben. Az első helyen aszparaginsavat és alanint tartalmazó mutánsok esetében a Ni(III)-komplexben nem valósulhat meg a nitrogénatom axiális koordinációja, ami a 3. ábrán látható reakcióséma szerint a dizmutálási ciklus kialakulásának feltétele. Ezzel alátámasztották, hogy az axiális ligandum hiánya nem eredményez SOD inaktív komplexet, de jelenléte optimalizálja a NiSOD aktív helyét a katalízishez.⁹¹ Vizsgálták, hogy az N-terminális aminocsoport acilezése hogyan befolyásolja a komplexképződést és a SOD aktivitást. Ez a szerkezeti módosítás jelentősen csökkentette a peptid nikkelt-kötő képességét. Ezen 9 tagú peptid Ni(II)-komplexét KO₂-dal oxidálták és ESR spektroszkópia segítségével vizsgálták a szerkezetét. Megállapították, hogy a komplex oxidált formájában axiális helyzetben tiolát-csoport(ok) található(k).⁹² Hasonló megfontolás alapján egy 12 aminosavból álló, N-terminálisan acilezett származékot is tanulmányoztak és megállapították, hogy ez a modell katalitikus szempontból inaktív, ugyanis KO₂ hatására a tiolát-csoportok oxidációja következett be.⁹³ Egy másik tanulmányban a második helyen lévő cisztein amid nitrogénjét egy szekunder aminnal helyettesítették, ekkor a peptid a Ni(II)-ionnal fiziológias pH-n egy dimert alkotott, amelyben két peptid a tiolát-donorcsoporton keresztül tetraéderes geometriát alakít ki (4 S⁻)-koordinációval. A komplex azonban nem mutatott SOD aktivitást, ahogy az N-terminálisan acilezett származék sem,

így megállapították, hogy a tiolát-csoportok oxidációja megelőzhető, ha amin- és amid-típusú nitrogén is részt vesz a fémion koordinálásában.⁹⁴

A NiSOD enzimben a fehérjelánc kölcsönhatásai miatt a Ni(III)-N_{Im} kötés megnyúlik, ami a kisebb tagszámú peptidek esetében alapállapotban nem lehetséges. Ezért különböző elektronküldő és -szívó csoportokkal (metil-, tozil- (Tos), 2,4-dinitrofenil (DNP)) funkcionizálták az imidazol pirrol-típusú nitrogénjét. Megállapították, hogy a metilezett származék esetén erősebb, míg a Tos- és DNP-csoportokat tartalmazó modellek esetében gyengébb a Ni(III)-N_{Im} kölcsönhatás. Ezt a SOD aktivitás értékek is tükrözik: a metilezett származék esetében egy nagyságrenddel nagyobb, míg a Tos- és DNP-tartalmú mutánsok esetében egy nagyságrenddel kisebb IC₅₀ értéket kaptak.⁹⁵

Az aminosav láncokból álló modelleken túl az utóbbi időben egyre nagyobb hangsúlyt kapnak azok a kis molekulatömegű vegyületek, amelyek nagy stabilitással képesek kötni a fémiont (jelen esetben a nikkelt) és jelentős a SOD aktivitásuk. Előállítottak egy amino-karboxamido-ditionát típusú ligandumot, amely tartalmazza azokat a funkciós csoportokat, amelyek a NiSOD enzimben a fémion megkötéséért és a SOD aktivitásért felelősek. A Ni(II)- és Ni(III)-komplexeinek koordinációs módja megegyezik a NiSOD enzim redukált és oxidált formájában megszokottal. A dizmutálási reakció mechanizmusának tanulmányozásakor valószínűsítették, hogy míg a Ni(II)-komplex oxidációjakor a fémionhoz koordinálódik a szuperoxid gyökkanion, addig a Ni(III)-redukciójakor ez a kölcsönhatás nem alakul ki a fémion és a O₂⁻ között.⁹⁶

2.5. A nikkelt biológiai szerepe és koordinációs kémiája

A nikkelt biológiai fontosságát még nem sikerült igazolni az emberi szervezetben, azonban a nikkelt hiány negatív hatással lehet az állatok fiziológiai állapotára. Főként háziállatokon végzett kísérletek igazolták, hogy a nikkelt hiány növekedési zavart, alacsony plazma glükóz szintet okoz és megváltoztatja a mikrotápanyagok (pl.: vas, kalcium, cink) felszívódásának mértékét.⁹⁷ A nikkelt számos növény és mikroorganizmus számára létfontosságú nyomelemnek számít. A növények nikkelt-felvétel és -tolerancia mértéke széles tartományban változik, a különböző fajok és élőhelyek esetében. A nikkelt-ről kimutatták, hogy serkenti a növények növekedését, azonban a magasabb rendű növényekben felhalmozódva csökkenti a fotoszintézist.⁹⁸ A természetben számos nikkelt tartalmú enzim található a NiSOD enzimen kívül. Az elsőként felfedezett nikkelt-tartalmú enzim az ureáz volt, amely katalizálja a karbamid szintézisét. Egyes hidrogenázok vas mellett nikkelt is tartalmaznak, ahol a nikkeltiont négy cisztein tiolát csoportja koordinálja, ezek közül kettő kétfogó ligandumként köti össze a nikkelt- és vascentrumokat.⁹⁹ Az acetil-CoA szintáznak is van nikkelt és

vas centruma. Ebben az esetben a nikkelt két tiolát-csoport és két amid nitrogén koordinálja, ahol a két tiolát kétfogú donoratomként egy további nikkellionhoz kötődik, amely hídként köti össze az első nikkelliont egy újabb kétfogú tioláton keresztül a vascentrummal.¹⁰⁰

A nikkel oxidációs száma 0 és +4 között változik a komplexeiben, de léteznek negatív oxidációs számú nikkelt tartalmazó komplexek is (pl.: $[\text{Ni}_2(\text{CO})_6]^{2-}$, ahol a nikkel oxidációs száma -1). Ezen komplexek koordinációs száma 3 és 7 között változhat, ami változatos sztereokémiai tulajdonságokat tesz lehetővé: síkháromszög alakú, síknégyzetes, tetraédes és oktaédes geometria is kialakulhat. A nikkel +2-es oxidációs állapota a legstabilabb vizes oldatokban, komplexeiben a koordinációs száma általában 6 vagy az alatti. Ezek leggyakrabban síknégyzetes (4-es koordináció) vagy oktaédes (6) geometriájúak, de van példa tetraédes (4), trigonális bipiramisos (5) és négyzetes piramisos (5) szerkezetekre is. A legtöbb esetben a síknégyzetes komplexek színe a vöröstől a sárgáig terjed és diamágnesesek, míg az oktaédes komplexek zöld vagy kék színűek és paramágnesesek. Ha a ligandumtér kellően alacsony szimmetriájú és nagy erősségű, a d pályák felhasadása olyan módon történhet, hogy az elektronok az alacsonyabb energiájú pályán párosodhatnak, így a síknégyzetes geometria lesz kedvezményezett az oktaédes szerkezettel szemben.¹⁰¹ Alapvetően a tetraédes térszerkezettel szemben is kedvezményezett a síknégyzetes elrendeződés az ilyen tulajdonságú ligandumok esetén, azonban ha ezek nagy térkitöltésűek a sztérikus gátlás miatt mégis tetraédes térszerkezetű komplexek képződhetnek.

2.6. A peptidek koordinációs kémiája

A peptidek koordinációs kémiája rendkívül változatos, amit a kapcsolódó aminosavak száma és minősége (főként a koordinációra hajlamos oldallánccal rendelkező aminosavaké), valamint a fémion minősége együttesen alakít ki. Mivel a NiSOD enzim fémion megkötésért felelős szakasza hisztidin és cisztein aminosavakat tartalmaz, a továbbiakban ezen peptidek komplexképző sajátságait fejtem ki.

2.6.1. A hisztidin tartalmú peptidek koordinációs kémiája

A hisztidin aminosav rendkívül jó komplexképző, azonban a hisztidin tartalmú peptidek esetében a koordinációs módot a szekvenciában elfoglalt helye és a hisztidinek száma nagy mértékben befolyásolja. A hisztidin imidazol oldallánca az aminosav komplexeiben (5,6)-tagú csatolt kelátrendszer kialakulását teszi lehetővé: az öttagú, aminosavszerű (NH_2 , COO^-) és a hattagú, hisztaminszerű (NH_2 , N_{im}) koordináción keresztül.¹⁰²

Az N-terminális hisztidint tartalmazó peptidek esetén az aminocsoport és az imidazol nitrogénjének kötődése a fémionhoz hisztaminszerű koordinációt tesz lehetővé.¹⁰³ Ligandumfelesleg esetén biszkomplexek kialakulása tapasztalható, ami az egyszerű oligopeptidekhez képest jelentős stabilitásnövekedést okoz.^{104, 105} Ez a koordinációs mód számos fémionnal megvalósul, beértve a legtöbb kétértékű átmenetifém iont. A kétfogú koordináció nem telíti a fémion koordinációs szféráját az ekvimoláris rendszerekben, ami a komplexek hidrolízisét vagy imidazol-hidas dimer részecskék megjelenését eredményezi. A dimer komplexek csak azon fémionok esetében alakulnak ki lúgos pH-tartományban, amelyek képesek deprotonálni az amid nitrogént. A legegyszerűbb példa a HisGly és Cu(II) rendszer, ahol savas pH-n hisztaminszerű komplex alakul ki, a pH növelésével azonban (NH_2 , N^- , COO^-) koordináció alakul ki, amit egy másik peptid imidazol nitrogénjének koordinációja kiegészít, így alakítva ki a $[\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_2]$ sztöchiometriájú dimer részecskét.¹⁰⁶

A második helyen hisztidint tartalmazó peptidek esetén a fő koordinációs mód az (NH_2 , N^- , N_{Im}), ami egy (5,6)-tagú csatolt kelátrendszer eredményez. Ezen komplexeknek nagy stabilitása van Cu(II)-ionok esetén, melyet oldategyensúlyi és szerkezetvizsgálati módszerekkel is alátámasztottak.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ A háromfogú koordináció azonban még mindig nem telíti a fémionok koordinációs szféráját. Ennek a csoportnak a legegyszerűbb képviselője a GlyHis, amelynek Cu(II)-, Ni(II)- és Pd(II)-komplexeinél imidazzal áthidalt tetramer részecskék megjelenését írták le.¹¹⁰ Később a dipeptid Au(III)-komplexénél is igazolták a tetramer formát röntgendiffrakció segítségével.¹¹¹ A peptidek amid nitrogénjének deprotonálására csak néhány fémion képes, a GlyGly esetén a Cu(II)-, Ni(II)- és Pd(II)-ionok. Azonban az Xaa-His dipeptideknél a Co(II)- és Zn(II)-komplexek esetén is beszámoltak az amid nitrogén fémion indukált deprotonálódásáról és koordinációjáról.^{112, 113}

A harmadik helyen hisztidint tartalmazó peptidek termodinamikailag az egyik legstabilabb komplexeket alkotják a Cu(II)- és a Ni(II)-ionokkal. Ennek oka, hogy már savas pH-n megtörténik a hisztidin és az N-terminális aminocsoport közti két amid nitrogén deprotonálódása és koordinációja a fémionhoz. Így egy (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer alakul ki (NH_2 , N^- , N^- , N_{Im}) koordinációs móddal, ezáltal a fémion koordinációs szférája telített lesz. Ez a koordinációs mód figyelhető meg az albumin fehérjék N-terminális régiójában, mely magyarázza ezen fehérjék nagy Cu(II)- és Ni(II)-kötő sajátságát. Emiatt ezt a kötőmódot albuminszerű koordinációnak vagy ATCUN-motívumnak (*Amino Terminal CuNi Binding Site*) is nevezik.¹¹⁴ Az eddig tárgyalt pozíciókkal ellentétben itt már nem, vagy csak nagyon kis mennyiségben (és nagy ligandum

felesleg esetén) jelennek meg biszkomplexek. Az albuminszerű koordinációs mód Co(II) -komplexek esetén nem alakul ki, a pH növelésével az imidazol pirrol típusú nitrogénjének deprotonálódása játszódik le, amelyhez fémion koordináció nem társul.¹¹⁵ A Co(II) -ionhoz hasonlóan a Zn(II) -ion sem képes deprotonálni az amid nitrogént ezekben a fehérjékben, míg a második helyen hisztidint tartalmazó peptidek esetében ez a folyamat lejátszódik.¹¹⁶ Palládium(II)- és arany(III)-ionokkal szintén kialakul az (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer az amid nitrogének deprotonálódásával és koordinációjával, amely nagy stabilitású komplexek képződését eredményezi.¹¹⁷

A szekvencia negyedik vagy attól távolabbi helyén hisztidint tartalmazó peptidek esetében megnő a koordinációs izomerek száma. Ezekben a komplexekben az N-terminális aminos csoport és a hisztidin is horgonycsoportként viselkedhet. Az Xaa-Yaa-Zaa-His tetrapeptidek esetén savas pH-n makrokelát komplexek alakulnak ki a Cu(II) - és Ni(II) -ionokkal (NH_2 , N_{Im}) koordináció mellett. A pH növelésével az amid nitrogének deprotonálódnak és két, majd három kelátgyűrűből álló rendszer alakul ki. Ekkor a hisztidin imidazol nitrogénje szolgál horgonycsoportként és megszűnik az aminos csoport koordinációja.^{118, 119} Egy további tanulmányban vizsgálták a peptidek Cu(II) -komplexeit a Gly_nHis ligandumok esetén, ahol az n 3 és 5 között változott. Megállapították, hogy a $[\text{CuL}]^+$ komplexben a fémion koordinációjában az N-terminális aminos csoport, a karbonil oxigén és az imidazol nitrogénje vesz részt makrokelát rendszerben, melynek stabilitása csökken a peptidben lévő aminosavak számának növekedésével. A pH növelésével az amid nitrogének deprotonálódása és koordinációja valósul meg az első amid nitrogéntől kiindulva, azonban bizonyították, hogy az aminos csoport koordinációja nem szűnik meg a $[\text{CuLH}_3]^{2-}$ összetételű komplexben sem. A koordinációs mód a három különböző tagszámú peptid komplexeinél azonos volt a $[\text{CuL}]^+$, $[\text{CuLH}_1]$ és $[\text{CuLH}_2]^-$ részecskékben, azonban az utolsó deprotonálódási lépésben a penta- és hexapeptid komplexében megszűnik az imidazol koordináció, míg a GlyGlyGlyHis esetében a $[\text{CuLH}_3]^{2-}$ összetételű komplexben az imidazólium axiális pozícióban kapcsolódik a fémionhoz.¹²⁰ Ha a hisztidin kellően távol helyezkedik el az N-terminális aminos csoporttól, dinukleáris részecskék is létrejöhetnek a két potenciális horgonycsoport részvételével.¹²¹

A két vagy több hisztidint tartalmazó ún. multihisztidin peptidek számos formáját vizsgálták már a szakirodalomban, mert sokuknak fontos biológia szerepe van a különféle emberi megbetegedésekben, például a neurodegeneratív rendellenességekben vagy tumorokkal kapcsolatos fiziológiai folyamatokban. Ezek közül a prionfehérje és az amiloid- β fehérje

peptidfragmensei állnak a kutatások központjában, mert az előbbi a prionbetegség (más néven fertőző szivacsos agyvelőgyulladás), míg az utóbbi az Alzheimer-kór kialakulásában vesz részt. Ezen peptidek esetén leggyakrabban a Cu(II)-komplexeiket jellemezték, de vannak példák Ni(II)-, Pd(II)-, Zn(II)- és Cd(II)-komplexekre is.¹²² A legegyszerűbb multihisztidin peptid a His-His dimer, melynek Cu(II)-komplexében három különböző koordinációs módot írtak le a pH-függvényében monomer és dimer formákban.¹²³ A glicin és hisztidin aminosavakból felépülő tetrapeptidek különböző szekvenciájú képviselőinek Cu(II)-komplexeit jellemezték (HisGlyHisGly, HisHisGlyGly¹²⁴; GlyHisGlyHis¹²⁵) és megállapították, hogy változatos koordinációs móddal rendelkeznek a különböző pH-kon, melyben amino-, deprotonált amid és imidazol nitrogén koordináció valósul meg. Az ismétlődő Gly-His alegységekből felépülő oktapeptid (GlyHisGlyHisGlyHisGlyHis) komplexképző sajátságait vizsgálták Cu(II)- és Ni(II)-ionok esetén.¹²⁶ Komplexeiket tekintve a két fémion esetén bizonyos tendenciák figyelhetők meg. A Cu(II)-ion általában lokálisan két, három vagy négy aminosavon belül koordinálódik, valamint az ekvatoriális és axiális donorcsoportok felcserélődhetnek. A pH változtatásával a különböző donorcsoportok (aminocsoport, imidazol nitrogén) koordinációja és a ligandum disszociációja is lejátszódhat ugyanazon peptid esetében. Ezzel szemben az egynél több hisztidint tartalmazó peptidek Ni(II)-komplexeinél két fő koordinációs módot állapítottak meg fiziológiás pH-n, melyek mindegyike síknégyszetes geometriájú: a csak imidazol koordinációt, vagy a GlyGlyHis tripeptidnél leírt (NH₂, N⁻, N⁻, N_{Im}) kötésmódot.¹⁰²

Az N-terminálisan védett peptidek fémion affinitása jelentősen csökken az aminocsoport gátolt koordinációja miatt, azonban a hisztidin imidazol nitrogénje horgonycsoportként szolgálhat a fémionokkal kialakuló komplexekben.¹²⁷ Az egy hisztidint tartalmazó, N-terminálisan védett peptidek esetén a hisztidin szekvenciában betöltött helye és az előtte lévő aminosavak minősége (nem deprotonálható peptidkötést kialakító aminosavak pl.: prolin vagy szarkozin) alapvetően meghatározza a komplexek koordinációs módját és stabilitását.¹²⁸ A két vagy több hisztidint tartalmazó N-terminálisan védett peptidek esetén több tényező is befolyásolja a komplexek stabilitását. Az imidazol-fémion koordináció a Cu(II)-, Ni(II)-, Zn(II)-, Cd(II)- és Co(II)-komplexek esetében is megjelenik enyhén savas és semleges oldatokban, azonban a pH növelésével az amid nitrogén deprotonálódása és koordinációja nem történt meg a Cd(II)- és Co(II)-komplexekben.^{129, 130} A hisztidinek számának növelésével nő az imidazzal koordinált komplexek stabilitása és szélesebb pH-tartományban dominálnak ezek a részecskék, így az amid nitrogén koordinációja visszaszorulhat.¹³¹ A hisztidinek távolságának vizsgálatakor

megállapították, hogy abban az esetben a legstabilabbak a komplexek, ha a hisztidineket egy aminosav választja el.^{132, 133}

2.6.2. A cisztein tartalmú peptidek komplexképző sajátosságai

A cisztein tartalmú peptidek kiemelkedő biológiai jelentőségűek, melyek közül a leggyakoribbak a kék rézfehérjék, a cink-ujj fehérjék, a vas-kén fehérjék és a metallotioneinek. A hisztidinhez hasonlóan a ciszteinnek is erősen koordináló donorcsoportja van, azonban a tiolát-csoport szelektívebb kötést tesz lehetővé.¹³⁴ A cisztein tartalmú peptidek esetén szintén változatos koordinációs kémiai komplexek alakulhatnak ki az aminosav szekvenciában betöltött helyzetének és a fémion minőségének függvényében, azonban a tiolát-csoportok ezen felül képesek kén-hidas komplexeket is kialakítani. A tiolát-csoport oxidációra érzékeny, így a redoxi-aktív fémionokkal (pl.: Cu(II)- és Fe(III)-ionok) képesek redoxi reakcióba lépni és diszulfidhidas peptidek jelenhetnek meg.

Az N-terminális ciszteint tartalmazó dipeptid esetén stabil biszkomplexek alakulnak ki Ni(II)-, Cd(II)-, Zn(II)- és Co(II)-ionokkal. Az öttagú kelátgyűrűben (NH₂, S⁻) koordináció található és az amid nitrogén deprotonálódása és koordinációja visszaszorul ezekben az esetekben.¹³⁵ Nagyobb fémion-ligandum koncentráció arány esetén a Ni(II)-ionnal többmagvú komplexek is kialakulhatnak, melyben a tiolát-csoportok hídként kötik össze a fémcentrumokat.

A C-terminális ciszteint tartalmazó peptidek esetében a Ni(II)-ion indukálja az amid nitrogének deprotonálódását és koordinációját di- (AlaCys, GlyCys, PheCys) és tripeptidekkel (GlyGlyCys, AlaAlaCys) kialakuló komplexeiben.¹³⁶ A dipeptidek Ni(II)-komplexeiben a koordinációs szféra nem telített, lehetőséget teremtve többmagvú részecskék kialakulására. Ezzel szemben a tripeptidek esetén a deprotonált amid nitrogének koordinációjával (NH₂, N⁻, N⁻, S⁻) a koordinációs szféra telített és síknégyszetes geometria alakul ki. A Cd(II)-, Zn(II)- és Co(II)-ionok ezzel szemben a (S, O) koordinációt részesítik előnyben és biszkomplexek alakulnak ki az előbb említett di- és tripeptidekkel.¹³⁵

A második helyen ciszteint tartalmazó peptidek (NH₂, N⁻, S⁻) koordinációs módú komplexeket alakítanak ki a Ni(II)- és a Pd(II)-ionokkal, ahol a peptidváz első amid nitrogénje deprotonálódik és koordinálódik. Ez a háromfogú koordinációs mód lehetővé teszi dimer részecskék kialakulását a kén donoratomokon keresztül. A Xaa-Cys peptidek esetében a Zn(II)- és Co(II)-ionok nem képesek deprotonálni az amid nitrogént.

A hisztidin tartalmú peptidekhez hasonlóan a Xaa-Yaa-Cys szekvencia is kiemelt stabilitású komplexeket képez a Ni(II)-, Pd(II)- és Pt(II)-ionokkal. A (NH_2 , N^- , N^- , S^-) koordinációs mód telíti a fémionok koordinációs szféráját és síknégyszetes komplexek alakulnak ki az említett fémionokkal.¹³⁷

A biológiaiailag fontos peptidek a legtöbb esetben több ciszteint is tartalmaznak, így a szakirodalomban számos kistagszámú modellpeptid vizsgálatára találhatunk példát. Külön és munkatársai CXC motívumot tartalmazó modellvegyületek komplexképző sajátságait vizsgálták Ni(II)-, Zn(II)- és Cd(II)-ionnal. Megállapították, hogy a tiolát-csoportok az elsődleges fémionkötőhelyek és a képződő ML_2 összetételű komplexekben (4S^-) koordinációs mód alakul ki. A Ni(II)-komplexekben azonban lúgos pH-tartományban az amid nitrogének deprotonálódásával és koordinációjával a (2S^- , 2N^-) kötésmód jelenik meg.¹³⁸ Lukács és munkatársai vizsgálták, hogyan befolyásolja a két ciszteint tartalmazó peptidek komplexképző sajátságait a ciszteinek közötti távolság a CX_nC ($n=1-3$) összetételű ligandumok esetén Zn(II)-, Cd(II)-, Pb(II)- és Ni(II)-ionokkal. Megállapították, hogy biszkomplexek alakulnak ki Zn(II)-, Cd(II)- és Pb(II)-ionokkal, azonban a Ni(II)-komplexek esetén polinukleáris részecskék képződnek az Ac-SCCS- NH_2 , Ac-CSC- NH_2 és Ac-CSSC- NH_2 peptidekkel. A többmagvú komplexekben a fémionokat tiolát-csoportok kötik össze és a képződésükre való hajlam a ciszteinek közötti távolság csökkenésével nő. Az Ac-SCCS- NH_2 peptid esetén 11-es pH alatt nem jelenik meg mononukleáris komplex, a távolság növelésével azonban a peptid nitrogének deprotonálódása és koordinációja valósul meg, így az egymagvú $[\text{NiLH}_2]$ dominanciája nő.¹³⁹

2.6.3. Vegyes kötőhelyű (hisztidin és cisztein) peptidek komplexképző sajátságai

A hisztidint és ciszteint tartalmazó peptideket széleskörűen tanulmányozták a különböző bioaktív fehérjék modellezésére. A szekvenciát tekintve a legegyszerűbb képviselők a HisCys és CysHis dipeptidek. Glockel és munkatársai ezen dipeptidek, valamint N- és/vagy C-terminálisan védett mutánsainak Zn(II)-komplexeit vizsgálták. A legnagyobb stabilitású $[\text{ZnL}]$ komplex a CysHis ligandummal alakul ki, de általánosságban a peptidek cinkkötő képessége a következő sorrendben csökken: szabad N- és C-terminális > C-terminálisan védett > N-terminálisan védett > N- és C-terminálisan védett. A szekvencia tekintetében kis mértékű különbség tapasztalható az azonos védőcsoportokat tartalmazó HisCys és CysHis peptidek esetében a Zn(II)-komplexek stabilitására vonatkozóan. Monomer és biszkomplexek megjelenése szempontjából a nyolc ligandum két csoportra oszlik: az Ac-CysHis-OH, H-CysHis- NH_2 , Ac-CysHis-OEt és Ac-HisCys-OEt

dipeptidekkel biszkomplexek is megjelennek (bár nem jelentős mennyiségben), míg a többi esetben csak különböző protonáltsági fokú monomer részecskék képződnek. A $[ZnL]$ összetételű komplexekben háromfokú koordinációt feltételeznek, ahol az imidazol nitrogén és a tiolát-csoport mellett az N-terminális aminocsoport vagy a C-terminális karboxilát kötődik a fémionhoz a védőcsoportok függvényében, a koordinációs szférát pedig egy vízmolekula egészíti ki.¹⁴⁰ Szintén ez a kutatócsoport vizsgálta a hisztidin és/vagy cisztein tartalmú ciklikus dipeptidek cink(II)-kötő képességét. A komplexek stabilitása a $c\text{-GlyHis} < c\text{-HisHis} < c\text{-GlyCys} < c\text{-CysHis} < c\text{-CysCys}$ sorrendben nő, ami alátámasztja a tiolát-csoportok stabilizáló hatását a Zn(II)-komplexekben. A Zn(II) / $c\text{-CysHis}$ rendszerben monomer és biszkomplexek is megjelennek, ahol a tiolát-csoportok és az imidazol nitrogének koordinálnak a fémionhoz.¹⁴¹

A nagyobb tagszámú peptidek esetén a hisztidin és cisztein aminosavak száma, az egymáshoz viszonyított távolsága, a C- és N-terminális végektől való távolságuk, valamint a további aminosavak és a fémion minőségének függvényében széles körben változhatnak a képződő komplexek koordinációs módjai. Sóvágó és munkatársai ezen két aminosav tartalmú peptidek számos képviselőjét tanulmányozták. Az AAHAAC-NH₂ és AHAAAC-NH₂ peptidek Ni(II)-, Zn(II)-, Cd(II)-, Cu(II)- és Pd(II)-ionokkal képződő komplexeit vizsgálták. A harmadik helyen hisztidint tartalmazó peptid albuminszerű szekvenciát tartalmaz az N-terminális régióban, aminek kiemelt Ni(II)- és Cu(II)-affinitása van. A Ni(II)-ion esetén ekvimoláris oldatban monomer komplexek képződnek, ahol (NH₂, N⁻, N⁻, N_{Im}) koordináció alakul ki, azonban a fémion : ligandum 2:1 koncentráció arányú rendszerében valószínűsíthető, hogy a deprotonált tiolát-oldalláncok egy második fémionhoz koordinálnak egy kétmagvú komplexben. A peptid Cu(II)-komplexében szintén az előzőleg leírt koordinációs mód alakul ki ekvimoláris oldatban, ami védi a tiolát-csoportokat a redoxireakciótól, azonban fémion feleslegében a Ni(II)-komplextől eltérően nem kétmagvú részecskék képződnek, hanem redoxireakciók játszódnak le. A Zn(II)- és Cd(II)-ionok nem képesek deprotonálni az amid nitrogént és biszkomplexek képződnek, ahol az imidazol nitrogének és a tiolát-csoportok koordinálják a fémiont. Az AHAAAC-NH₂ ligandum esetén hasonló koordinációs mód jellemző a Ni(II)-, Zn(II)- és Cu(II)-komplexeknél, azonban a donorcsoportok eltérő sorrendben kötődnek a fémionhoz. A Ni(II)- és Zn(II)-ionok komplexeiben az aminocsoport és imidazol koordinációját a tiolát makrokelát kötődése egészíti ki, majd a pH növelésével a deprotonált amid nitrogén koordinációja valósul meg. Ezzel szemben a Cu(II)-ion esetén savas pH-tartományban az (NH₂, N_{Im}, N⁻) kötésmód alakul ki, majd lúgos tartományban deprotonálódik és koordinálódik a tiolcsoport. A Cd(II)-ionok ezen peptid esetén sem képesek

indukálni az amid nitrogén deprotonálódását, így biszkomplexek képződése lesz jellemző. A Pd(II)-ionok általában nagyobb affinitást mutatnak az amid koordinációra a tiolát-csoportok koordinációjával szemben, azonban mindkét peptid esetén a tiolát-csoportok az elsődleges kötőhelyek, a fennmaradó koordinációs helyeket az amino-, imidazol- és egy amid nitrogén foglalják el.^{142, 143}

Chekmeneva és munkatársai a HIV vírus egyik inihibitorának modelljét (HysCysLysPheTrpTrp) vizsgálták. A hexapeptid Zn(II)-ionokkal képez komplexet, melyet esetleg Cd(II)- és Pb(II)-ionok helyettesíthetnek, így ezen három fémion komplexképző sajátosságait vizsgálták differenciál impulzus polarográfia (DPP) segítségével. A Cd(II)- és Zn(II)-komplexek fiziológiás pH-n főként ML₂ biszkomplex formában vannak jelen, kis mértékben azonban a monomer részecskék is kimutathatóak. Különböző kísérleteket végeztek annak felderítése érdekében, hogy a Cd(II)-ion képes-e kiszorítani a Zn(II)-ionokat a koordinációs szférából. A komplexek stabilitási állandói nem különböznek jelentősen a két fémion esetén, a kísérleti eredmények pedig alátámasztották, hogy a Cd(II)- és Zn(II)-ionok kompetíciós reakciókban párhuzamosan képeznek komplexeket a peptiddel. A Pb(II)-ion esetében azonban nem tapasztaltak komplexképződést.¹⁴⁴

A metanobaktinok Cu(I)-kötő oligopeptidek, melyek a különböző metanotróf baktériumok életképességének megőrzéséhez szükségesek. Yousef és munkatársai módosított amb (analóg metanobaktin) peptidek Zn(II)-, Ni(II)- és Cu(II)-kötő képességét vizsgálták ionmobilitás-tömegspektrometria (IM-MS) segítségével. Az alapvegyületben a N- és C-terminális aminosavakat HisCys motívumokkal módosították (Ac-His-Cys-Gly-Pro-Tyr-His-Cys-OH), mely a cink-ujj fehérjék elsődleges fémkötő helyei (2His-2Cys). Ezen heptapeptid C-terminális végén lévő hisztidin és cisztein cseréjével vizsgálták hatásukat a komplexképződésre. A Zn(II)- és Ni(II)-ionok hasonló preferenciákat mutatnak az Ac-His-Cys-Gly-Pro-Tyr-X₆-Cys szekvenciák iránt, ahol az X₆ hisztidin vagy glicin. A Cu(II)-ion azonban az Ac-His-Cys-Gly-Pro-Tyr-His-X₇ (X₇ = cisztein vagy glicin) peptidekkel képez stabilabb komplexet a másik két fémionhoz képest. Különösen a C-terminális ciszteint tartalmazó modell Cu(II)-komplexe kiugróan nagy stabilitású széles pH-tartományban. A ligandum több fémion koordinálására is képes, amik intermolekuláris diszulfid híd kialakulásával dimerizálódnak.^{145, 146}

Sénéque és munkatársa a CP1 peptid (amely a klasszikus ββα cink-ujj fehérjék modellje) mutánsainak Zn(II)- és Co(II)-komplexeit vizsgálták. A 20-26 aminosavból felépülő oligopeptidek CXXC szekvenciát tartalmaznak az N-terminális közelében, illetve a C-terminális közelében lévő

két hisztidin ciszteinnel való cseréjével kaptak két további ligandumot. Ezen peptidek Zn(II)-komplexeiben a ZnL részecske dominál fiziológias pH-n, ahol a deprotonált tiolát-csoportok és az imidazol nitrogének koordinálják a fémiont (változó arányban a szekvenciában szereplő hisztidinek számának függvényében). A Co(II)-komplexek stabilitása mindhárom peptid esetén kisebb volt, mint a megfelelő Zn(II)-komplexek stabilitása. Vizsgálták a Zn(II)-komplexek fémcsere sebességét EDTA-oldattal és megállapították, hogy azon ligandumok esetén, ahol a hidrofób oldalláncú hisztidineket ciszteinnel helyettesítették gyorsabban alakultak ki a Zn(II)-EDTA komplexek. A két hisztidin és két cisztein tartalmú peptid Zn(II)-komplexének stabilitási állandója négy nagyságrenddel nagyobbak adódott, mint a csak tiolát-koordinációjú komplexre meghatározott érték.¹⁴⁷

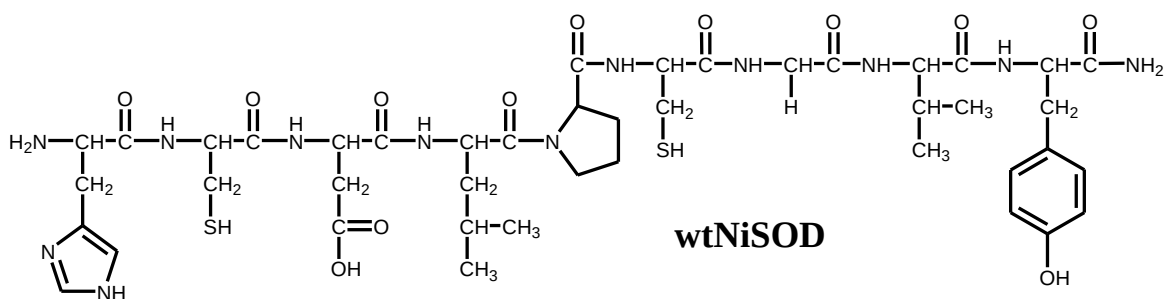
3. Kísérleti körülmények

3.1. Felhasznált vegyszerek

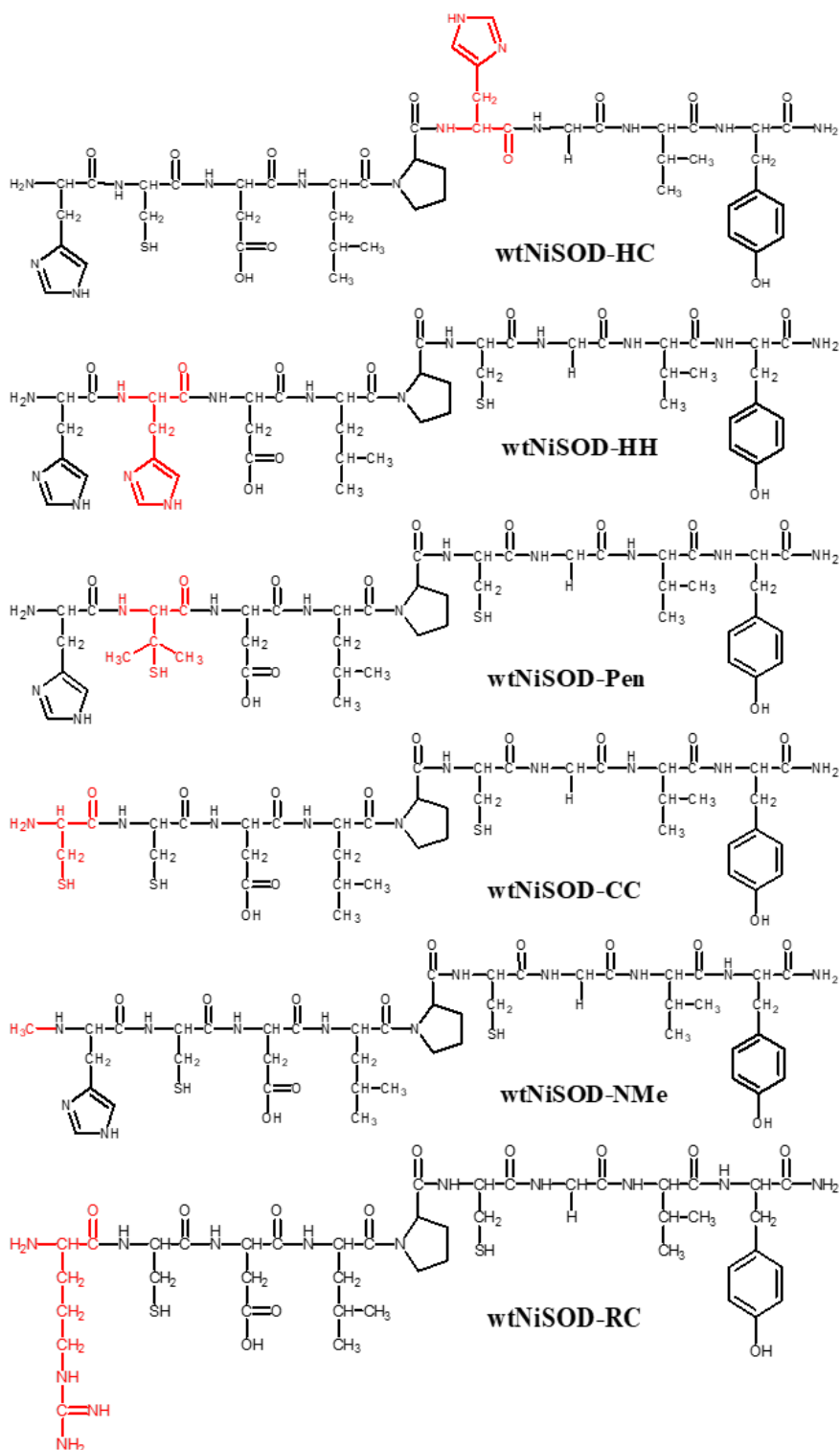
Az általunk használt vegyszerek és oldószerek kereskedelmi forgalomban megtalálhatóak, közvetlenül, tisztítás nélkül kerültek felhasználásra. Az oldategyensúlyi vizsgálatok során használt NiCl_2 -törzsoldat a VWR International által gyártott $\geq 99.95\%$ tisztaságú $\text{NiCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ -ból készült háromszorosan ioncserélt vízben való oldással. A fémtörzsoldat koncentrációját komplexometriás titrálással EDTA-mérőoldat segítségével határoztuk meg.

Az általunk vizsgált peptideket a Synpeptide Co. (Shanghai, Kína) cég szintetizálta, melyeket további tisztítás nélkül használtunk fel, a peptid törzsoldatok koncentrációját pH-potenciometriás titrálással határoztuk meg. A NiSOD enzim N-terminális végének első kilenc aminosavából álló peptid szerkezete a 4. ábrán látható, míg a dolgozatban vizsgált peptidek szerkezete az 5. és 6. ábrán szerepel.

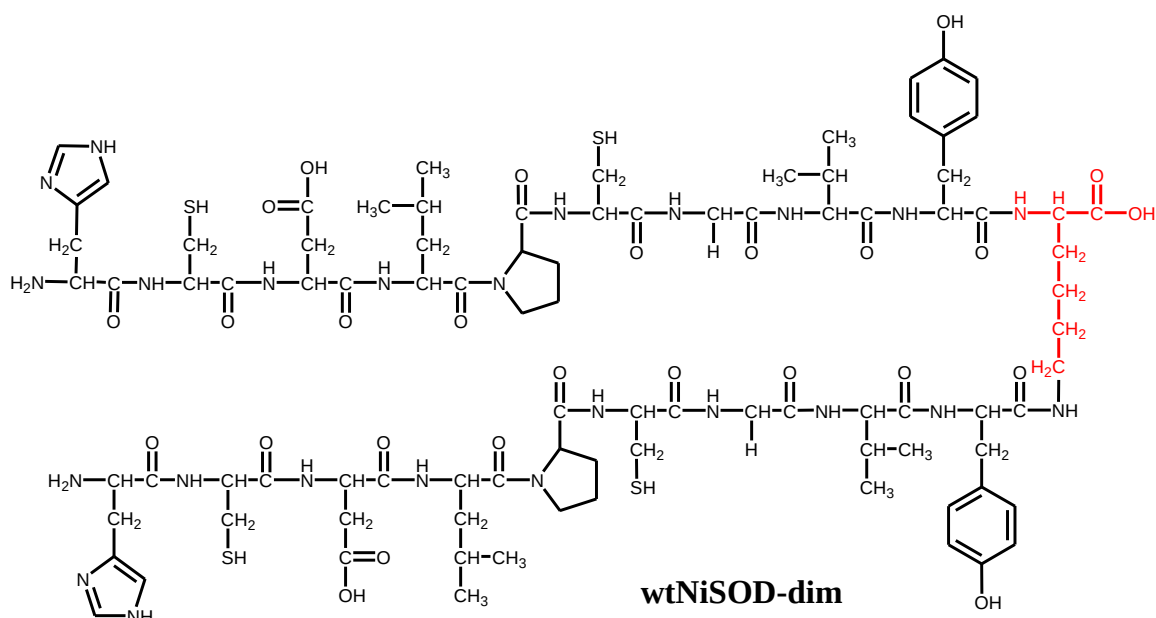
A SOD-aktivitás vizsgálatok során használt xantin és xantin-oxidáz vegyszerek a Sigma-Aldrich Co., míg a nitrokék-tetrazónium-klorid (NBT) a Merck Kft. terméke. A gyorskinetikai vizsgálatok során a Sigma-Aldrich Co. által forgalmazott kálium-szuperoxidot (KO_2) és 18-koronaétert, valamint a Molar Chemicals Kft. dimetil-szulfoxid (DMSO) oldószerét használtuk. A fiziológias pH-tartomány biztosítására 4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-etánszulfonsav (HEPES) puffert alkalmaztunk, amely a VWR International terméke.



4. ábra: A NiSOD enzim N-terminális régiójának első kilenc aminosavából álló nikkel-kötő hurok szerkezete.



5. **ábra:** A dolgozatban vizsgált kilenc aminosavból álló peptidek szerkezete. A szerkezetekben piros szín jelöli a wtNiSOD alapvegyület szerkezetétől különböző funkciós csoportokat és aminosavakat.



6. ábra: A NiSOD enzim nikkel-kötő hurkának lizinnel kapcsolt dimerjének szerkezete.

3.2. pH-potenciometria

A peptidek protonálódási állandóinak, illetve a nikkel(II)ionnal képződő komplexek stabilitási állandóinak meghatározására a pH-potenciometria jól alkalmazható módszer. A (3.2.1) folyamatra felírható protonálódási állandókat a (3.2.2) egyenlet alapján definiálhatjuk:

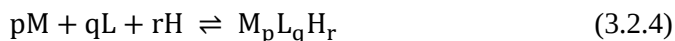
$$H_{i-1}L + H^+ \rightleftharpoons H_iL \quad (3.2.1)$$

$$K_i^H = \frac{[H_iL]}{[H_{i-1}L][H^+]} \quad (3.2.2)$$

A stabilitási állandók pH-potenciometriás meghatározásának feltétele, hogy a ligandum protonálódási folyamatai a fémion jelenlétében eltolódjanak, így a komplexképződés hatására megváltozik az oldat pH-ja. A fémion (M^{m+}) és hidrogénion (H^+) között kompetíciós reakció alakul ki, mely a (3.2.3) egyenlettel adható meg:

$$n HL + M^{m+} \rightleftharpoons ML_n^{(m-n)+} + n H^+ \quad (3.2.3)$$

A folyamatra felírható bruttó komplexképződést általánosan a (3.2.4) egyenlet írja le (a részecskék töltését az egyenlet nem tartalmazza):



ahol M: a fémion; L: a ligandum teljesen deprotonált formája; H: a hidrogénion; p, q és r: sztöchiometriai együtthatók.

A pH-potenciometria segítségével a képződő komplexek sztöchiometriája és stabilitási állandói is meghatározhatók, amit a (3.2.5) egyenlet definiál:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_p L_q H_r]}{[M]^p [L]^q [H]^r} \quad (3.2.5)$$

A kísérleti adatok ismeretében a ligandum protonálódási állandóit, valamint a képződő komplexek stabilitási állandóit a SUPERQUAD¹⁴⁸ és a *Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén* fejlesztett PSEQUAD¹⁴⁹ számítógépes program segítségével határoztuk meg. A számolásokhoz az alábbi primer adatokra van szükség: a ligandum, a hidrogénion és a fémion analitikai koncentrációja; a vízionszorzat; a titrálóoldat pontos koncentrációja; az egyedi részecskék pontos vagy közelítő stabilitási állandói; illetve a térfogat – pH adatpárok. A program a stabilitási állandókat mindaddig közelíti, amíg a $\Sigma(V_{\text{mért}} - V_{\text{számított}})^2$ összefüggésre minimumot talál. Ehhez a program a bemenő adatok ismeretében Newton-Raphson iterációt végez.

A kiindulási paraméterekre felírható mérlegegyenletek (3.2.6-3.2.8) alapján megkaphatjuk a stabilitási állandók értékeit:

$$c_M = [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \quad (3.2.6)$$

$$c_L = [L] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \quad (3.2.7)$$

$$c_H = [H] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \quad (3.2.8)$$

A közelítés pontosságát az illesztési paraméterrel ($|V_{\text{mért}} - V_{\text{számított}}|$ átlagértéke) jellemezhetjük. A számolás végén a program megadja a stabilitási állandók értékeit és azok hibáit, illetve az illesztési paraméterek átlagát és az egyes pontok eltérését a mért és számított titrálási pontok között.

A stabilitási állandók ismeretében MEDUSA¹⁵⁰ program segítségével szerkesztettük meg az egyes rendszerekben képződő komplexek koncentrációjának az eloszlását a pH függvényében.

A pH-potenciometriás titrálásokat vizes oldatokban, 25°C-on végeztük, az állandó hőmérsékletet ultratermosztáttal biztosítottuk. A pontosan ismert koncentrációjú KOH-mérőoldatot (~ 0,2 mol/dm³) Hamilton-fecskendővel felszerelt Mol-AcS mikrobüretta adagolta. A pH mérése

Metrohm 6.0234.110 kombinált üvegelektóddal történt, amely MOLSPIN pH-mérőhöz csatlakozott. Az elektród egy pontos kalibrálása $0,05 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldattal történt 25°C -on, melynek pH-ja ilyen körülmények között 4,005. A titrálás során a kevertetést mágneses keverővel biztosítottuk, az inert gáztér eléréséhez a mintaoldat fölött argont áramoltattunk át.

A titrált mintákban állandó $0,2 \text{ mol/dm}^3$ KCl ionerősséget alkalmaztunk. A minták kiindulási ligandum koncentrációja $1,2 \times 10^{-3} - 2,1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ volt, bennük a fémion : ligandum koncentráció arány 1:2 és 2:1 között változott. Az elektrolit koncentrációja megegyezik a mérőoldat koncentrációjával, így az oldat ionerőssége állandó volt a titrálás során. A titrált minták kiindulási térfogata 4 ml volt, a lúgoldat adagolását olyan módon választottuk ki, hogy az egy ekvivalens lúgfogyasztó folyamatra átlagosan 10-12 pont jusson a titrálási görbék megbízható kiértékelése érdekében. A mért pH diffúziós potenciállal történő korrekciójára az Irving és munkatársai által javasolt módszert alkalmaztuk.¹⁵¹

A vizsgált peptidek tisztaságát szintén pH-potenciometriás titrálások segítségével határoztuk meg, melyek alapján a peptid törzsoldatok koncentrációjából meghatároztuk a látszólagos moláris tömegeket. Ezek alapján a peptidek 75 - 65 %-os tisztaságúak és trifluoracetát szennyezőt tartalmaznak. A szilárd fázisú peptidszintézis során a gyantához kötött peptidet, valamint az egyes aminosavak oldalláncainak védőcsoportját trifluorecetsav segítségével távolították el. Ennek eredményeképp a könnyen ionizálható funkciós csoportok (terminális aminocsoport, hisztidin imidazol nitrogén) protonálódnak. Ezt a pozitív töltést a trifluoracetát anion semlegesíti, emiatt szennyezőként jelenik meg a szilárd peptidekben. Fontos megjegyezni, hogy a trifluoracetát jelenléte a nikkell(II)ionokkal történő komplexképződési folyamatokat nem befolyásolja.

3.3. UV-látható spektroszkópia

A nikkell(II)komplexekben a fémion két leggyakoribb koordinációs száma a 4-es és 6-os. A nikkell(II)ion 6-os koordinációs számú komplexeket alakít ki gyengeterű ligandumokkal, melyek oktaéderes geometriájúak és nagy spinszámúak. Ebben az esetben három, viszonylag kis intenzitású ($\epsilon_{\text{max}} < 30 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) d-d átmenet valósulhat meg, melyek – a rájuk jellemző hullámhossz tartománnyal együtt feltüntetve – növekvő energia szerint a következők:

- ${}^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{2g}(F)$: 770 – 1430 nm
- ${}^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{1g}(F)$: 500 – 910 nm
- ${}^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{1g}(P)$: 370 – 520 nm

Ezekén kívül még egy negyedik átmenet is megjelenhet egy váll formájában a $^3A_{2g}(F) \rightarrow ^3T_{1g}(F)$ átmenetre jellemző abszorpciós sávon, amely egy kis intenzitású spintiltott átmenet következménye.

A 4-es koordinációs számú nikkel(II)komplexek esetében két különböző geometria is kialakulhat. Erős terű és kellően kis szimmetriájú donatoratomokkal (pl.: peptidek amidnitrogénje) rendelkező ligandumok esetében síknégyzetes, kis spinszámú komplexek képződnek, melyeknél a maximális elnyelési hullámhossz 400-550 nm között, nagy intenzitással ($\epsilon_{\max} \sim 50-500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) jelenik meg. A tetraéderes nikkel(II)-komplexek spektrumában még nagyobb intenzitású sávok jelennek meg ($\epsilon_{\max} \sim 10^2 - 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 500-900 nm hullámhossz tartományban.¹⁵²

Az UV-látható spektrumokat a peptidek és a nikkel(II)komplexeik esetében Agilent Technologies Cary 8454 UV-VIS diódasoros spektrofotométer segítségével rögzítettük 250-800 nm hullámhossz tartományban. A mintákban a ligandum koncentrációja megegyezett az oldategyensúlyi vizsgálatok során alkalmazottakkal ($\sim 2 \text{ mM}$), a fémion : ligandum koncentráció arányát 1:2 és 2:1 között változtattuk. A spektrumok felvétele különböző pH értékek mellett történt, ehhez a pH-t 1,000 cm úthosszúságú kvarcküvetében állítottuk. Az adatok feldolgozása a műszert gyártó cég által biztosított szoftver és MS Excel táblázatkezelő program segítségével történt.

3.4. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus során a síkban polarizált fény kölcsönhatásba lép az optikailag aktív anyaggal. A síkban polarizált fény felbontható egy jobbra és egy balra cirkulárisan polarizált fénysugárra, melyek azonos fázisúak és amplitúdójúak. Az optikailag aktív anyagok eltérő kölcsönhatásba lépnek a síkban polarizált fény két összetevőjével, ezáltal a kilépő fénysugár elliptikusan polarizálttá válik, azaz a mintán való áthaladás után a komponensek abszorpciója és intenzitása eltérő lesz. Ezt a különbséget nevezik Cotton-effektusnak, amely a (3.4.1) egyenlettel írható le:

$$\Delta A = A_{\text{bal}} + A_{\text{jobb}} = \log(I_0/I_{\text{bal}}) - \log(I_0/I_{\text{jobb}}) = \Delta \epsilon * c * l \quad (3.4.1)$$

ahol A az abszorbancia, I_0 a belépő fény intenzitása, I_{bal} és I_{jobb} az egyes komponensek kilépő intenzitása, $\Delta \epsilon$ a moláris abszorpciós koefficiensek különbsége, c a koncentráció, l a kuvetta úthossza. A hullámhossz függvényében ábrázolva a kétféle fénysugár moláris abszorpciójának különbségét ($\Delta \epsilon = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$) kapjuk a cikruláris dikroizmus (CD) spektrumot. A CD spektrumok általában több információt tartalmaznak, mint az UV-látható spektrumok, mert az

elektronátmenetek viszonylag keskeny sávokkal jelentkeznek és ritkán fednek át egymással, valamint az átmenet előjele is szerkezeti információkat hordoz.

A fémkomplexek optikai aktivitását az okozhatja, ha maga a ligandum is rendelkezik aszimmetria centrummal, vagy ha ez az aszimmetria centrum a fémion koordinációjának hatására alakul ki. A néhány aminosavból álló peptidek fémionokkal (pl.: nikkel(II)ion) alkotott komplexeinek CD spektroszkópiás vizsgálatával a múltban számos kutatócsoport foglalkozott, így fontos általános következtetések találhatók a szakirodalomban.^{153, 154} A különböző di- és tripeptidek tanulmányozása során megállapították, hogy a komplex CD spektrumában a nem koordinálódó oldalláncok hatása összeadódik. A Cotton-effektus egy X-Y-Z peptid fémkomplexének esetében, adott hullámhosszon a (3.4.2) egyenlet alapján számítható:

$$\Delta\epsilon_{\lambda}^{XYZ} = \Delta\epsilon_{\lambda}^{XGG} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{GYG} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{GGZ} \quad (3.4.2)$$

A három alaninból álló tripeptid estében kialakuló komplex CD intenzitása egy adott hullámhosszon megegyezik azon három komplex intenzitásának összegével, ahol egy alaninból és két glicinből épülnek fel a peptidek. A glicin (G) aminosav optikailag inaktív, így a Cotton-effektus kialakulásához nem járul hozzá. Ezen eredmények összehasonlításakor megállapították, hogy az optikailag aktív alanin a peptidváz különböző pozícióiban eltérő mértékben járul hozzá a Cotton-effektushoz az $\Delta\epsilon_{\lambda}^{GXG} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{GGX} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{XGG}$ sorrendben. Ez azzal magyarázható, hogy a központi fémionhoz kapcsolódó donorcsoportok különböző mértékben továbbítják a királis információt (kísérleti tapasztalatok alapján a hatás az $\text{NH}_2 < \text{COO}^- < \text{N}^-$ sorrendben nő).¹⁵⁵

A CD spektroszkópiás vizsgálatokat a *Debreceni Egyetem Szerves Kémia Tanszékén* található JASCO-810 típusú készüléken végeztük. A minták koncentrációja, valamint a fémion : ligandum koncentráció aránya a pH-potenciometriás mérésekkel megegyező volt (~ 2 mM). A pH-függő CD spektrumokat szobahőmérsékleten, 0,100 és 1,000 cm úthosszúságú követtámban vettük fel 200-800 nm hullámhossztartományban. Az adatok kiértékelését a gyártó által mellékelt szoftverrel, valamint MS Excel táblázatkezelő program segítségével végeztük el.

3.5. ESR spektroszkópia

Az elektronspin rezonancia (ESR) spektroszkópia széles körben elterjedt szerkezetvizsgálati módszer a paramágneses fémionok, illetve a párosítatlan elektronokat tartalmazó molekulák esetében. A mintát erős mágneses tér jelenlétében vizsgáljuk, mely során az anyag-fény kölcsönhatásból eredő abszorpció az elektronspinek következménye. Az ESR spektrumokon

megjelenhet hiperfinom szerkezet, melyet az okoz, hogy a magok mágneses momentumából származó mágneses tér hatással van a párosítatlan elektronok mágneses momentumára.

A spektrumokból nyerhető elsődleges információ a g értéke, valamint a hiperfinomcsatolási-állandó (A), melyek a (3.5.1-3.5.2) egyenletek alapján adható meg:

$$g_{\parallel} = g_0^{\parallel} * \frac{H_0}{H_{\parallel}} \quad (3.5.1)$$

$$A_{\parallel} [cm^{-1}] = \frac{g_{\parallel} * \mu_B * a_{\parallel}}{h * c} \quad (3.5.2)$$

ahol: g_0 a külső standard értéke, H_0 és $H_{\parallel}$ a standardban és a mintában mért mágneses térerő értéke [Gauss], $a_{\parallel}$ a csatolási állandó [Gauss], c a fénysebesség, h a Planck-állandó.

Ha ezen paramétereket összehasonlítjuk ismert rendszerek megfelelő ESR paramétereivel információkat nyerhetünk a koordinálódó donoratomok számáról és minőségéről. Abban az esetben, ha a párosítatlan elektron nem nulla magspinű donoratommal (pl.: nitrogén) lép kölcsönhatásba, a rezonanciajelekben további felhasadások jelenhetnek meg, amit szuperhiperfinom-kölcsönhatásnak nevezünk. Ez a kölcsönhatás lehetőséget ad a különböző pozíciókban koordinálódó donoratomok megkülönböztetésére.

Az általunk vizsgált nikkel(II)komplexeket ESR spektroszkópia segítségével nem lehet vizsgálni, mivel a síknégyzetes geometriájú nikkel(II)komplexe nem paramágnesesek. A komplexek SOD-aktivitásának feltétele azonban, hogy a fémion egyelektronos oxidációja/redukciója végbemenjen, mely esetünkben a nikkel(II)-nikkel(III) átmenetet jelenti a dizmutálási reakcióban. Ezért igazolnunk kell a paramágneses nikkel(III)ion megjelenését. Ehhez a minták az alábbiak szerint készültek: 0,2 ml, 0,001 mol/dm³ koncentrációjú komplex oldathoz 0,05 ml dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldott kálium-szuperoxidot (KO₂) adtunk. Az ESR spektrumokat a *HUN-REN TTK Szerkezetkutató Központ*ban Dr. May Nóra Veronika segítségével rögzítettük. A mérések során egy BRUKER EleXsys E500 spektrométert használtunk, a spektrumokat 77 K hőmérsékleten rögzítettük.

3.6. NMR spektroszkópia

A mag mágneses rezonancia spektroszkópia széles körben használt szerkezetvizsgáló módszer szerves ligandumok és diamágneses fémionokkal képzett komplexeik esetében. Az NMR spektrumokból kinyerhető elsődleges információk a kémiai eltolódás, illetve a jelek intenzitása és

finomszerkezete. Ezeket befolyásolhatja az adott minta pH-ja és az egyes donorcsoportok fémionhoz való koordinálódása.

Az 1D ^1H NMR és 2D (^1H - ^{13}C HSQC) spektrumokat Bruker Advance 400 MHz készüléken rögzítettük, a kiértékelés során TopSpin 3.2 és MestreNova 8.1 szoftvereket használtunk. A wtNiSOD-Pen jelölésű peptid esetében a ligandum $0,005 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú oldatát vizsgáltuk, illetve a nikkel(II)ionnal képzett 1:1 koncentráció arányú komplexét 7.8 pH értéken tanulmányoztuk. A ligandumot deutérium-oxidban oldottuk és NaOD segítségével állítottuk be az oldat pH-ját a Ni(II)-iont tartalmazó oldat hozzáadása után.

3.7. ESI-TOF-MS tömegspektrometria

A pH-potenciometria segítségével meghatározható a képződő komplexek sztöchiometriája és stabilitási állandói, azonban a dimer és polimer szerkezetű komplexek jelenlétéről nem minden esetben kapunk egyértelmű bizonyítékot. Ezekben az esetekben jól alkalmazható módszer a tömegspektrometria, mellyel az adott komplex molekulatömege pontosan megadható a tömeg/töltés (m/z) értékek alapján. A peptideket tisztított formában kaptuk és használtuk fel, így csak a nikkel(II)ionnal képzett komplexeit vizsgáltuk tömegspektrometria segítségével. A vizes oldatokat elektronporlasztásos ionizációval alakították gáz halmazállapotúvá, majd a kismértékű fragmentáció érdekében a képződő részecskék lágy ionizáción mentek keresztül. A jelek hozzárendelése a kapott m/z értékek alapján történt, melynek során a számolt és mért izotópeloszlást vetettük össze.

Az ESI-TOF méréseket a *Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén* található Bruker maXis II MicroTOF-Q típusú Qq-TOF-MS készülékkel végezték a tanszék munkatársai. A spektrumokat a Bruker DataAnalysis 4.4 szoftverével értékeltük ki, az izotópeloszlást az IsotopePattern szoftverrel számítottuk ki, melyet szintén a Bruker cég forgalmaz. A komplexek tömegspektrumait negatív módban rögzítették.

3.8. Tömegspektrométerrel kapcsolt kapilláris elektroforézis (CE-MS)

A különböző fémion : ligandum koncentráció arányú rendszerekben a részecskék elválasztására alkalmas módszer lehet a kapilláris elektroforézis, majd a készülékhez csatolt tömegspektrométer lehetővé teszi az elektroferogramok egyes csúcsainak izotópeloszlásának meghatározását. Az elektroforetikus elválasztási módszerek azon alapulnak, hogy az oldott anyagok az elektromos

térben különböző sebességgel vándorolnak. Ezt a sebességet a részecskék töltése és sugara, valamint az alkalmazott hordozó oldat viszkozitása befolyásolja.¹⁵⁶

A CE-MS méréseket a *Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék* munkatársai végezték a wtNiSOD-dim ligandum és a nikkel(II)ion különböző arányú rendszereiben. A kapilláris elektroforézis 7100 Agilent készülékkel történt, mely diódasoros detektorral van felszerelve. A hozzá kapcsolt tömegspektrométer egy maXis II UHR ESI-QTOF MS készülék, melyet a Bruker forgalmaz. A mérőoldat 9-es pH-jú, 0,05 mol/dm³ koncentrációjú ammónium-acetát oldat volt, a minták 1 mg/ml koncentrációban tartalmazták a peptidet és 0,9:1, valamint 2:1 fémion : ligandum koncentráció arányban készültek. A tömegspektrumok kiértékelése a Bruker Compass DataAnalysis 4.4 szoftverével készült, az izotópeloszlást az IsotopePattern szoftverrel számítottuk ki.

3.9. A SOD aktivitás mérése

A szuperoxid dizmutáz (SOD) enzimek a szuperoxid gyökanion diszproporcióját katalizálják. Az enzimek működését utánozó fémkomplexek „hatékonyságát” a dizmutálási reakcióban a SOD aktivitásukkal lehet jellemezni és összehasonlítani. Ehhez vizsgálni kell a szuperoxid gyökanion ($O_2^{\cdot-}$) koncentrációjának változását az idő függvényében és meghatározni a katalízisre jellemző sebességi együtthatót. A $O_2^{\cdot-}$ koncentrációjának mérésére több módszer is ismert a szakirodalomban. Impulzus radiolízis segítségével közvetlen módon mérhető az ion mennyisége, azonban a technika korlátozott hozzáférhetősége és a vizsgálat során keletkező inhomogén reakcióter miatt ritkán használatos. A szélesebb körben elterjedt McCord-Fridovich módszer alkalmazása során *in situ* történik a gyökanion generálása, mely során a xantin a vízben oldott oxigénnel reagál és xantin-oxidáz katalizálja a folyamatot. A reakció során a $O_2^{\cdot-}$ folyamatosan termelődik és elreagál a nitrokék-tetrazónium-klorid (NBT) festékmolekulával, mely a folyamatban diformazánná alakul. Ez a változás 560 nm-en jól detektálható és a kapott kinetikai görbe egy egyenessel illeszthető. A mérés indítása után a 4. percben hozzáadjuk a mintához a vizsgálni kívánt komplexet, ekkor kompetíció alakul ki a gyökanion iránt, mivel az NBT és a komplex is reagál vele. A két reakció sebessége azonban eltérő és a módszer azt feltételezi, hogy a vizsgált komplex gyorsabban reagál a szuperoxid anionnal, mint a festékmolekula. Így az addig lineáris (nulladrendű) kinetikai görbén egy törés jelenik meg és a továbbiakban kisebb meredekségű egyenessel közelíthető a változás. A módszer során a mintákhoz mindig azonos térfogatban, de eltérő koncentrációban adjuk hozzá a komplexet tartalmazó oldatot. A két egyenes

meredekségéből adott komplex koncentráció mellett az inhibíció mértéke meghatározható. Ha ábrázoljuk az inhibíciót a komplex koncentrációjának függvényében egy telítési görbét kapunk, melynek illesztése után a görbe egyenlete alapján meghatároztuk az 50%-os inhibícióhoz tartozó komplex koncentrációkat. Ez az IC_{50} érték, mely segítségével a különböző fémkomplexek SOD aktivitása összehasonlítható: minél kisebb ez az érték, annál hatékonyabban bontja a komplex a $O_2^{\cdot-}$ -t. Az IC_{50} érték és az NBT koncentrációja alapján a katalízisre jellemző sebességi állandó is meghatározható, melynek értéke a festékmolekula koncentrációjától független, ezáltal a SOD enzimek aktivitásával is összevethetőek.¹⁵⁷

A SOD aktivitás vizsgálatokat Agilent Technologies Cary 8454 UV-VIS diódasoros spektrofotométer segítségével végeztük el 1,000 cm úthosszúságú kvarc küvettában. A mintákban az NBT koncentrációja $4,7 \times 10^{-5}$ mol/dm³, a xantiné 2×10^{-4} mol/dm³ volt, míg a komplex koncentrációja az aktivitásuk függvényében 5×10^{-7} mol/dm³ és 8×10^{-4} mol/dm³ között változott a küvettában. Az adatok feldolgozása a spektrofotométerhez biztosított szoftverrel, a kinetikai görbék illesztése MS Excel programmal, míg az inhibíciós görbék illesztése Origin programmal történt.

Az előbb ismertetett módszernek vannak hátrányai, ezért a SOD aktivitás mérésére kutatócsoportunk fejlesztett egy új módszert, melyben UV-detektorral felszerelt szekvenciális stopped-flow készülékkel történtek a vizsgálatok. Ebben az esetben dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldott kálium-szuperoxiddal (KO_2) állítottuk elő a szuperoxid gyökiont, melynek mennyiségét 260 nm-en közvetlenül mértük 2,000 mm úthosszúságú mérőcellában, 25 °C-on. A módszerfejlesztést részletesen a Kísérleti eredmények és értékelésük fejezetben (4.3.2. alfejezet) ismertetem. A *stopped-flow* mérések Applied Photophysics SX-20 készülékkel, az adatok feldolgozása a cég által biztosított szoftverrel történtek. A kinetikai görbék illesztése Scientist program segítségével valósult meg.¹⁵⁸

4. Kísérleti eredmények és értékelésük

A NiSOD enzim N-terminális végének első kilenc aminosava alkotja az úgynevezett nikkelkötő hurkot, amelyben minden olyan donorcsoport megtalálható, amely a fémion koordinálásáért és a SOD aktivitásért felelős. Ezért munkánk során ezen szekvencia számos mutánsát vizsgáltuk annak érdekében, hogy felderítsük az egyes aminosavak szerepét a fémion megkötésében és a dizmutálási reakcióban, illetve, hogy az egyes módosításokkal előnyösebb tulajdonságokkal rendelkező komplexeket állítsunk elő. A kísérleti eredményeinket és értékelésüket három szakaszban tárgyalom. Az első szakaszban a vizsgált peptidek és nikkel(II)ionnal képződő komplexeinek termodinamikai és szerkezetvizsgálati módszerekkel kapott eredményeit mutatom be. A következő részben a dizmutálási reakcióban képződő nikkel(III)komplexek szerkezetére vonatkozó eredmények és azok értékelése szerepel. Az utolsó alfejezet pedig a nikkel(II)komplexek SOD-aktivitás vizsgálatát mutatja be a szakirodalomban széles körben elterjedt McCord-Fridovich módszer alkalmazásával, illetve az általunk fejlesztett szekvenciális *stopped-flow* technikán alapuló SOD-aktivitás mérési módszerrel. A natív enzimfragmens (HCDLPCGVY) Ni(II)- és Ni(III)-komplexeinek termodinamikai és szerkezeti vizsgálata nem képezi a dolgozat tárgyát, azonban a SOD aktivitás vizsgálatokat már mi végeztük el. Ugyanakkor az egyes szerkezeti módosítások értékelése szempontjából fontos összehasonlítási alapot ad ez a ligandum, így ezen peptid és komplexeinek paraméterei az adott táblázatokban és ábrákon megjelenítésre kerülnek.

4.1. A vizsgált peptidek és Ni(II)-komplexeik termodinamikai és szerkezeti vizsgálata

A vizsgált peptidek két nagy csoportra oszthatók a szekvenciában szereplő aminosavak számának függvényében. A legtöbb, általunk vizsgált peptid kilenc aminosavból áll, azonban jellemeztünk egy 19 aminosavból álló modellt is (wtNiSOD-dim), amelyet két wtNiSOD szekvencia C-terminális végének lizin aminosavval történő összekapcsolásával kaptunk (6. ábra). A dimer peptid tulajdonságai lényegesen eltérnek a kisebb tagszámú mutánsokhoz képest, így ezen ligandum és Ni(II)-komplexének sajátságait külön tárgyalom.

4.1.1. A kilenc aminosavból felépülő peptidek és Ni(II)-komplexeik

A peptidek komplexképző sajátságainak felderítése előtt meghatároztuk a ligandumok protonálódási állandóit pH-potenciometriával, melyek az 1. táblázatban találhatók. A peptidek szerkezetéből adódóan a sav-bázis folyamatokban a terminális aminocsoport, a hisztidin imidazol

nitrogénje, az aszparaginsav karboxil oldallánca, a tirozin hidroxilcsoportja, valamint a ciszteinek és a penicillamin tiolcsoportjai vesznek részt. Néhány sav-bázis folyamat jelentős átfedésben van egymással, de a legtöbb titrálási görbe hat savi disszociációs állandó figyelembevételével volt illeszthető. Az aminosav oldallancok karakterét figyelembe véve a legtöbb esetben az első deprotonálódási lépés az aszparaginsav, míg a legnagyobb $\log K_i$ érték a tirozin oldallancához köthető.

1. táblázat: A vizsgált kilenc aminosavból álló peptidek és a natív enzimfragmens lépcsőzetes protonálódási állandói ($\log K_i$), zárójelben a 3σ standard deviáció értékei szerepelnek. Az egyes részecskék töltését elhagytuk a jelöléseknél. ($T = 25\text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,2\text{ M KCl}$)

	wtNiSOD ^a	wtNiSOD -HC	wtNiSOD -HH	wtNiSOD -CC	wtNiSOD -Pen	wtNiSOD -NMe	wtNiSOD -RC
[H ₆ L]	3,58	3,41(6)	3,37(6)	3,49(9)	3,78(5)	3,56(4)	-
[H ₅ L]	5,48	5,44(5)	5,35(5)	6,10(9)	5,42(7)	5,50(3)	3,73(5)
[H ₄ L]	7,20	6,51(4)	6,44(4)	7,86(6)	7,09(6)	7,36(2)	7,10(5)
[H ₃ L]	8,25	7,33(4)	7,33(3)	8,98(5)	8,26(6)	8,30(1)	8,02(5)
[H ₂ L]	8,92	8,66(3)	8,57(2)	9,36(4)	9,15(6)	9,19(1)	8,90(4)
[HL]	9,88	9,89(2)	9,58(2)	10,25(4)	10,07(5)	10,16(1)	9,85(3)
$\Sigma \log K_i$	43,31	41,24	40,91	46,04	43,77	44,07	37,60

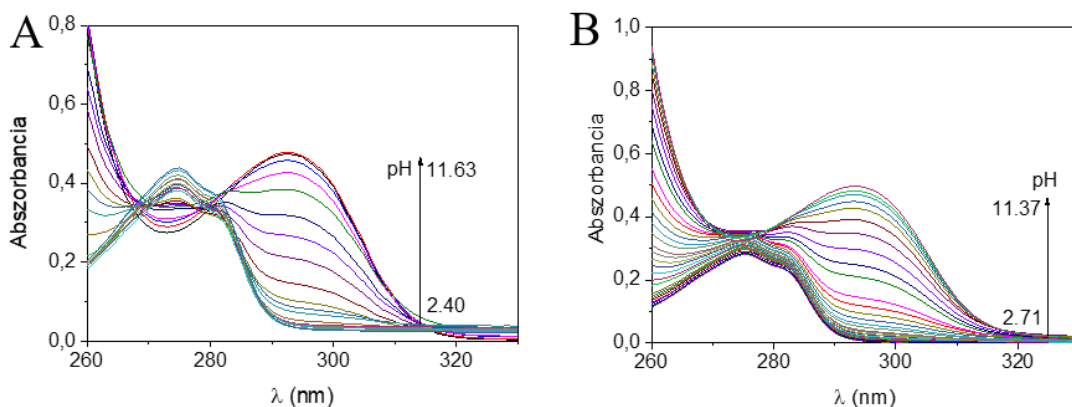
^a Az adatok a ⁹² hivatkozásban találhatóak.

Az adatok alapján látható, hogy az összbázicitás legnagyobb mértékű csökkenése a wtNiSOD-RC modell esetében tapasztalható a wtNiSOD ligandumhoz képest, ahol az első helyen lévő hisztidint egy arginin helyettesíti. Ezzel a cserével egy pozitív töltésű oldallánc jelenik meg a peptid N-terminális végén és a hisztidinhez rendelhető deprotonálódási lépés hiányával magyarázható a csökkent összbázicitás.

További két peptid esetén látható még csökkenés az összbázicitásban, a wtNiSOD-HC és wtNiSOD-HH ligandumkonál, ahol a hatodik és második helyen lévő ciszteineket egy-egy hisztidin aminosav helyettesíti. A legkisebb $\log K_i$ mindkét peptidnél az aszparaginsav karboxilát csoportjához köthető. A következő lúgfogyasztó folyamatban az első helyen lévő hisztidin imidazol nitrogénjének deprotonálódása történik, amely az imidazolhoz képest fokozott

savassággal rendelkezik. Ezt a jelenséget a szakirodalomban már többször leírták a szabad N-terminális aminosocsoporttal rendelkező, első helyen hisztidint tartalmazó peptidek esetén.¹²² Az aminosocsoport és az imidazol nitrogén között létrejött intramolekuláris hidrogénkötés miatt kisebb pH-n deprotonálódik a hisztidin imidazolil oldallánca. A következő deprotonálódási folyamatok jelentősen átfedik egymást, azonban az összbázicitás mindkét peptid esetén csökken a wtNiSOD-hoz képest, ami a cisztein hisztidinnel való helyettesítésének eredménye. Az adatok alapján a csökkenés mértéke nem tér el jelentősen, vagyis a hisztidin aminosav belső helyzetének változtatása nincs jelentős hatással a sav-bázis folyamatokra.

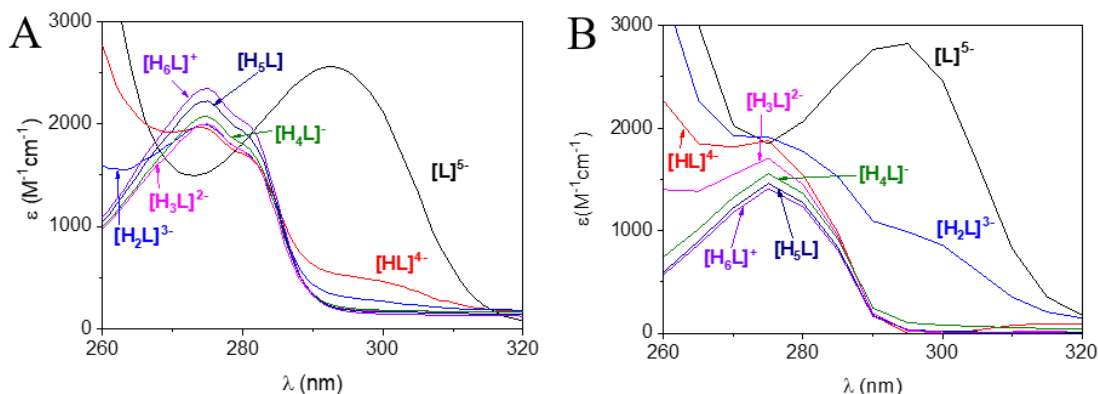
A wtNiSOD-Pen modell esetében a donorcsoportok deprotonálódási sorrendje nem tér el jelentősen a wtNiSOD alapvegyülettől: aszparaginsav karboxilátcsoport - imidazol nitrogén - aminosocsoport - tiolcsoportok - tirozin fenolos hidroxilcsoportja. Szakirodalmi adatok alapján azonban valószínűsíthető, hogy a penicillamin tiolcsoportja kisebb pH-n deprotonálódik a β -szénatomon található metilcsoportok elektronküldő sajátsága miatt, mint a hatodik helyen lévő cisztein tiolcsoportja.¹⁵⁹ Ez a különbség azonban nem jelentős, a lépcsőzetes protonálódási állandók és az összbázicitás sem tér el jelentősen a wtNiSOD ligandumtól. A wtNiSOD-Pen ligandum pH-függő UV-látható spektrumait is elemeztük (7. ábra/A) és meghatároztuk az egyes részecskék egyedi spektrumait (8. ábra/A). Az így kapott adatok jó egyezésben vannak a pH-potenciometriával meghatározott értékekkel és a donorcsoportok előzőleg felvázolt deprotonálódási sorrendjével.



7. ábra: A pH-függő UV-látható spektrumok az A: wtNiSOD-Pen és B: wtNiSOD-CC peptidek esetén. ($C_{\text{lig}} = 1 \text{ mM}$; $l = 2,00 \text{ mm}$; $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $I = 0,2 \text{ M KCl}$)

A wtNiSOD-NMe peptid szerkezete a wtNiSOD ligandumtól kis mértékben tér el, az N-terminális aminosocsoportjához egy metilszubsztituens kapcsolódik. Ez a szerkezeti módosítás az összbázicitás kis mértékű növekedését eredményezte. Ebből arra következtethetünk, hogy a csoportok

deprotonálódása alapvetően a wtNiSOD ligandumhoz hasonlóan játszódik le az alábbi sorrendben: aszparaginsav karboxilátcsoport - imidazol nitrogén - aminocsoport - tiolcsoportok - tirozin fenolos hidroxilcsoportja.



8. ábra: A különböző protonáltságú ligandumok egyedi UV-látható spektrumai az A: wtNiSOD-Pen és B: wtNiSOD-CC ligandumok esetén.

A wtNiSOD-CC peptid a szekvencia első helyén ciszteint tartalmaz hisztidin helyett. Ez a csere jelentősen befolyásolja a sav-bázis folyamatokat is. Az aszparaginsav karboxilát csoportjának deprotonálódását az egyik cisztein tiolcsoportjának deprotonálódása követi. Ez a szakirodalmi adatok alapján az első helyen lévő ciszteinhez rendelhető, ugyanis az N-terminálisan ciszteint tartalmazó peptidek esetében a tiolcsoport fokozott savasságáról számoltak be.¹⁶⁰ A további deprotonálódási folyamatok jelentősen átfednek egymással, így pH-függő UV-látható spektrumokat vettünk fel a ligandumról (7. ábra/B). A NiSOD enzimmel rokon metallopeptidek esetében jelentős abszorpciós maximum észlelhető 290 nm környékén, ami a tirozin fenolos hidroxilcsoportjának deprotonálódásához köthető. Meghatároztuk az egyes részecskék egyedi spektrumát (8. ábra/B) és megállapítottuk, hogy a tirozin fenolos hidroxilcsoportjának és az egyik cisztein tiolcsoportjának deprotonálódása átfedésben van. Az összbázicitás azonban jelentősen nőtt a wtNiSOD ligandumhoz képest, ami az N-terminális hisztidin ciszteinnel való helyettesítésének köszönhető.

A peptidek Ni(II)-ionnal képződő komplexeinek stabilitási állandóit pH-potenciometria segítségével határoztuk meg, az adatok a 2. táblázatban találhatók. A fémion koordinálásában az N-terminális aminocsoport, a hisztidin imidazol nitrogénje, a ciszteinek és a penicillamin tiolát-csoportjai, valamint deprotonált amid nitrogének vehetnek részt a szekvenciában található aminosavak függvényében. A 2. táblázat utolsó sorában szereplő pNi értékek a ligandumok Ni(II)-

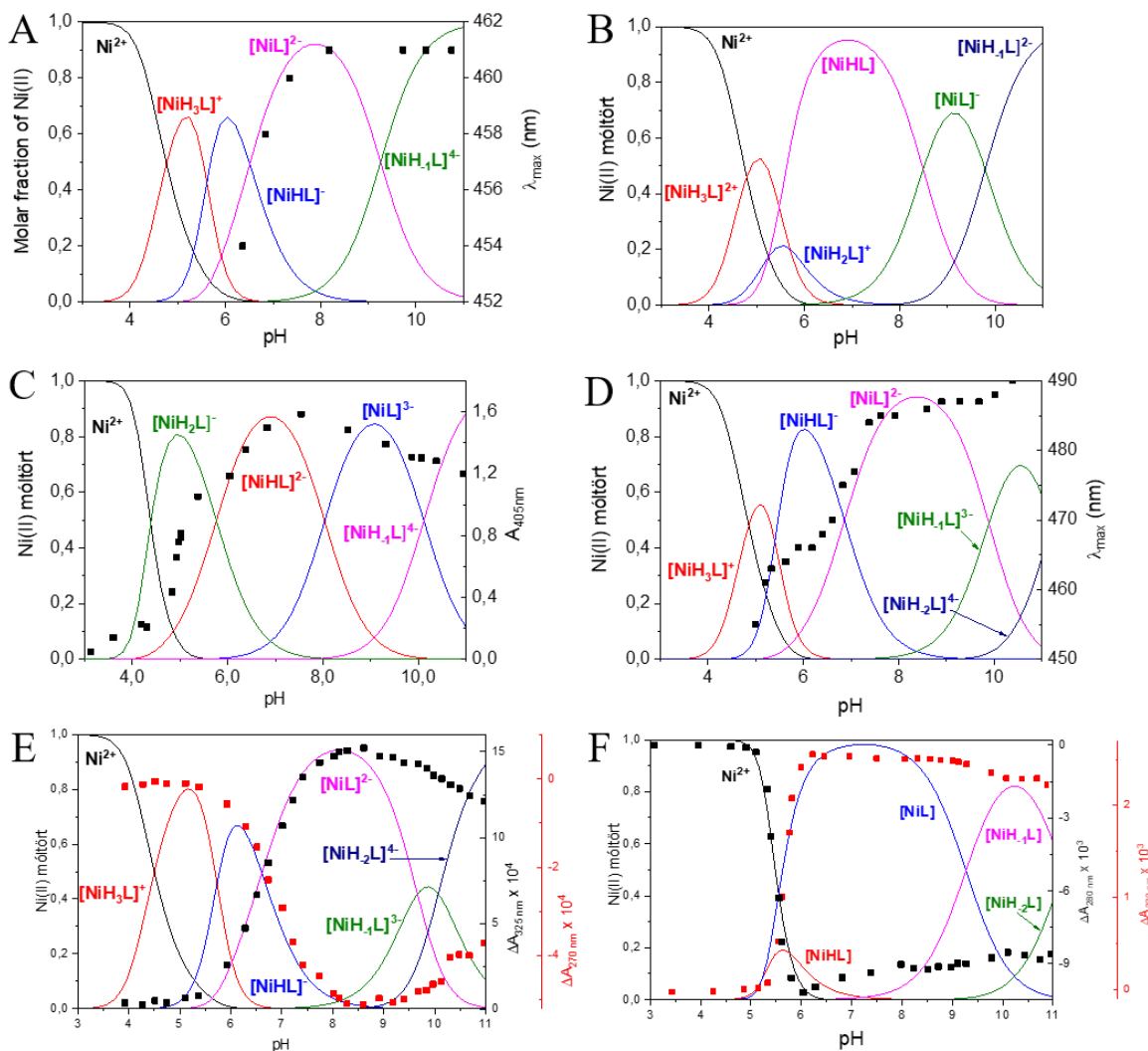
kötő képességének összehasonlítására szolgálnak, amelyek a Ni(II)-ion és ligandum 1:5 arányú rendszerében fiziológiás pH-n számított szabad Ni(II)-ion koncentrációjának negatív előjelű tízes alapú logaritmusát jelölik. Az általunk vizsgált rendszerek közel ekvimoláris mennyiségben tartalmazták a fémiont és a ligandumot. Azonban a legtöbb hasonló témában íródott publikáció $c_{\text{Ni(II)}} = 10 \mu\text{M}$ és $c_{\text{lig}} = 50 \mu\text{M}$ koncentrációviszonyok mellett közölte a $p\text{Ni}$ értéket, így az összehasonlíthatóság érdekében mi is ilyen körülmények között számoltuk. Ezen érték alapján egy peptid annál nagyobb stabilitású komplexet képez a Ni(II)-ionnal, minél nagyobb a $p\text{Ni}$ értéke.

2. táblázat: A kilenc aminosavból álló peptidek Ni(II)-ionnal képződő komplexeinek stabilitási állandói ($\log\beta_{\text{pqr}}$), zárójelben a 3σ standard deviáció értékei szerepelnek. Az egyes részecskék töltésének jelölésétől eltekintünk. ($T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,2 \text{ M KCl}$)

	wtNiSOD ^a	wtNiSOD -HC	wtNiSOD -HH	wtNiSOD -CC	wtNiSOD -Pen	wtNiSOD -NMe	wtNiSOD -RC
[NiH ₃ L]	33,44	31,60(2)	31,38(3)	-	33,41(2)	34,84(5)	-
[NiH ₂ L]	-	-	25,69(7)	32,39(1)	-	-	-
[NiHL]	22,22	20,57(2)	20,44(3)	26,63(3)	22,61(1)	23,39(6)	20,2(1)
[NiL]	15,71	14,23(3)	11,95(5)	18,60(5)	15,75(3)	16,78(8)	15,04(4)
[NiH ₁ L]	6,45	4,62(5)	2,16(5)	8,85(5)	5,86(4)	7,1(2)	5,8(1)
[NiH ₂ L]	-	-	-	-	-5,35(5)	-3,0(1)	-5,4(1)
$p\text{Ni}^b$	11,27	10,82	9,76	13,66	10,97	12,36	11,47

^a Az adatok a ⁹² hivatkozásban találhatóak. ^b $p\text{Ni} = -\lg[\text{Ni(II)}_{\text{szabad}}]$, ahol $c_{\text{Ni(II)}} = 10 \mu\text{M}$; $c_{\text{lig}} = 50 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 7,6$

A ligandumok protonálódási és a Ni(II)-komplexek stabilitási állandói alapján meghatároztuk a Ni(II)-komplexek pH-függő koncentráció eloszlási görbéit, amelyek a 9. ábrán összegezve találhatóak. A koncentráció eloszlási görbéken legtöbb esetben szerepelnek spektroszkópai adatok is, amelyek alátámasztják a pH-potenciometriás adatok kiértékeléséből nyert egyensúlyi modellt. Ezek közül a λ_{max} az UV-látható spektrumok lokális maximum értékeinek hullámhosszát, az $A_{\text{x nm}}$ az UV-látható spektrumok adott hullámhosszon vett abszorbanciáját, illetve a $\Delta A_{\text{x nm}}$ a CD spektrumok alapján az adott hullámhosszon vett abszorbanciakülönbséget jelölik.

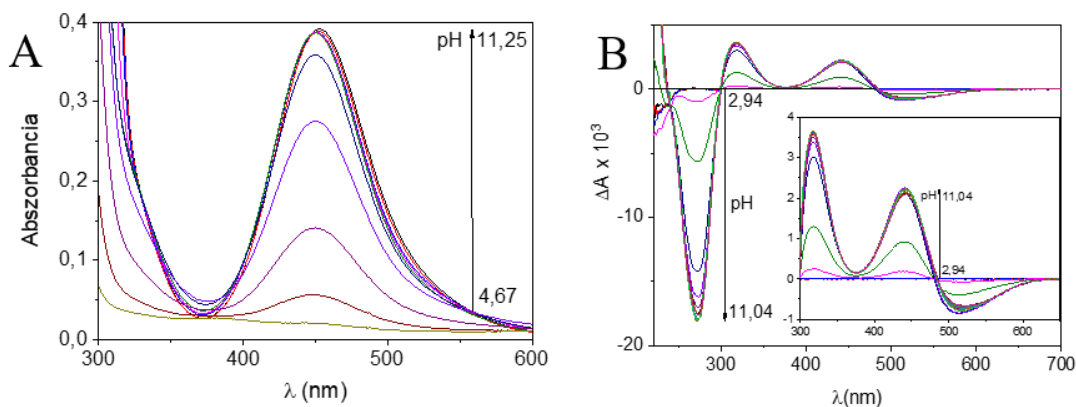


9. ábra: A Ni(II)/ligandum 1:1 koncentráció arányú rendszerek koncentráció eloszlási görbéi a pH függvényében, ahol az L az adott peptidet jelöli, melyek A: wtNiSOD, B: wtNiSOD-HH, C: wtNiSOD-CC, D: wtNiSOD-Pen, E: wtNiSOD-NMe, F: wtNiSOD-RC.

($C_{\text{Ni(II)}} = 1,90 \text{ mM}$; $C_L = 2,00 \text{ mM}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,2 \text{ M KCl}$) Az A ábra a ⁹² hivatkozásból származik.

Bár a wtNiSOD-HC és -HH összetételben azonosak, a szekvenciájuk eltérő és jelentősen különbözik a komplexképző sajátosságuk is. A wtNiSOD-HC esetén a komplexképződés hisztaminszerű (NH_2 , N_{Im}) kötésmóddal indul enyhén savas pH-n, a $[\text{NiH}_3\text{L}]^{2+}$ részecskét eredményezve, ahol az aszparaginsav karboxilátcsoportja már deprotonált formában van. A pH növelésével a cisztein amid nitrogénjének és tiolcsoportjának deprotonálódása és koordinációja kooperatív módon játszódik le. Az így kialakuló $[\text{NiHL}]$ komplexben a Ni(II)-ion síknégyzetes

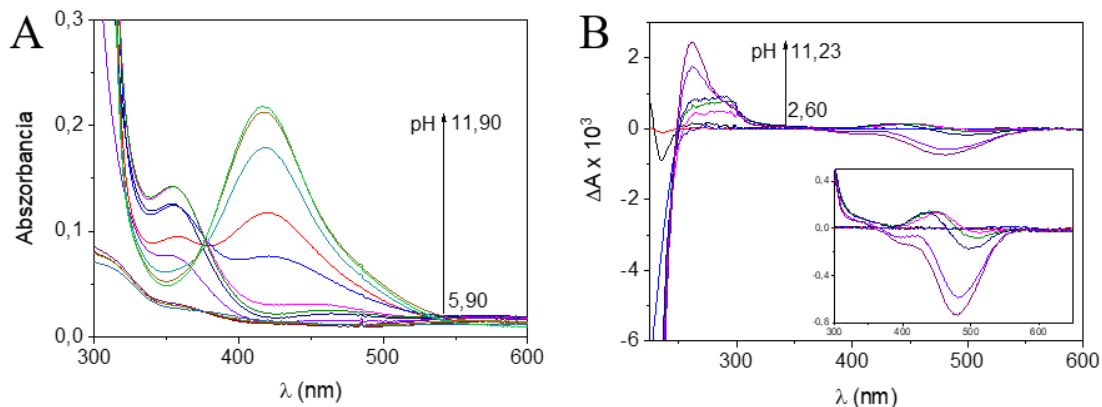
koordinációs módú, amelyben a (NH_2 , N^- , S^-) donortatomok találhatók meg. Ezzel egyidőben az UV-látható spektrumokban 450 nm-en egy, a síknégyzetes, diamágneses tulajdonságú nikkel(II)komplexekre jellemző abszorpciós átmenet alakul ki (10. ábra/A). A következő lúgfogyasztó folyamatban kialakuló $[\text{NiL}]^-$ komplexben az előzőleg leírt koordinációs módot a hatodik helyen lévő hisztidin imidazol nitrogénjének kötődése egészíti ki. Ezt a CD spektrumokon 270 nm-en mért intenzitás növekedés alátámasztja, amely a $\text{Ni(II)} \rightarrow \text{N}_{\text{Im}}$ és $\text{Ni(II)} \rightarrow \text{N}_{\text{amid}}$ töltésátviteli sávokra jellemző (10. ábra/B). Az ezen a hullámhosszon mért intenzitás növekedés a $[\text{NiL}]^-$ komplex képződésével párhuzamosan növekszik és 8-as pH-n éri el a maximumát. Az UV-látható és CD spektrumok alapján $[\text{NiH}_{1.1}\text{L}](\text{H})$ sztöchiometriájú $[\text{NiL}]^-$ komplex síknégyzetes geometriájú. Az utolsó sav-bázis folyamatban a tirozin fenolos hidroxilcsoportjának deprotonálódása játszódik le. A spektroszkópiai adatok alapján ez a folyamat nem érinti a fémion koordinációs szféráját, ami igazolja, hogy ez a csoport nem vesz részt a fémion megkötésében. Ennek a komplexnek a kizárólagos jelenlétét az ESI-TOF-MS spektrum is alátámasztják (12. ábra/A), amely 11,5-es pH-n került detektálásra.



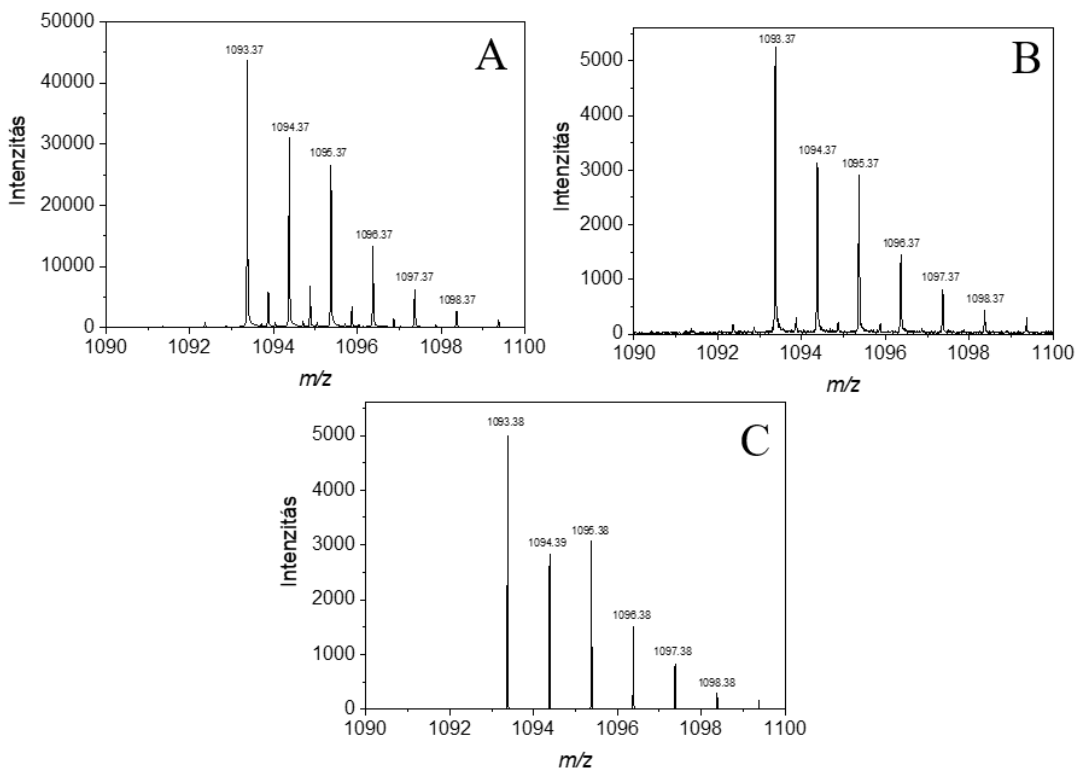
10. ábra: A Ni(II)/wtNiSOD-HC 1:1 arányú rendszerének pH-függő A: UV-látható és B: CD spektrumai. (UV-látható: $c_{\text{lig}} = 1,5 \text{ mM}$; CD: $c_{\text{lig}} = 0,9 \text{ mM}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,2 \text{ M KCl}$)

A wtNiSOD-HH peptid esetén (9. ábra/B) a komplexképződés a wtNiSOD-hoz hasonlóan az (NH_2 , N_{Im}) donoresoportokat érintő hisztamin-szerű koordinációval indul, a $[\text{NiH}_3\text{L}]^{2+}$ komplexet eredményezve. Fontos megjegyezni, hogy csak úgy mint a wtNiSOD-HC esetén az aszparaginsav oldallánca már deprotonált formában van jelen ebben a komplexben, azonban valószínűtlen, hogy részt vesz a fémion koordinálásában. A következő deprotonálódás a $[\text{NiH}_2\text{L}]^+$ részecskét eredményezi, amely csak kis mennyiségben van jelen és képződése szinte teljesen átfed a $[\text{NiHL}]$ komplex kialakulásával. Ebben a pH-tartományban sem az UV-látható, sem a CD spektrumok nem

mutatnak jellegzetes változásokat (11. ábra), így a [NiHL] várhatóan oktaéderes szerkezetű és paramágneses tulajdonságú. Az UV-látható spektrumok 6,5-es pH felett 320 nm-en jelentős intenzitás növekedést mutatnak, ami a $\text{Ni(II)} \rightarrow \text{S}^-$ töltésátviteli sávnak felel meg. Így a [NiHL] komplexben feltételezhetően az N-terminális aminocsoport, a cisztein tiolát-csoportja, valamint a két hisztidin imidazol nitrogénjei vesznek részt. Ennek megerősítésére NMR vizsgálatokat végeztünk 7,1-es pH-n 0,1 ekvivalens Ni(II)-ion jelenlétében és távollétében. A fémion hozzáadása után a paramágneses komplex képződését alátámasztja az ^1H NMR spektrumokon látható jelek jelentős vonalszélesedése. Ezen túlmenően a spektrum aromás régiója drasztikusan megváltozik: a hisztidin imidazol nitrogénjének koordinációja eltolja az imidazol aromás protonjaihoz rendelhető jeleket, míg a tirozin aromás protonjainak jelei nem változnak, alátámasztva azt, hogy a tirozin hidroxilcsoportja nem vesz részt a fémion megkötésében. Az ^1H NMR spektrumok alapján pH = 7,1-en szinte kizárólag a [NiHL] komplex van jelen az előzőleg ismertetett koordinációs móddal, illetve, hogy a komplex paramágneses és mint olyan, oktaéderes tulajdonságú. A további lúgfogyasztó folyamat a $[\text{NiL}]^-$ komplexet eredményezi, melynek megjelenése drasztikus változást idéz elő az UV-látható és CD spektrumokban. Az UV-látható spektrumokon 430 nm-en egy intenzív sáv figyelhető meg, amely a diamágneses, síknégyzetes Ni(II)-komplexek jellegzetes d-d sávja. A CD spektrumokon 450 nm-en látható pozitív Cotton-effektus arra utal, hogy az első deprotonált amid nitrogén részt vesz a fémion koordinálásában, míg az 500 nm körüli kis intenzitású CD jel a tiolát-csoport koordinációjára utal. Az adatok alapján a $[\text{NiL}]^-$ komplex a $(\text{NH}_2, \text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-)$ kelátrendszer tartalmazza, amelyet a távoli cisztein tiolát-csoportjának makrokelát kötődése egészít ki. Következésképpen az első hisztidin imidazol nitrogénjét kiszorítja a koordinációs szférából az első deprotonált amid nitrogén koordinációja. A pH további növelésével kialakuló $[\text{NiH}_{-1}\text{L}]^{2-}$ komplex esetében szintén a deprotonálódó, de nem koordinálódó tirozin fenolos hidroxilcsoportjához köthető folyamatról van szó. A komplex képződését az ESI-TOF-MS mérések is alátámasztják (12. ábra/B). A wtNiSOD-HC és -HH ligandumok, illetve a Ni(II)-ion jelenlétében kialakult $[\text{NiH}_{-1}\text{L}]^{2-}$ komplexek összetétele azonos, a komplex összegképletéhez rendelhető szimulált tömegspektrum a 12. ábra C részén látható.



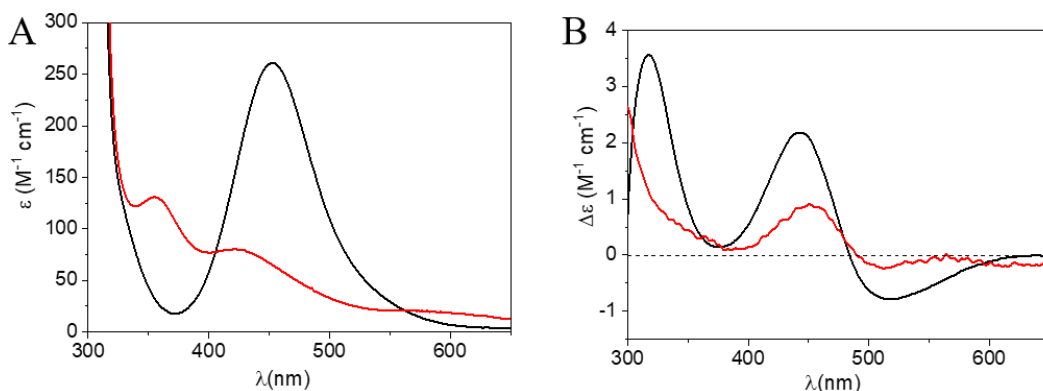
11. ábra: A Ni(II)/wtNiSOD-HH 1:1 koncentráció arányú rendszerének pH-függő A: UV-látható és B: CD spektrumai. ($c_{\text{lig}} = 0,9 \text{ mM}$; $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $I = 0,2 \text{ M KCl}$)



12. ábra: A $[\text{NiH}_2\text{L}]^{2-}$ komplexek tömegspektrumai az A: wtNiSOD-HC és B: wtNiSOD-HH peptidek Ni(II):ligandum 1:1 koncentráció arányú rendszerében. C: a $\text{H}[\text{C}_{46}\text{H}_{62}\text{N}_{14}\text{O}_{12}\text{SNi}]^{+}$ összetételű komplex számított izotópeloszlása. ($\text{pH} = 11,50$)

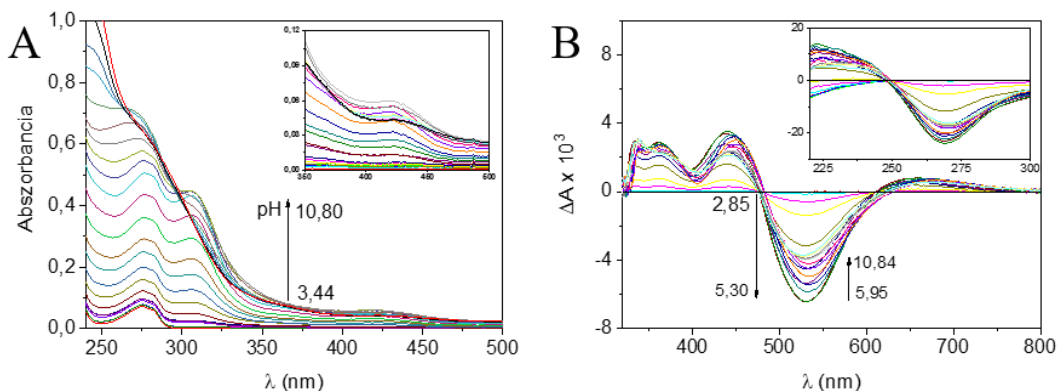
A wtNiSOD-HC és -HH peptidek Ni(II)-komplexeinek vizsgálatakor két fontos következtetést vontunk le: a hatodik helyen lévő cisztein befolyásolhatja a Ni(II)/Ni(III) pár redoxi tulajdonságait, míg a második helyen lévő cisztein a NiSOD enzim redukált formájára jellemző geometria

kialakításában kulcsfontosságú. Ezen kívül az 2. táblázatban látható, hogy mindkét peptid kisebb pK_a értékkel rendelkezik a wtNiSOD ligandumhoz képest, vagyis kisebb a Ni(II)-kötő affinitásuk, ami a cisztein - hisztidin pontmutáció eredménye. A wtNiSOD-HC és -HH peptidek Ni(II)-komplexeinek eltérő koordinációs módját a 13. ábra is jelzi, ahol a két modellvegyület $[NiL]^-$ komplexének UV-látható és CD spektroszkópiás moláris abszorbanciáit hasonlítjuk össze.



13. ábra: A Ni(II)/wtNiSOD-HC 1:1 (fekete) és a Ni(II)/wtNiSOD-HH 1:1 (piros) koncentráció arányú rendszerek esetében képződő $[NiL]^-$ komplex A: UV-látható és B: CD spektroszkópiás moláris abszorbanciáinak összehasonlítása.

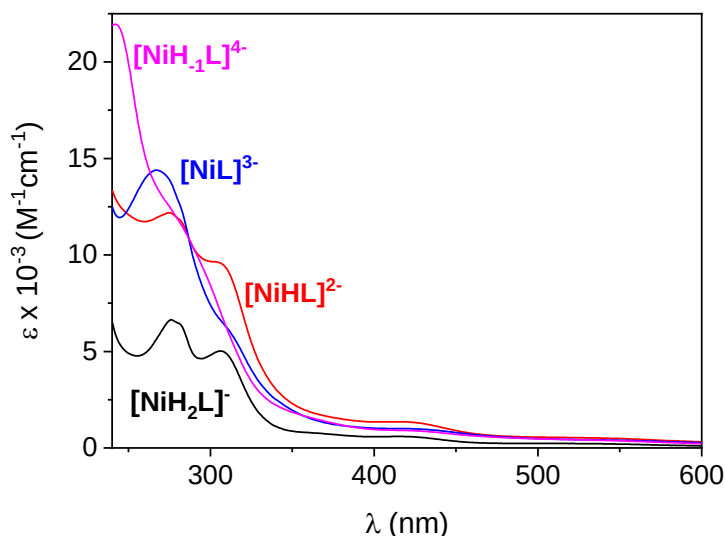
A wtNiSOD-CC komplexképződési folyamatai jelentősen eltérnek a wtNiSOD peptid esetében leírtaktól (9. ábra/C). A komplexképződés savas pH-n a $[NiH_2L]^-$ részecske kialakulásával indul. Ebben a pH-tartományban az aszparaginsav karboxilátcsoportja deprotonálódik, azonban nincs spektroszkópiai vagy termodinamikai bizonyíték, hogy részt venne a Ni(II)-ion koordinálásában. Az N-terminális ciszteint tartalmazó peptidek az (NH_2, S^-) koordinációs módot részesítik előnyben, azonban a komplexképződésre meghatározott egyensúlyi állandó nagyobb, mint a Ni(II)-CysGly rendszerben számított (NH_2, S^-) koordináció kialakulására jellemző érték ($\log K = 7,94$).¹³⁶ Így feltételezésünk szerint (NH_2, S^-, S^-) donorkészleten keresztül koordinálódik a Ni(II)-ion, amit az UV-látható és CD spektroszkópiai adatok is alátámasztanak (14. ábra).



14. ábra: A Ni(II)/wtNiSOD-CC 1:1 koncentráció arányú rendszerének pH-függő A: UV-látható és B: CD spektrumai. (A: $c_{\text{lig}} = 0,52 \text{ mM}$; B: $c_{\text{lig}} = 1,11 \text{ mM}$; $l = 1 \text{ mm}$; $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $I = 0,2 \text{ M KCl}$)

Meghatároztuk a különböző Ni(II)-komplexek egyedi UV-látható spektrumait, melyek közül a $[\text{NiH}_2\text{L}]^-$ részecskére jellemző spektrum két jelentős átmenetet mutat (15. ábra). Az egyik a $\text{S}^- \rightarrow \text{Ni(II)}$ töltésátviteli sávjához (308 nm), míg a másik a síknégyszetes Ni(II)-komplexek d-d átmenetéhez (416 nm) rendelhető. A CD spektrumok alapján a Ni(II)-ion a Cys1 tiolát-csoportján keresztül koordinálódik, azonban a 650 nm-en megjelenő sáv a távoli cisztein tiolát-csoportjának Ni(II)-ionhoz való koordinációjára jellemző d-d sávhoz rendelhető.¹⁴³ Így igazoltuk, hogy a $[\text{NiH}_2\text{L}]^-$ komplexben a fémiont a (NH_2 , $\text{S}^-(\text{Cys1})$) donorcsoportok koordinálják, melyet a távoli cisztein (Cys6) kötődésekor kialakuló makrokelát egészít ki. A pH növelésével kialakuló $[\text{NiHL}]^{2-}$ komplexben a második helyen lévő cisztein tiolát-csoportja is koordinálódik a fémionhoz síknégyszetes, (NH_2 , S^- , S^- , S^-) kötésmódú komplexet kialakítva. Ezt az UV-látható és CD spektrumok jellegzetes változásai is alátámasztják. A $\text{S}^- \rightarrow \text{Ni(II)}$ töltésátviteli sáv intenzitása nő, valamint az egyedi UV-látható spektrumon 421 nm-en megjelenő intenzív d-d átmenet utal a síknégyszetes geometriára. Egy további lúgfogyasztó folyamatban egy amid nitrogén fémion indukált deprotonálódása és koordinációja átrendezi a koordinációs szférát a $[\text{NiL}]^{3-}$ komplexben. A spektroszkópiai adatok alapján a komplex továbbra is síknégyszetes elrendeződésű és az első helyen álló cisztein tiolát-csoportjának koordinációja megszűnik. A koordinációs szféra átrendeződése az UV-látható spektrumokon jól követhető. Megjelenik a $\text{N}^- \rightarrow \text{Ni(II)}$ LMCT sávja 270 nm-en, míg a $\text{S}^- \rightarrow \text{Ni(II)}$ töltésátviteli sáv intenzitása csökken. A fémiont így az (NH_2 , N^- , S^-) donorcsoportok koordinálják (5,5)-tagú csatolt kelátrendszer alakítva ki, melyet a távoli tiolát-csoporttal (Cys6) való makrokelát egészít ki. A $[\text{NiL}]^{3-}$ komplex így a NiSOD enzim redukált formájára jellemző kötésmóddal rendelkezik, kialakulása azonban a lúgos pH-

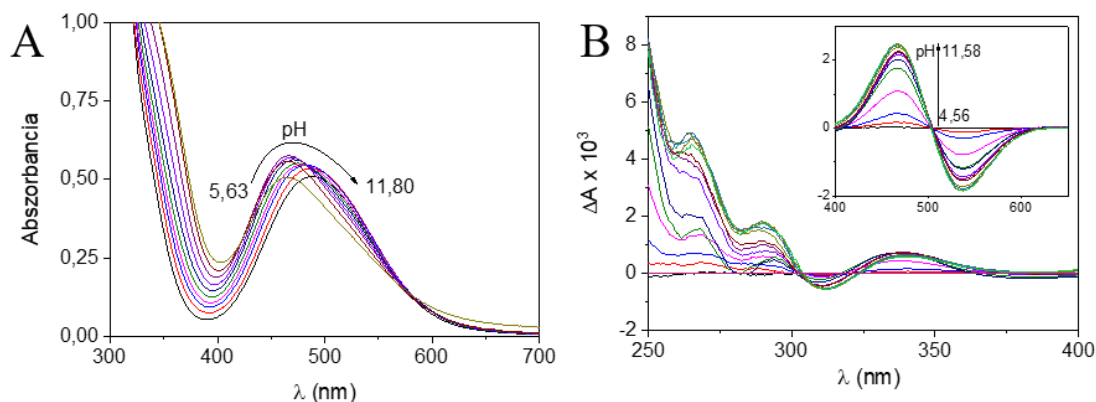
tartományba tolódik el. Ez a $[\text{NiHL}]^{2-}$ komplexben kialakuló $(\text{NH}_2, \text{S}^-, \text{S}^-, \text{S}^-)$ kötémód nagy termodinamikai stabilitásának köszönhető, ami gátolja az amid nitrogén deprotonálódását és koordinációját. Az utolsó lúgfogyasztó folyamatban képződő $[\text{NiH}_1\text{L}]^{4-}$ komplexben az előző modellekhez hasonlóan a deprotonálódó, de nem koordinálódó tirozin fenolos hidroxilcsoport található. A pNi érték jelentősen nő a wtNiSOD peptidhez képest, ami a tiolát-csoportok számának növelésével magyarázható és Ni(II)-ion tiolát-csoportokhoz való nagyobb affinitását igazolja a hisztidin imidazol nitrogénjéhez viszonyítva.



15. ábra: A Ni(II)/wtNiSOD-CC 1:1 koncentráció arányú rendszerének számított egyedi UV-látható spektrumai.

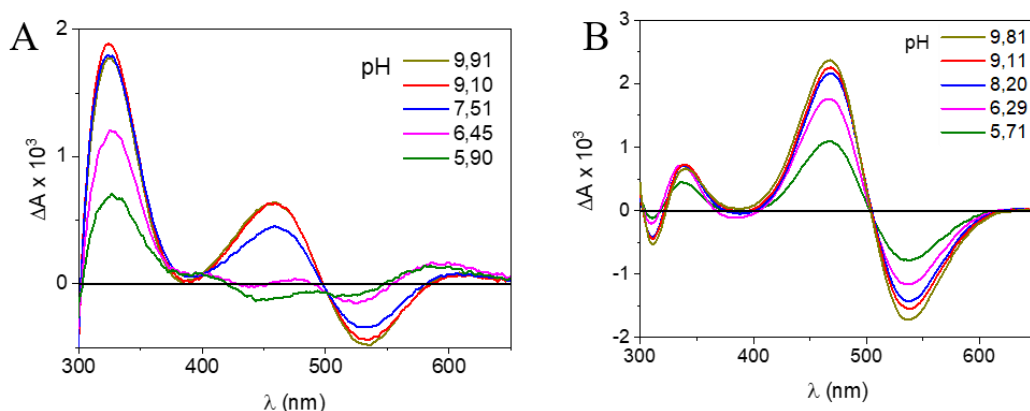
A wtNiSOD-Pen peptid szerkezete kis mértékben tér el a wtNiSOD ligandumtól és a komplexképző sajátosságai is nagy mértékben megegyeznek (9. ábra/D). A komplexképződés enyhén savas pH-n a $[\text{NiH}_3\text{L}]^+$ részecske képződésével indul hisztaminszerű koordinációval ($(\text{NH}_2, \text{N}_{\text{im}})$ donorkészlet). A következő lúgfogyasztó folyamatban a $[\text{NiHL}]^-$ komplex jelenik meg. Az UV-látható és CD spektrumok alapján ez a részecske síknégyzetes geometriájú (16. ábra), melyben a $(\text{NH}_2, \text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{S}^-(\text{Cys}))$ donorcsoportok vesznek részt a fémion koordinálásában. A NiSOD enzim redukált formájára jellemző koordinációs mód egy további lúgfogyasztó folyamatban alakul ki a penicillamin tiolát-csoportjának koordinációjával. A penicillamin koordinációja szelektíven követhető 310 nm-en CD spektroszkópia segítségével, mert a metil-szubsztituensek jelenléte nagyobb gerjesztési energiákat eredményez, mint ami a cistein esetében tapasztalható. Továbbá a peptid D-penicillamint tartalmaz, így a korábbiaktól eltérően itt negatív Cotton-effektus jelenik meg a CD spektrumokon. Ez a hatás az UV-látható spektrumokban nem

jelenik meg. A képződő $[\text{NiL}]^{2-}$ komplexben tehát (NH_2 , N^- , S^- , S^-) koordinációs mód alakul ki, amire síknégyzetes geometria jellemző. A komplex szerkezetét UV-látható és CD spektroszkópiával támasztottuk alá.



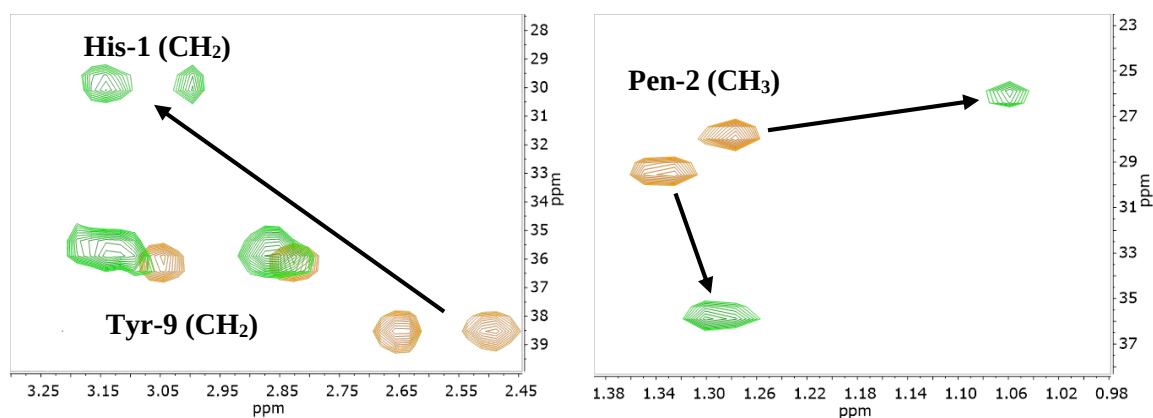
16. ábra: A Ni(II)/wtNiSOD-Pen 1:1 koncentráció arányú rendszerének pH-függő A: UV-látható és B: CD spektrumai. ($C_{\text{lig}} = 2,00 \text{ mM}$; $l = 10 \text{ mm}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,2 \text{ M KCl}$)

A wtNiSOD (17. ábra/A) és a wtNiSOD-Pen (17. ábra/B) Ni(II)-komplexeinek pH-függő CD spektrumai a 17. ábrán láthatóak összehasonlítva. A legszembetűnőbb különbség a 310 nm-en detektált abszorbanciakülönbségeken látható, ahol a penicillamin jelenléte a wtNiSOD Ni(II)-komplexétől eltérően negatív előjelű változást idéz elő az abszorbanciakülönbségben. Ez a hatás egyedivé teszi a wtNiSOD-Pen peptidet, ugyanis az általunk vizsgált modellvegyületek közül egyedül itt figyelhető meg negatív előjelű változás az abszorbanciakülönbségben 310 nm-en a CD spektrumokon.



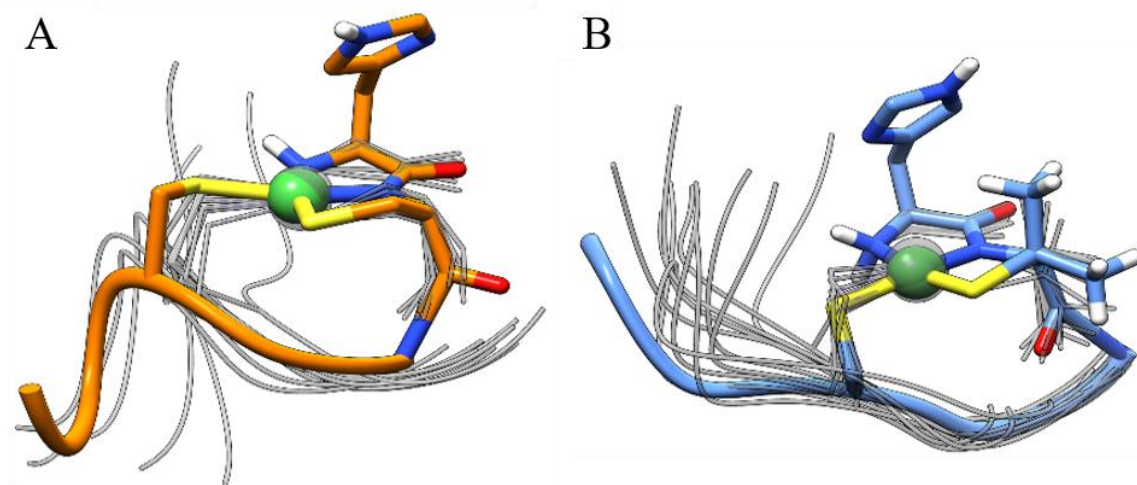
17. ábra: A Ni(II)/ligandum 1:1 koncentráció arányú rendszerek pH-függő CD spektrumai az A: wtNiSOD és B: wtNiSOD-Pen modellek esetén. ($C_{\text{wtNiSOD}} = 1,5 \text{ mM}$; $C_{\text{wtNiSOD-Pen}} = 2,00 \text{ mM}$; $l = 10 \text{ mm}$; $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $I = 0,2 \text{ M KCl}$) Az A ábra a ⁹² hivatkozásból származik.

A $[\text{NiL}]^{2-}$ komplex szerkezetét NMR spektroszkópia segítségével is vizsgáltuk. Ehhez $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HSQC spektrumokat vettünk fel pH = 7,8-en a ligandumról, valamint a Ni(II)/wtNiSOD-Pen 1:1 koncentráció arányú elegyéről. Az NMR spektrumokon számos jel jelentős eltolódása figyelhető meg a Ni(II)-ion jelenlétében. Drasztikus változás látható a penicillamin metilcsoportjainak jeleiben, ami feltehetően a tiolát-csoportok és a peptidváz amid nitrogénjének koordinációjának köszönhető. Ezen kívül a hisztidin $-\text{CH}_2$ jeleit szintén befolyásolja az amid nitrogén deprotonálódása és koordinációja. Ezek a változások alátámasztják a penicillamin tiolát-csoport és az amid nitrogén kötődését a fémionhoz.



18. ábra: $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HSQC spektrumok releváns részei a wtNiSOD-Pen esetében. A narancssárga a ligandum, míg a zöld Ni(II)/wtNiSOD-Pen 1:1 koncentráció arányú rendszeréhez tartozó jelek. (pH = 7,8; $C_{\text{lig}} = 5\text{mM}$)

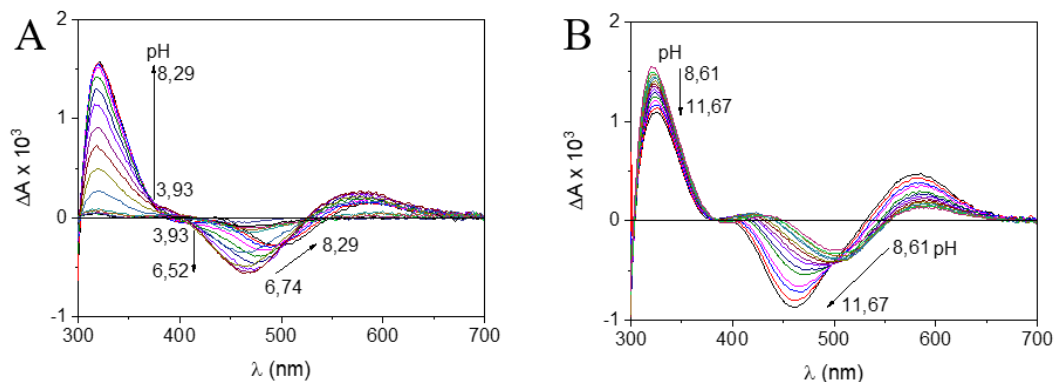
A fiziológiás pH-n domináns $[\text{NiL}]^{2-}$ komplex szerkezetére vonatkozóan egy együttműködés keretében további információkat is kaptunk. Ekkor egy többlépéses modellezési stratégiával a $[\text{NiL}]^{2-}$ komplex szerkezetét és a fémion koordinációjának hatását vizsgáltuk a peptid konformációjára MD és DFT számítások segítségével, melyet egy olaszországi együttműködés keretében Prof. Dr. Eugenio Garribba és Dr. Giuseppe Sciortino végeztek el. A wtNiSOD-Pen peptid és Ni(II)-komplexén kívül a wtNiSOD peptidet és Ni(II)-komplexét is vizsgáltuk. A szabad peptidek a rendezetlen peptidekre jellemző konformációs viselkedést mutatnak, átmenetek jelennek meg a feltekeredett és lineáris konformációk között, de a rendezetlen formák túlsúlyban vannak. A Ni(II)-komplexekben a fémion koordinációja csökkenti a peptidváz flexibilitását. Az MD számítások alapján a fő konformációs izomerben a Ni(II)-ion síknégyszetes geometriája stabil és a 3-9 aminosavak (DLPCGVY) α -hélix konformációt vesznek fel a 200 ns-os MD szimuláció során. Az MD számítások alapján a leggyakoribb konformációs izomerek szerkezete a 19. ábrán látható. Az adatok alapján valószínűsíthető, hogy a második helyen lévő aminosav (Cys vagy Pen) tiolcsoportjának, valamint az első amid nitrogén deprotonálódását és koordinációját követően az N_{Im} a fémion axiális pozíciójához közel kerül. A legnagyobb populációjú izomer szerkezetét DFT módszerrel is optimalizáltuk, amely számítások megerősítették a fémion síknégyszetes geometriáját és hogy a hisztidin imidazol nitrogénje nem vesz részt a koordinációban. A kötéstávolságok meghatározása alapján a legszembevetőbb különbség a két komplex esetén a Ni(II) - $\text{S}^-(\text{Pen}2)$ és Ni(II) - $\text{S}^-(\text{Cys}2)$ kötések hossza között van: a penicillamin tiolát-csoportja és a Ni(II)-ion rövidebb kötést alakít ki, mint a wtNiSOD komplexében a Ni(II) - $\text{S}^-(\text{Cys}2)$ kötés.



19. ábra: Az MD számítások során 200 ns alatt megjelenő konformációs izomerek szerkezete az A: Ni(II)/wtNiSOD és B: Ni(II)/wtNiSOD-Pen komplexek esetében

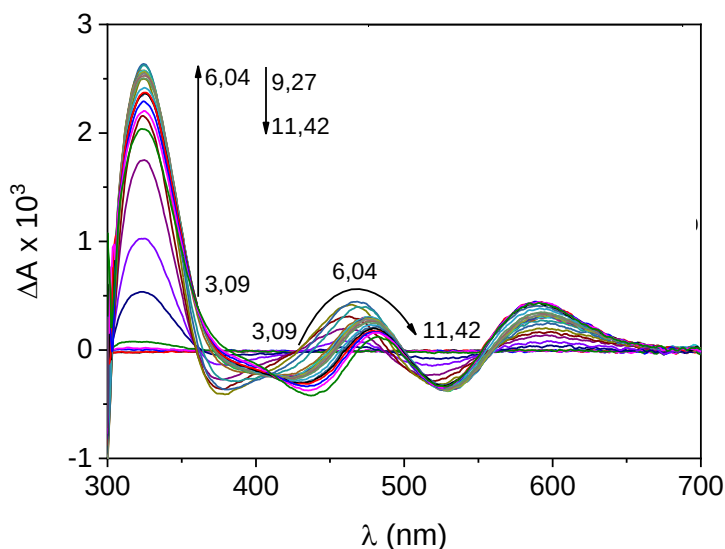
A Ni(II)-ion és ligandum 0,9:1 koncentráció arányú elegyéről 8-as pH-n ESI-TOF-MS spektrumot rögzítettünk, mely alapján igazoltuk, hogy ezen körülmények között kizárólag a $[\text{NiL}]^{2-}$ részecske van jelen a fent leírt koordinációs móddal. Dimer vagy biszkomplexek képződését ilyen körülmények között sem tudtuk kimutatni. A nem koordinálódó tirozin oldalláncának deprotonálódása a $[\text{NiH}_1\text{L}]^{3-}$ komplexet eredményezi, mely részecske megjelenése sem az UV-látható, sem a CD spektrumokban nem okoz jelentős változást. Ebből arra lehet következtetni, hogy a fémion koordinációs szférája változatlan marad, valamint a folyamatra jellemző lécsőzetes egyensúlyi állandó ($\log K = 9,89$) alátámasztja, hogy a tirozin nem vesz részt a fémion koordinálásában. Erősen lúgos oldatban egy további lúgfogyasztó folyamat játszódik le, ami az UV-látható spektrumokban mérsékelt változást indukál. Szakirodalmi adatok alapján ezt egy további amid nitrogén deprotonálódása és koordinációja okozza, így a penicillamin tiolát-csoportja kiszorul a koordinációs szférából és (NH_2 , N^- , N^- , S^- (Cys)) kötésmód alakul ki.¹²² Ez a folyamat a wtNiSOD komplex esetében nem megy végbe.

A wtNiSOD-NMe peptid esetén (9. ábra/E) a Ni(II)-ionokkal való komplexképződési reakció a $[\text{NiH}_3\text{L}]^+$ részecske kialakulásával indul, amelyben a (NH_{Me} , N_{Im}) donorcsoportok vesznek részt a fémion megkötésében hisztaminszerű koordinációs móddal. A következő lúgfogyasztó folyamatok a ciszteinek tiolcsoportjainak deprotonálódásához és koordinációjához köthetők, amelyben a $[\text{NiHL}]^-$ komplex alakul ki (NMeH , N_{Im} , S^- , S^-) donorkészlettel. A pH növelésével egy amid nitrogén deprotonálódása és koordinációja kiszorítja az imidazol nitrogént a koordinációs szférából a $[\text{NiL}]^{2-}$ komplex kialakulásakor. Ez a komplex a NiSOD enzim redukált formájára is jellemző (NH_2 , N^- , S^- , S^-) koordinációs móddal rendelkezik, megjelenését a CD spektrumok jelentős átalakulása kíséri (20. ábra/A). A 270 nm-en tapasztalt változás a $\text{N}^- \rightarrow \text{Ni(II)}$ töltésátviteli sávhoz, míg a 325 nm-en látható átmenet a $\text{S}^- \rightarrow \text{Ni(II)}$ töltésátviteli sávhoz rendelhető. A komplex stabilitása azonban 1,2 log egységgel nagyobb, mint a wtNiSOD azonos formájú komplexének a stabilitása. Ez a hatás a metilcsoport elektronküldő tulajdonságával magyarázható. A következő lúgfogyasztó folyamatban a többi modellhez hasonlóan a deprotonálódó, de nem koordináló tirozin oldallánc játszik szerepet a $[\text{NiH}_1\text{L}]^{3-}$ komplex kialakulásakor. A wtNiSOD ligandumtól eltérően egy további sav-bázis folyamat is végbemegy, amely a $[\text{NiH}_2\text{L}]^{4-}$ részecskét eredményezi. Ekkor egy további amid nitrogén deprotonálódása és koordinációja kiszorítja a második pozícióban lévő cisztein tiolát-csoportját a koordinációs szférából. A folyamatot a CD spektrumok is igazolják, ahol 500 nm körüli jelentős változás látható az abszorbanciakülönbségekben (20. ábra/B).



20. ábra: A Ni(II)/wtNiSOD-NMe 1:1 koncentráció arányú rendszerének pH-függő CD spektrumai pH = 8,3 A: alatt és B: felett külön ábrázolva. ($c_{\text{lig}} = 2 \text{ mM}$; $l = 10 \text{ mm}$; $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $I = 0,2 \text{ M KCl}$;))

A wtNiSOD-RC modell esetén a komplexképződési folyamatok jelentősen eltérnek a wtNiSOD ligandum reakcióitól (9. ábra/F). A komplexképződés 5-ös pH-n kezdődik egyidőben a [NiHL] és [NiL] részecskék kialakulásával. A [NiHL] csak kis mennyiségben van jelen, míg a [NiL] ezután széles pH-tartományban uralkodó részecske. A CD spektrumok 280 és 320 nm-en jelentős változást mutatnak a [NiL] komplex kialakulásakor, melyek az amid nitrogén - Ni(II) (280 nm) és a tiolát - Ni(II) (320 nm) töltésátviteli sávokhoz rendelhetők (21. ábra). A spektroszkópai adatok alapján a [NiL] komplexben a (NH_2 , N^- , S^- , S^-) koordinációs mód alakul ki síknégyszetes geometriát eredményezve. A következő lúgfogyasztó lépésben a tirozin hidroxilcsoportjának deprotonálódása a [NiH₁L] komplex megjelenését mutatja, mely a CD spektrumok alapján nem változtatja meg a fémion koordinációs szféráját. Egy további sav-bázis folyamat során a [NiH₂L] részecske jelenik meg, mely egy további amid nitrogén deprotonálódásához és koordinációjához köthető. Ez a CD spektrumokon kis mértékű intenzitáscsökkenést okoz.



21. ábra: A Ni(II)/wtNiSOD-RC 1:1 koncentráció arányú rendszerének pH-függő CD spektrumai. ($c_{\text{lig}} = 2 \text{ mM}$; $l = 10 \text{ mm}$; $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $I = 0,2 \text{ M KCl}$)

4.1.2. A wtNiSOD-dim peptid és Ni(II)-komplexeinek jellemzése

A wtNiSOD-dim peptid esetében a deprotonálható donorcsoportok száma jelentősen nő az előző részben tárgyalt modellekhez képest, így a képződő Ni(II)-komplexekektől eltérőek lesznek. A ligandum lépcsőzetes protonálódási állandóit, illetve a Ni(II)-ionnal képződő komplexek stabilitási állandóit pH-potenciometria segítségével határoztuk meg, melyeket a 3. táblázat tartalmaz. A két kilenc aminosavból felépülő fragmens kapcsolásakor a lizin C-terminális karboxilcsoportja szabadon marad, ami lehetővé teszi, hogy a terminális aminocsoportokon, a ciszteinek tiolcsoportjain, az aszparaginsav karboxilcsoportjain, a tirozil fenolos hidroxilcsoportjain, valamint a hisztidinek imidazol nitrogénjein kívül ez is részt vegyen a sav-bázis folyamatokban. Ennek köszönhetően a wtNiSOD-dim peptid esetében a titrálási görbe illesztése 13 protonálódási állandó figyelembevételével történt.

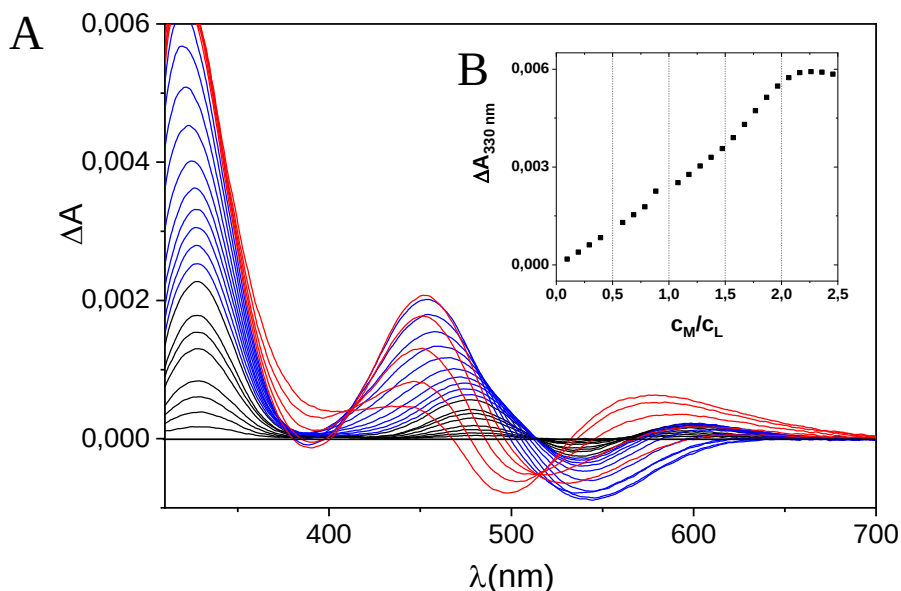
Az adatok elemzése alapján a legkisebb protonálódási állandók a lizin és aszparaginsav karboxilcsoportjaihoz rendelhetők. A további deprotonálódási lépések a hisztidinek imidazol gyűrűin mennek végbe. Szakirodalmi adatok alapján ez az N-terminális hisztidin és az aminocsoport között kialakuló intramolekuláris hidrogén híd hatása, ami növeli az imidazol nitrogén savasságát.¹²² A következő lépésben a terminális aminocsoportok és ciszteinek tiol-oldalláncai deprotonálódnak, míg a legnagyobb $\log K_i$ értékek a tirozinok fenolos hidroxilcsoportjaihoz rendelhetők.

3. táblázat: A wtNiSOD-dim peptid lépcsőzetes protonálódási állandói ($\log K_i$) és a Ni(II)-ionnal képződő komplexeinek stabilitási állandói ($\log \beta_{\text{pqr}}$), zárójelben a 3σ standard deviáció értékei szerepelnek. Az egyes részecskék töltésének jelölésétől eltekintünk. ($T = 25\text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,2\text{ M KCl}$)

Részecskék	$\log K_i$	Részecskék	$\log \beta_{\text{pqr}}$
[H ₁₃ L]	3,3(1)	[NiH ₆ L]	64,6(1)
[H ₁₂ L]	3,61(1)	[NiH ₄ L]	50,5(1)
[H ₁₁ L]	4,41(1)	[NiL]	13,8(1)
[H ₁₀ L]	5,42(8)	[NiH ₋₁ L]	4,7(1)
[H ₉ L]	6,00(7)	[Ni ₂ H ₆ L]	67,5(6)
[H ₈ L]	7,25(6)	[Ni ₂ H ₄ L]	56,8(3)
[H ₇ L]	7,36(5)	[Ni ₂ L]	29,6(3)
[H ₆ L]	7,96(7)	[Ni ₂ H ₋₂ L]	8,9(1)
[H ₅ L]	8,43(4)		
[H ₄ L]	8,74(7)		
[H ₃ L]	9,23(3)	$\log K_{\text{NiH}_6\text{L}}^{\text{Ni}_2\text{H}_6\text{L}}$	2,9
[H ₂ L]	9,86(4)	$\log K_{\text{NiH}_4\text{L}}^{\text{Ni}_2\text{H}_4\text{L}}$	6,3
[HL]	10,03(2)	$\log K_{\text{NiL}}^{\text{Ni}_2\text{L}}^{\text{a}}$	- 2,0

$$^{\text{a}} K_{\text{NiL}} = \beta_{\text{NiL}}; K_{\text{Ni}_2\text{L}} = \beta_{\text{Ni}_2\text{L}}/\beta_{\text{NiL}} = [\text{Ni}_2\text{L}] / ([\text{NiL}][\text{Ni}])$$

Először vizsgáltuk a peptid Ni(II)-kötő képességét CD spektroszkópia segítségével HEPES pufferben pH = 7,6-en. A ligandum oldatához részletekben NiCl₂-oldatot adtunk 0-2,5 ekvivalens mennyiségig és felvettük a spektrumokat (22. ábra). A Ni(II)-ionnal való komplexképződés jelentős CD aktivitást eredményez, 1:1 fémion/ligandum koncentráció arányig három sáv (330 nm, 478 nm, 544 nm) megjelenését tapasztaltuk. Ezek a S⁻ → Ni(II) töltésátviteli sávhoz (330 nm, 478 nm) és a d-d átmenethez (544 nm) rendelhetők, melyek megerősítik, hogy a kialakuló komplex síknégyzetes geometriájú. Tovább növelve a Ni(II)-ion koncentrációját a látható szegmens (478 és 544 nm) enyhe eltolódása és a 330 nm-en detektált jel intenzitásának növekedése tapasztalható, ami egy új komplex kialakulását jelzi. Több, mint 2 ekvivalens Ni(II)-ion hozzáadása után a S⁻ → Ni(II) töltésátviteli sáv intenzitásának telítése tapasztalható, míg a d-d átmenethez tartozó spektrumrész teljesen átalakul. Ez a hatás egy harmadik fémion koordinációját jelzi, melyben valószínűsíthetően a peptidváz további amid nitrogénjei vesznek részt a Ni(II)-ion megkötésében.

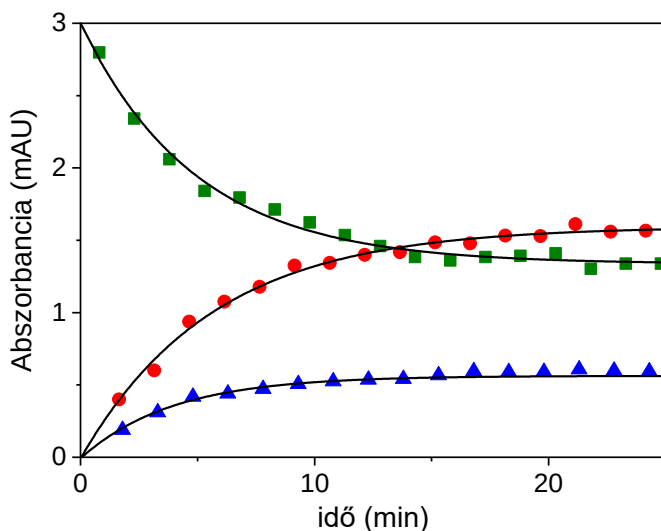


22. ábra: A: A wtNiSOD-dim ligandum NiCl_2 -oldattal való titrálásának CD spektrumai. A fekete 0 és 1 ekvivalens Ni(II)/L , a kék 1 és 2 ekvivalens Ni(II)/L , a piros 2 és 2,5 ekvivalens Ni(II)/L mintáknak felelnek meg. B: A 330 nm-en vett intenzitás változása a különböző Ni(II):ligandum koncentráció arányok mellett. (L: wtNiSOD-dim; pH = 7,6; $c_L = 1,1 \text{ mM}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,2 \text{ M KCl}$)

Az egyensúlyi vizsgálatok megkezdése előtt CE-MS vizsgálatokat végeztünk 0,9 : 1 = fémion : ligandum koncentráció arányok mellett 9-es pH-n. Az elektroferogramokon három csúcs jelenik meg, melyekről MS méréséssel igazoltuk, hogy az L, NiL és Ni_2L részecskékhez tartoznak. Ezen három CE csúcs tömegspektrumainak elemzésekor minden esetben megjelent egy másik részecske, amelyre nagyon hasonló MS csúcsok jellemzőek, mint az előbb felsorolt részecskékre, de két egységgel kisebb m/z értékkel. Feltételezésünk szerint ez a specifikus tulajdonság a tirozinok fenolos hidroxilcsoportjainak ESI által indukált deprotonálódásához köthető, amit az izotópeloszlások is alátámasztanak. Így a pH = 9,5 felett megjelenő $[\text{Ni}_2\text{H}_2\text{L}]$ részecske a deprotonálódó, de nem koordináló tirozin oldalláncokhoz köthető.

A wtNiSOD-dim ligandum kiemelkedő nikkel-kötő képessége azzal a feltevéssel magyarázható, hogy az első fémion koordinációja stabilizálja a ligandum szerkezetét, ami elősegíti a második Ni(II) -ion megkötését. Ennek alátámasztása érdekében vizsgáltuk a komplexképződés kinetikáját, ehhez az előzőekben leírt elegyet kevertük össze, majd különböző inkubálási idő eltelte után vettük fel az elektroferogramokat. Az első pontot körülbelül egy perc keverési idő után rögzítettük. A

különböző részecskékhez tartozó csúcsok intenzitását az idő függvényében ábráztuk, mely a 23. ábrán látható.

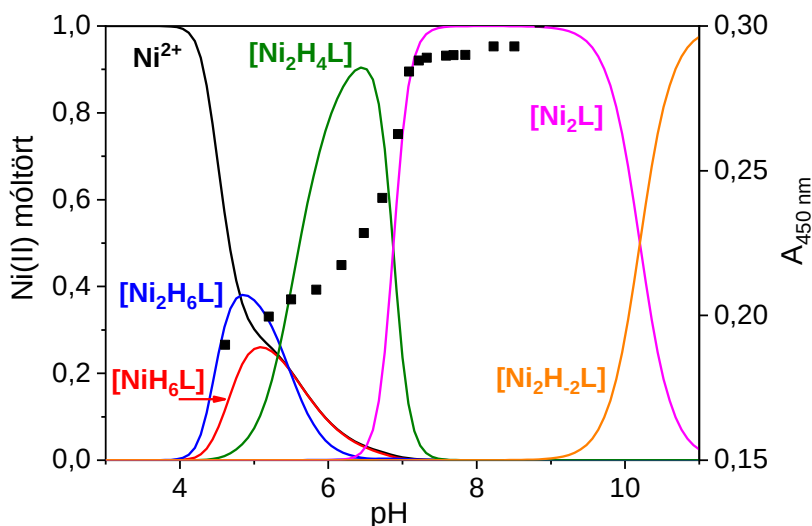


23. ábra: A wtNiSOD-dim ligandum (zöld) koncentrációjának csökkenése, valamint a NiL (piros) és Ni₂L (kék) komplexek koncentrációjának növekedése az idő függvényében a Ni(II) : ligandum 0,9 : 1 koncentráció arányú elegyben. (pH = 9,0; c_L = 42 μM)

A kísérleti elrendezés korlátai miatt az így kapott eredmények félkvantitatívnak tekinthetők, azonban lényeges információkkal szolgálnak a komplexképződés mechanizmusáról. A kinetikai görbék lefutása alapján két fontos következtetés vonható le: a komplexképződés viszonylag lassú és a dinukleáris részecske már ekvimolárishoz közeli aránynál is megjelenik. A kapott kinetikai görbéket egy exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel illesztve a meghatározott sebességi együtthatók jó közelítéssel megegyeznek. Az elsőrendű kinetikai kizárja, hogy a fémion elősegítse a konformáció változást, így feltételezhető, hogy több szerkezeti izomer van jelen egyensúlyban, melyek egyikéhez a Ni(II)-ion gyorsan koordinálódik. Az első fémion kötődése eltolja az izomerek közötti egyensúlyt, mely egy viszonylag lassú elsőrendű folyamat, és további szerkezeti átrendeződést indukál a peptid szerkezetében. Ezek alapján a ligandum szerkezeti átrendeződése a sebességhatározó lépés, a fémion ezután gyorsan koordinálódik a ligandumhoz. A szerkezeti átrendeződés ténye a komplexképződés részletes leírásánál a későbbiekben kerül kifejtésre.

A komplexek vizsgálatokor minden esetben figyelembe vettük, hogy a Ni(II)-ion és a ligandum közötti komplexképződési folyamatok viszonylag lassúak, így a pH-potenciometriás vizsgálatok során kellő időt hagytunk az egyensúlyi állapot beállására. A Ni(II)-ion és ligandum 2:1

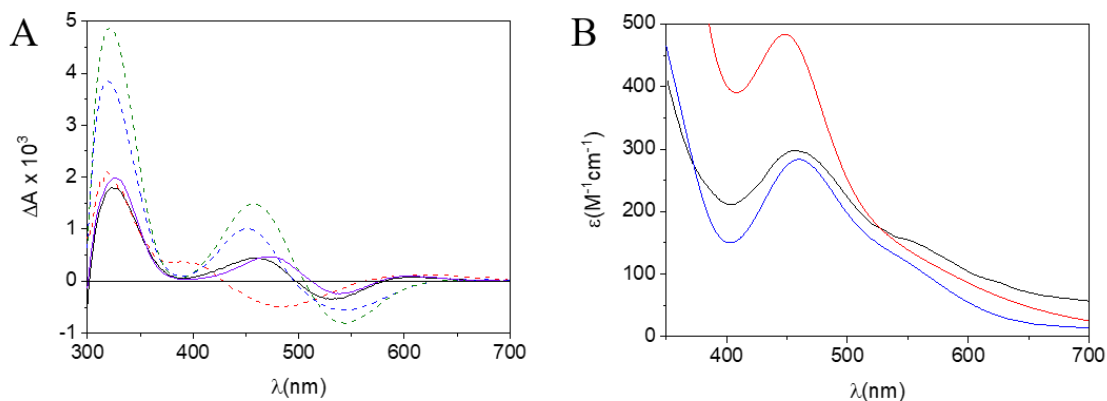
koncentráció arányú rendszerének pH-függő koncentráció eloszlási görbéje a 24. ábrán látható a 450 nm-en kapott UV-látható abszorbanciákkal kiegészítve. A spektrális változások a síknégyzetes geometriájú Ni(II)-komplexek d-d átmenetéhez rendelhetők.



24. ábra: A Ni(II)-ion és a wtNiSOD-dim ligandum 2:1 koncentráció arányú rendszerének koncentráció eloszlási görbéje, valamint a 450 nm-en vett UV-látható abszorbanciák a pH függvényében. ($c_{\text{Ni(II)}} = 2,4 \text{ mM}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,2 \text{ M KCl}$)

A komplexképződés enyhén savas pH-n (NH_2 , N_{Im}) hisztamin szerű koordinációval indul a $[\text{Ni}_2\text{H}_6\text{L}]$ részecske képződésével. Ezen komplex megjelenésével átfed a mononukleáris $[\text{NiH}_6\text{L}]$ komplex kialakulása is, azonban kisebb mennyiségben van jelen, mint a dinukleáris, azonos protonáltságú komplex. Semleges pH felett már nincs jelen mononukleáris részecske. Egy további lúgfogyasztó folyamatban egységenként egy-egy tiolcsoport deprotonálódása és koordinációja eredményezi a $[\text{Ni}_2\text{H}_4\text{L}]$ komplexet, ahol a Ni(II)-ionok (NH_2 , N_{Im} , S^-) koordinációt alakítanak ki síknégyzetes geometriával, amely jelentős CD aktivitást mutat (25. ábra/A). A pH további növelésével egy-egy amid nitrogén, valamint a másik két tiolcsoport deprotonálódásával és koordinációjával a NiSOD enzim redukált formájára jellemző (NH_2 , N^- , S^- , S^-) koordinációjú síknégyzetes $[\text{Ni}_2\text{L}]$ komplex képződik. Az egységenkénti két tiolcsoport külön lúgfogyasztó folyamatban való deprotonálódását és koordinációját a CD spektrumok is alátámasztják, ahol a pH növelésével megnő a $\text{S}^- \rightarrow \text{Ni(II)}$ töltésátviteli sávhoz (330 és 480 nm) rendelhető jel intenzitása. A két modell azonos koordinációs módját a wtNiSOD és wtNiSOD-dim peptidek Ni(II)-komplexeiről készült CD spektrumok, valamint a wtNiSOD $[\text{NiL}]$ és a wtNiSOD-dim $[\text{NiL}]$ és

[Ni₂L] komplexeire meghatározott moláris abszorpciós spektrumok összehasonlításával is szemléltethetjük, melyek a 25. ábra A és B részén láthatóak. Ezzel a koordinációs móddal nagy stabilitású kétmagvú komplexek alakulnak ki, amit a lépcsőzetes egyensúlyi állandók aránya is igazol ($\log(K(\text{NiL})/K(\text{Ni}_2\text{L})) \sim -2$). Ez egyértelműen jelzi, hogy a kétmagvú komplexek képződése kedvezményezett még a fémion és ligandum ekvimoláris oldatában is. A stabilitási állandók aránya, valamint a tény, hogy a komplexképződési folyamat lassú, arra enged következtetni, hogy a két Ni(II)-ion között kooperáció van: az első fémion kötődése konformáció változást idéz elő a ligandum szerkezetében, ami elősegíti a második fémion koordinációját. Ez a jelenség azonban nem figyelhető meg savas pH-n (3. táblázat), ahol a protonált ligandumok esetén valószínűleg nem valósul meg a szükséges szerkezeti átrendeződés a Ni(II)-ion és a ligandum 1:1 koncentráció arányú rendszerében. Az utolsó deprotonálódási lépésben a 9,5-es pH felett a [Ni₂H₋₂L] komplex alakul ki, mely a kilenc tagszámú modellekhez hasonlóan a tirozin aminosavak fenolos hidroxilcsoportjának deprotonálódásához köthető. A spektroszkópiai adatok alapján a fémionok koordinálásában nem vesznek részt ezek a csoportok.

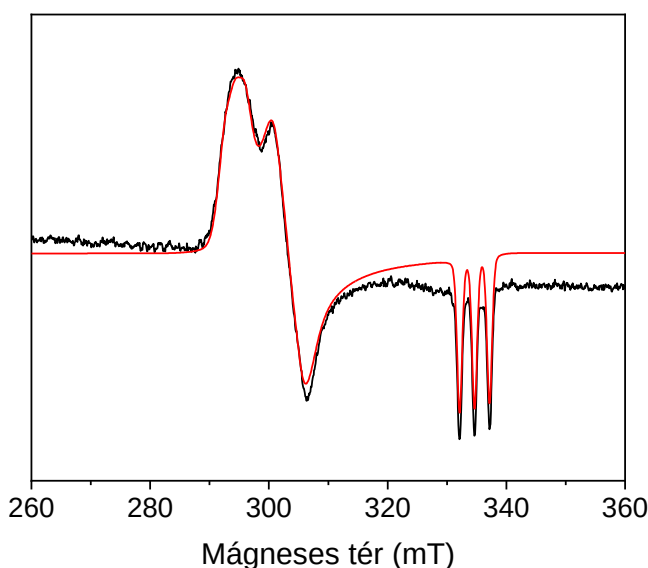


25. ábra: A: A különböző koncentráció arányú Ni(II)/L mintákról készült pH-függő CD spektrumok: a Ni(II)/wtNiSOD-dim 2:1 koncentráció arányú elegyének spektrumait a szaggatott vonalak jelzik, 6,28 (piros), 6,82 (kék) és 8,82 (zöld) pH-kon; az 1:1 koncentráció arányú elegyek spektrumait a folytonos vonalak jelzik, pH = 7,62-en (lila) a Ni(II)/wtNiSOD-dim, míg pH = 7,80 (fekete) a Ni(II)/wtNiSOD rendszerre. B: UV-látható moláris abszorpciós spektrumok a Ni(II)/wtNiSOD-dim 2:1 (piros) és 1:1 (fekete) koncentráció arányú rendszereire pH = 7,60-en, valamint a Ni(II)/wtNiSOD 1:1 (kék) koncentráció arányú elegyére pH = 7,80-en.

4.2. A peptidek Ni(III)-komplexeinek szerkezetvizsgálata ESR spektroszkópiával

A NiSOD enzimből a Ni(II)-ion a dizmutálási ciklus során Ni(III)-ionná oxidálódik, amely egy paramágneses tulajdonságú részecske megjelenését eredményezi. Ez alapján a szerkezete ESR

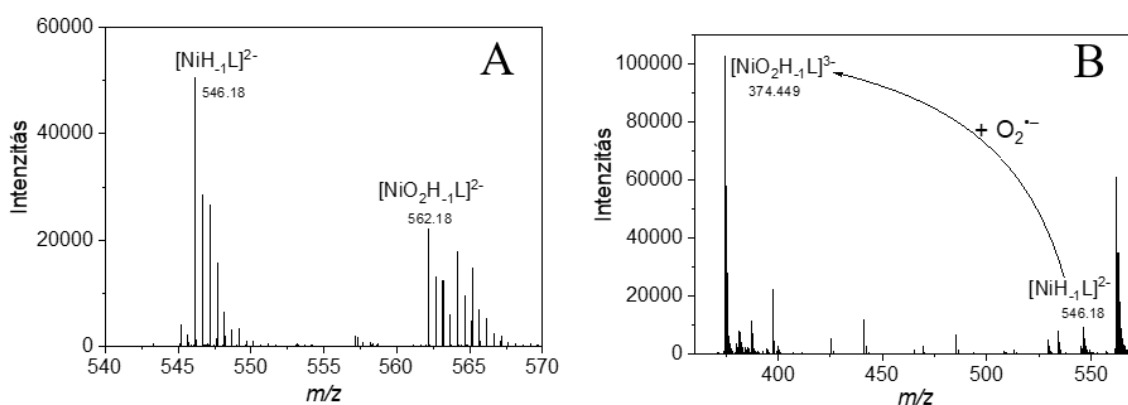
spektroszkópia segítségével vizsgálható. Az általunk jellemzett Ni(II)-komplexeket kálium-szuperoxidral és/vagy oxonnal (peroxo-monoszulfácion) oxidáltuk és felvettük az ESR spektrumokat. A wtNiSOD Ni(III)-komplexének jellemzéskor megállapították, hogy az N-terminális hisztidin imidazol nitrogénjének axiális koordinációja jellegzetes felhasadást idéz elő a spektrumban (26. ábra). Az ESR spektrumok alapján a Ni(III)-ion párosítatlan elektronja a d_{z^2} pályán helyezkedik el, amit a DFT-számítások is alátámasztottak. A Ni(III)-ion párosítatlan elektronja és az $I = 1$ spinű nitrogén atom közötti kölcsönhatás egy tripllett szuperhiperfinom felhasadást eredményez. Az így kialakuló Ni(III)-komplex szerkezete megegyezik a NiSOD enzim oxidált formájának szerkezetével, vagyis négyzetes piramisos geometria alakul ki.⁹²



26. ábra: A Ni(III)/wtNiSOD 1:1 koncentráció arányú rendszer mért (fekete) és számított (piros) CW X-sávú ESR spektruma 77 K-en mérve.⁹²

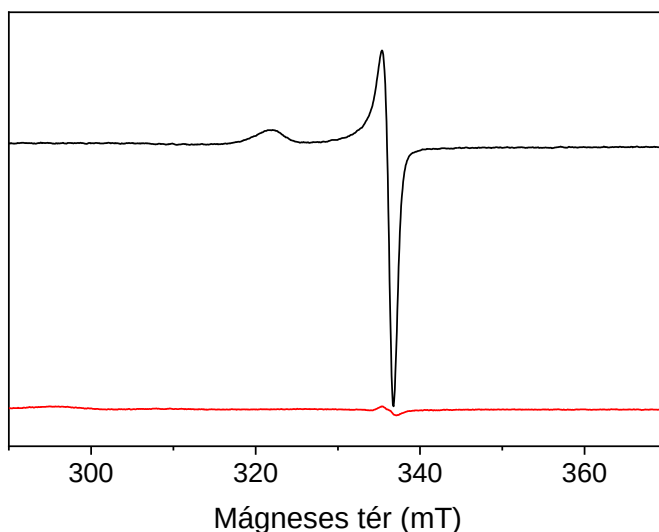
A wtNiSOD-HC és -HH esetében egyik oxidálószerrel sem sikerült értékelhető Ni(III)-spektrumokat detektálni, azonban a szabad $O_2^{\cdot-}$ jelenléte egyértelműen kimutatható a wtNiSOD-HH peptid Ni(II)-komplexét és a KO_2 -ot tartalmazó minta ESR spektrumában. A wtNiSOD-HC azonos módon készült mintájában a gyökanion jelenléte nem mutatható ki egyértelműen az ESR spektrum alapján. A következő alfejezetben a Ni(II)-komplexek SOD aktivitás vizsgálatával kapott eredményeinket tárgyalom, melyek ismeretében megmagyarázható ez a jelenség. A wtNiSOD-HH komplexe ugyanis kisebb SOD aktivitású, mint a wtNiSOD-HC modell komplexe, így a szabad $O_2^{\cdot-}$ hosszabb ideig jelen van a mintában. Annak, hogy az ESR spektrumokban nem jelentek meg a Ni(III)-komplexek több oka is lehet: a Ni(II)-komplexek

oxidációjakor nem alakulnak ki a Ni(III)-komplexek; vagy a fémion koordinációs környezete képes stabilizálni a Ni(III)-komplexet, azonban olyan kis koncentrációban van jelen, amely ESR spektroszkópia segítségével nem detektálható az általunk alkalmazott körülmények között. A reakciótermékeket ezért ESI-TOF-MS módszerrel vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy a peptidok Ni(II)-komplexei adduktumot képeznek a $O_2^{\cdot-}$ -nal. A wtNiSOD-HH azonban oxidálószer távollétében adduktumot képez a vízben oldott oxigénnel is (27. ábra/A). Az adduktum egy peroxo-Ni(II)-komplex vagy egy Ni(II)-komplex, amelyben a cisztein tiolát-csoportja oxidálódott szulfonátcsoporttá. A 27. ábrán a wtNiSOD-HH Ni(II)-komplexének tömegspektrumai kerültek összehasonlításra oxidálószer távollétében (27. ábra/ A) és jelenlétében (27. ábra/ B).



27. ábra: A Ni(II)/wtNiSOD-HH 1:1 koncentráció arányú rendszer $[NiH_{1L}]^{2-}$ komplexének ESI-TOF-MS spektrumai. A: A komplex adduktumot képez a vízben oldott oxigénnel oxidálószer távollétében. B: A komplex adduktumot képez a $O_2^{\cdot-}$ -nal KO_2 hozzáadása után. (pH = 11,5)

A wtNiSOD-CC peptid 10,0-es pH-jú Ni(II)-komplex oldatát szintén KO_2 -dal oxidáltuk. Az ESR spektrumok alapján a rendszerből jelentős mennyiségű $O_2^{\cdot-}$ fogy el, azonban Ni(III)-komplex jelentét vagy gyökképződést nem sikerült detektálni (28. ábra). Ennek több oka is lehet: az esetlegesen képződő Ni(III)-komplex túl kicsi koncentrációban van jelen, vagy rövid élettartamú; a Ni(II)-komplex és a $O_2^{\cdot-}$ közötti reakció a peptid bomlásához vezet. Ezen kívül az ESR spektrumokon a NiSOD enzim oxidált formájára jellemző szuperhiperfinom felhasadás az N-terminális hisztidin imidazol nitrogénjének koordinációjához rendelhető. A wtNiSOD-CC esetében a szekvencia első helyén lévő hisztidin egy ciszteinnel van helyettesítve, így ez a legkézenfekvőbb magyarázat arra, hogy a Ni(III)-komplex megjelenése nem mutatható ki ebben a rendszerben ESR spektroszkópia segítségével.



28. ábra: A fagyasztott KO_2 oldat CW X-sávú ESR spektruma 10-es pH-jú Ni(II)/wtNiSOD-CC komplex hozzáadása előtt (fekete) és után (piros) 77 K-en.

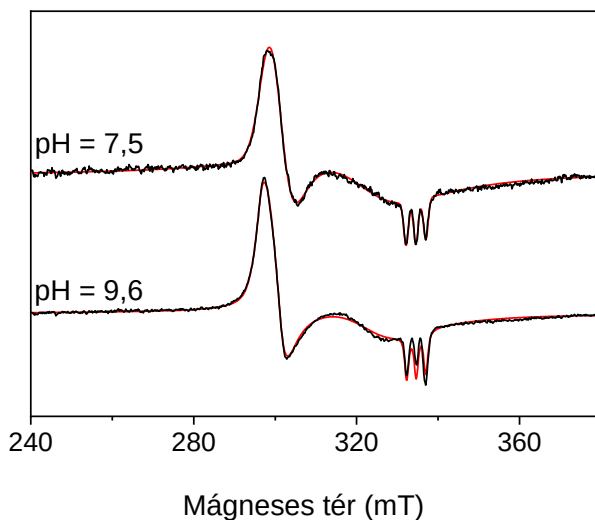
A kilenc aminosavból felépülő modellek közül a wtNiSOD-Pen, a wtNiSOD-NMe és a wtNiSOD-RC peptidek Ni(III)-komplexeiről értékelhető ESR spektrumokat rögzítettünk. Az ezen spektrumokra meghatározott ESR paraméterek a 4. táblázatban kerültek összehasonlításra a wtNiSOD megfelelő paramétereivel együtt. A táblázatban a Ni(III)-komplexekre jellemző anizotróp g értékek ($g_{x,y,z}$), az axiális helyzetű hisztidin imidazol nitrogénjének csatolási állandója (a_z^N), valamint az ESR vonalszélesség leírásához szükséges relaxációs paraméterek (ω_x , ω_y , ω_z) szerepelnek. A wtNiSOD-dim peptid Ni(III)-komplexeiről szintén készültek ESR spektrumok, azonban azok összetettsége miatt ezek értelmezését a kilenc tagszámú modellek tárgyalása után mutatom be.

4. táblázat: A wtNiSOD, wtNiSOD-Pen, wtNiSOD-NMe és wtNiSOD-RC peptidek Ni(III)-komplexeire meghatározott ESR paraméterek.

	g_x	g_y	g_z	a_z^N	ω_x	ω_y	ω_z
wtNiSOD ^a	2,289	2,220	2,012	23,7			
wtNiSOD-Pen; pH = 7,5	2,257	2,251	2,013	22,1	19,8	22,4	4,9
wtNiSOD-Pen; pH = 9,6	2,247	2,241	2,014	23,7	18,9	35,7	5,2
wtNiSOD-NMe	2,277	2,231	2,012	25,5	39	32	6
wtNiSOD-RC	2,002	2,002	2,105	7	7	34	
wtNiSOD-RC + imidazol	2,213	2,185	2,035	20	24	27	4,5

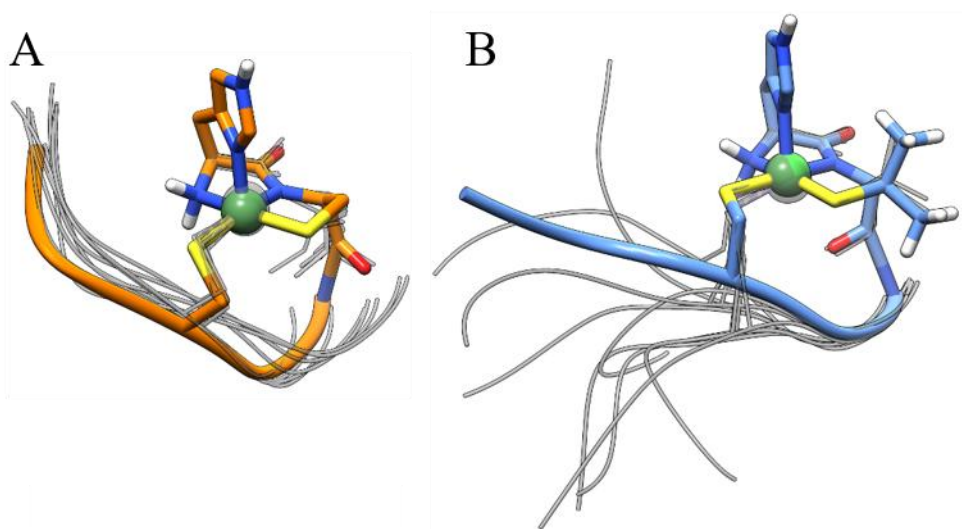
^a Az adatok a ⁹² hivatkozásból származnak.

A wtNiSOD-Pen Ni(II)-komplexét KO₂-dal oxidáltuk fiziológiás és lúgos pH-n. Ekkor az ESR spektrumban megjelenik az imidazol nitrogén axiális koordinációjára jellemző superhiperfinom felhasadás (29. ábra), bár az ESR paraméterei eltérnek a wtNiSOD Ni(III)-komplexétől. Ennek az eltérésnek az oka a metil szubsztituensek elektronküldő jellegéből fakad, ugyanis befolyásolja az *in situ* képződő Ni(III)-ionon lokalizálódó spinsűrűséget.



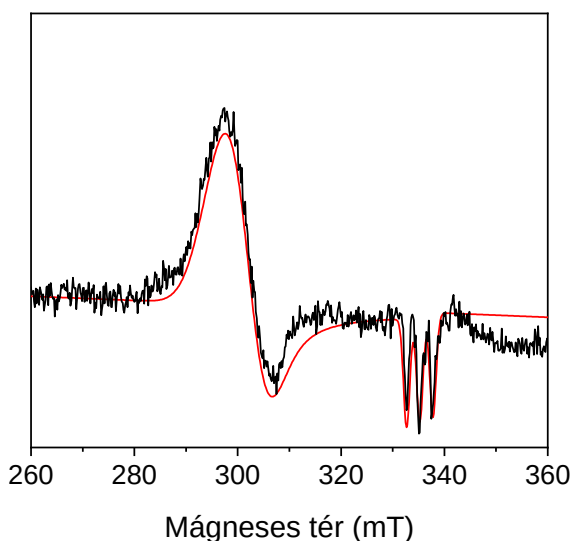
29. ábra: A Ni(III)/wtNiSOD-Pen 1:1 koncentráció arányú rendszer mért (fekete) és számított (piros) CW X-sávú ESR spektruma 77 K-en, 7,5-es és 9,6-es pH-n mérve.

A wtNiSOD-Pen peptid Ni(II)-komplexéhez hasonlóan a Ni(III)-komplexről is készültek MD és DFT számítások, valamint ezzel párhuzamosan a wtNiSOD modell Ni(III)-komplexéről is. Ni(III)-komplexek ESR paramétereinek számítására vonatkozóan viszonylag kevés adat áll rendelkezésre a szakirodalomban. Emiatt négy síknégyzetes és négy oktaédes elrendeződésű Ni(III)-komplex esetén DFT számításokat végeztünk arra vonatkozóan, hogy milyen funkcionál és báziskészlet alkalmazásával van lehetőség nagy pontossággal számítani az egyes komplexek ESR paramétereit. Az MD számítások stabil négyzetes piramisos szerkezetet mutattak, valamint, hogy a penicillamint tartalmazó modell Ni(III)-komplexe jóval flexibilisebb, mint a wtNiSOD alapvegyület Ni(III)-komplexe. Ezt a 30. ábra is alátámasztja, melyen az MD számítások során 200 ns alatt megjelenő leggyakoribb konformációs izomerek szerkezete látható a két Ni(III)-komplexre vonatkozóan. A kísérleti és számított spin-Hamilton paraméterek alátámasztják, hogy az α -hélix feltekeredés a Ni(III)-komplexekben is megmarad. A DFT számítások alapján továbbá valószínűsíthető, hogy a Ni(II)-komplex egy elektronos oxidációs reakciója nem indukál gyors konformációváltozásokat, valamint megerősítette, hogy a Ni(III)-ion körüli koordinációs környezet négyzetes piramisos geometriájú. A Ni(II)-komplexszel ellentétben az oxidált formában a fémion és hisztidin imidazol nitrogénjének axiális kölcsönhatása erős, a kötéshosszak a wtNiSOD és wtNiSOD-Pen Ni(III)-komplexeiben közel azonosak (2,073 és 2,075 Å).



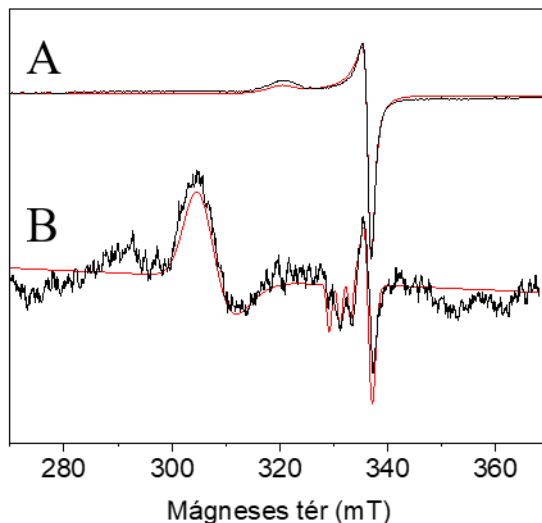
30. ábra: Az MD számítások során 200 ns alatt megjelenő konformációs izomerek szerkezete az A: Ni(III)/wtNiSOD és B: Ni(III)/wtNiSOD-Pen komplexek esetében

A wtNiSOD-NMe Ni(II)-komplexének oxidálásakor az ESR spektrumban megjelent az imidazol nitrogén axiális koordinációjára jellemző triplett, amivel igazoltuk a Ni(III)-komplex jelenlétét (31. ábra). A wtNiSOD Ni(III)-komplexére kapott g értékekhez képest azonban kis mértékű eltérések tapasztalhatók, mely a metilcsoport elektrosztatikus sajátosságával magyarázható azáltal, hogy befolyásolja az *in situ* képződő Ni(III)-ionon lokalizálódó spinsűrűséget.



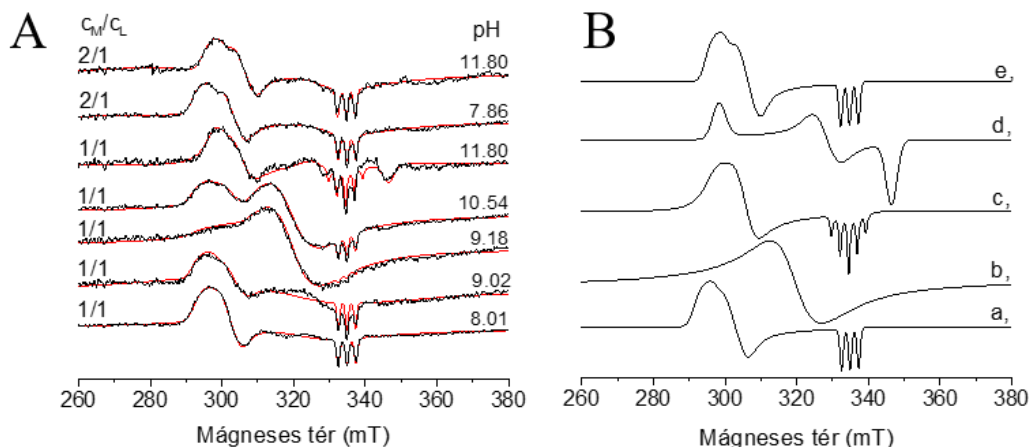
31. ábra: A Ni(III)/wtNiSOD-NMe 1:1 koncentráció arányú rendszer mért (fekete) és számított (piros) CW X-sávú ESR spektruma 77 K-en.

A wtNiSOD-RC Ni(II)-komplexének oxidálásakor nem sikerült Ni(III)-komplex jelenlétét detektálni abban az esetben, ha csak a Ni(II)-komplex és a KO_2 van jelen rendszerben (32. ábra/A). Ezért imidazol segédligandum jelenlétében is elvégeztük az oxidációt, mely esetben kis mértékű változás figyelhető meg az ESR spektrumban (32. ábra/B). Azonban a wtNiSOD-CC peptidhez hasonlóan ebben a rendszerben is kimutatható a $\text{O}_2^{\cdot -}$ koncentrációjának csökkenése.



32. ábra: A Ni(III)/wtNiSOD-RC 1:1 koncentráció arányú rendszer mért (fekete) és számított (piros) CW X-sávú ESR spektrumai imidazol hozzáadása A: előtt és B: után 77 K-en.

A wtNiSOD-dim Ni(II)-komplexeinek oxidálása során az eddigiekhez képest jóval összetettebb ESR spektrumokat kaptunk. Általánosságban elmondható, hogy a képződő Ni(III)-komplekek szerkezete nagy mértékben függ a fémion és a ligandum koncentrációinak arányától és a pH-tól (33. ábra/A). Abban a rendszerben, ahol mindkét nikkelt kötés hely telített (2:1 fémion : ligandum koncentráció arány) a NiSOD enzim oxidált formájára jellemző ESR spektrumot kapjuk (33. ábra/A). Fiziológiás pH-n a Ni(II)-komplexben a két fémion azonos (NH_2 , N^- , S^- , S^-) koordinációs móddal rendelkezik, így az ESR spektrum alapján azt feltételezzük, hogy ezen komplex oxidálásakor mindkét fémion +3-as oxidációs állapotba kerül. A Ni(III)-ionok d_{z^2} pályáján lévő párosítatlan elektronjai és az imidazol nitrogének között kialakuló kölcsönhatás eredményezi az ESR spektrumon megjelenő szuperhiperfinom felhasadást. A meghatározott ESR paraméterek jó egyezésben vannak a wtNiSOD Ni(III)-komplexével. Ezek alapján feltételezhető, hogy a wtNiSOD-dim peptidben a két nikkelt kötés motívum független fémkötő helyként működik és mindkét fémcentrum képes elősegíteni a $\text{O}_2^{\cdot-}$ -ok bomlását. Ezen kívül gyenge dipól-dipól kölcsönhatás is feltételezhető a két Ni(III)-centrum között. Azokban a rendszerekben, ahol a fémion és ligandum ekvimoláris koncentrációban van jelen, az ESR spektrumok több komponens összegeként írhatók le. Ezen komponensek szimulált, egyedi ESR spektrumait a 33. ábra B részén láthatjuk.



33. ábra: A: A wtNiSOD-dim Ni(III)-komplexének mért (fekete) és szimulált (piros) ESR spektrumai különböző fémion : ligandum arány és pH esetén. B: A Ni(III) : wtNiSOD-dim 1:1 koncentráció arányú rendszerének egyedi szimulált ESR spektrumai.

Fiziológiás pH-n 1:1 fémion : ligandum koncentráció arány esetében az oxidáció hasonló Ni(III)-komplexekeket eredményez (33. ábra/B: a, spektrum), mint ami a 2:1 aránynál látható (33. ábra/B: e, spektrum). A pH növelésével a koordinációs szféra átrendeződése tapasztalható. Ezt a hatást egyértelműen alátámasztja a 9,18-os pH-n felvett spektrum, ahol a kiszélesedett ESR jel a két paramágneses fémion közötti antiferromágneses csatoláshoz köthető (33. ábra/B: b, spektrum). A c, jelzésű spektrumon látható szuperhiperfinom felhasadás akkor jelenik meg, ha mindkét imidazol nitrogén axiális pozícióban koordinálódik a Ni(III)-centrumhoz. A d, spektrum esetén az oxidáció eredményeképpen a párosítatlan elektron a $d_{x^2-y^2}$ pályán helyezkedik el és a donorcsoportok koordinációja erős π -viszontkoordinációt eredményez. Ez a koordinációs mód feltételezhető abban az esetben, ha a tiolát-csoportok és az amid nitrogén egy megnyúlt oktaéderes kristálytérben koordinálódik a Ni(III)-ionhoz.^{161, 162} A 33. ábra A részén látható spektrumok illesztéséből nyert ESR paraméterek az 5. táblázatban szerepelnek.

5. táblázat: A Ni(II)/wtNiSOD-dim 2:1 és 1:1 koncentráció arányú, különböző pH-jú rendszereinek oxidálásával nyert ESR spektrumok meghatározott ESR paraméterei.

$\frac{C_M}{C_L}$	pH	Izomerek	g_x	g_y	g_z	$a^N_{x,y}/G$	a^N_z/G	Komponens arány (%)
2/1	11,80	e,	2,266	2,199	2,014	20,3	24,8	100
2/1	7,86	a,	2,287	2,219	2,011	19,9	24,8	100
1/1	11,8	c,	2,264	2,205	2,015	14,3	24	67
		d,	2,259	2,053	1,945			33
1/1	10,54	a,	2,289	2,224	2,012	21,0	23,8	50
		b, ^a	2,103					50
1/1	9,18	a,	2,289	2,224	2,012	21,0	23,8	10
		b, ^a	2,103					90
1/1	9,02	a,	2,286	2,220	2,012	21,3	23,8	100
1/1	8,01	a,	2,284	2,226	2,012	18,9	24,7	100

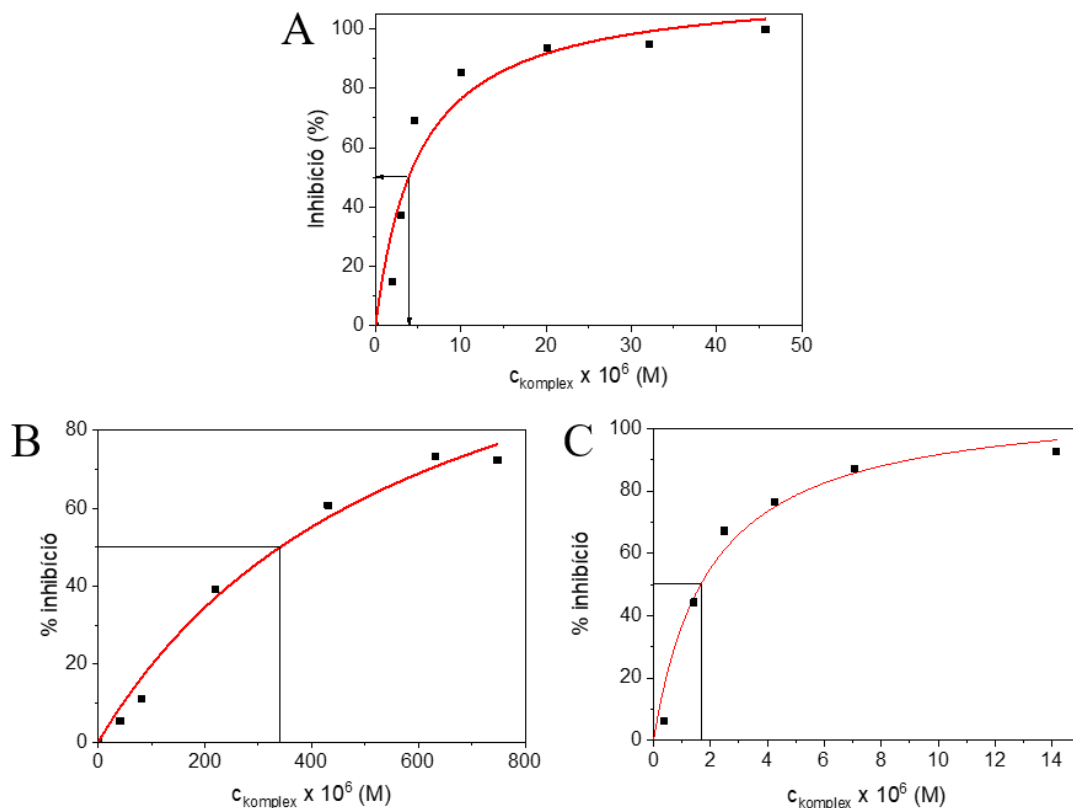
^a A b, komponens izotóp g -tenzorral kezeltük.

4.3. A peptidek Ni(II)-komplexeinek SOD aktivitás vizsgálata

A Ni(II)-komplexek SOD aktivitását kétféle módszerrel határoztuk meg: a széleskörben alkalmazott McCord-Fridovich módszerrel és az általunk fejlesztett szekvenciális *stopped-flow* technikán alapuló módszerrel. Az általunk vizsgált peptidek kis mennyiségben álltak rendelkezésünkre, így nem minden esetben sikerült párhuzamosan vizsgálnunk mindkét módszerrel a SOD aktivitást.

4.3.1. A peptidek SOD aktivitás vizsgálata a McCord-Fridovich módszerrel

A Ni(II)-komplexek szerkezete fiziológiás pH-n jelentősen eltér, nem minden esetben a NiSOD enzim redukált formájára jellemző koordinációs móddal rendelkeznek ilyen körülmények között. Ez a McCord-Fridovich féle módszerrel meghatározott IC_{50} értékekben is különbségeket okoz. A kapott inhibíciós görbék közül néhányat a 34. ábrán mutatok be.



34. ábra: A McCord-Fridovich módszerrel meghatározott inhibíciós görbék a komplex koncentrációk függvényében az A: wtNiSOD, B: wtNiSOD-HH és C: wtNiSOD-RC modellek esetében. A pontok a kísérletileg meghatározott inhibíciót, míg a folytonos vonalak az inhibíció értékek illesztéséből kapott adatsort jelölik.

A meghatározott IC_{50} értékek és a belőlük származtatható, a festékmolekula koncentrációjától független, katalízisre jellemző sebességi állandó értékek a 6. táblázatban találhatók. A Ni(II)-komplekek koncentrációja széles skálán változik, ezért minden koncentráció esetében újraszámoltuk a koncentráció eloszlásokat, hogy meggyőződjünk róla, adott körülmények között a komplexek nem disszociálnak és a szabad Ni(II)-ionok vagy a peptidek nem befolyásolják a SOD aktivitás vizsgálatokat.

6. táblázat: A peptidek Ni(II)-komplexeinek IC_{50} értékei és a katalízisre jellemző sebességi állandó értékek pH = 7,8-en.

	IC_{50} érték (μM)	k_{McCF} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ^a
wtNiSOD	$3,9 \pm 0,2$	$6,9 \times 10^5$
wtNiSOD-HC	$37,4 \pm 0,3$	$7,2 \times 10^4$
wtNiSOD-HH	341 ± 5	$7,9 \times 10^3$
wtNiSOD-CC	7 ± 2	$3,8 \times 10^5$
wtNiSOD-NMe	$6,3 \pm 0,8$	$4,6 \times 10^5$
wtNiSOD-RC	$1,7 \pm 0,5$	$1,6 \times 10^6$

^a $k_{\text{McCF}} = k_{\text{NBT}} \times [\text{NBT}] / IC_{50}$, ahol $k_{\text{NBT}} = 59400 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

A wtNiSOD-HC és -HH esetében a SOD aktivitás jelentősen romlott a cisztein - hisztidin cserével. Ez a hatás főként a wtNiSOD-HH modellnél figyelhető meg, ahol az IC_{50} érték két nagyságrenddel nőtt a wtNiSOD peptidhez képest. Ez összhangban van a korábbi megállapításunkkal, hogy a hatodik helyen lévő cisztein befolyásolja a Ni(II)/Ni(III) pár redoxi tulajdonságait. A wtNiSOD-HC esetében is egy nagyságrendű növekedés tapasztalható az IC_{50} értékben. Ezen kívül a Ni(II)-komplexeik KO_2 -dal való oxidáció eredményei szintén összhangban vannak a kapott IC_{50} értékekkel, bár az ESR spektrumok nem mutatták ki a Ni(III)-részecskék jelenlétét: az ESR spektrumokban a wtNiSOD-HH modell esetén a mintákban a $\text{O}_2^{\cdot-}$ -hoz tartozó jelet detektáltunk, míg a wtNiSOD-HC esetén nem. Ezt magyarázhatja a nagyobb IC_{50} érték: a wtNiSOD-HH modell kisebb mértékben képes katalizálni a gyökion bomlását, így az oxidálószer hozzáadása után hosszabb ideig detektálható a mintában, mint a wtNiSOD-HC modell azonos összetételű mintájában. Látható azonban, hogy mindkét komplex képes katalizálni a $\text{O}_2^{\cdot-}$ bomlását.

A wtNiSOD-CC és -NMe Ni(II)-komplexei esetében ez a SOD aktivitásbeli csökkenés sokkal kisebb mértékű, a wtNiSOD komplexével azonos nagyságrendű IC_{50} értékkel rendelkeznek. A wtNiSOD-RC modell azonban jobb SOD aktivitás mutat ezzel a módszerrel, mint a wtNiSOD. Ennek egyik lehetséges magyarázata a pozitív töltésű arginin oldallánc jelenléte lehet, mely nagyobb affinitást mutathat a negatív töltésű $\text{O}_2^{\cdot-}$ iránt és irányító csoportként gyorsíthatja a fémcentrum és a gyökion között létrejövő kötés kialakulását.

4.3.2. A szekvenciális stopped-flow technikán alapuló SOD aktivitás mérési módszer fejlesztése

A McCord-Fridovich féle SOD aktivitás mérési módszernek számos hátránya van. Habár a $\text{O}_2^{\cdot-}$ előállításához szükséges xantin-oxidáz kereskedelmi forgalomban kapható, azonban változó

enzimaktivitása miatt nehezen reprodukálhatók a mérési eredmények. Továbbá ez egy közvetett mérési módszernek tekinthető, mivel nem közvetlenül a $O_2^{\cdot-}$ koncentrációváltozását detektáljuk. Ezen kívül csak szemikvantitatív mérést tesz lehetővé, a dizmutálási reakció mechanizmusáról nem szolgáltat információt.

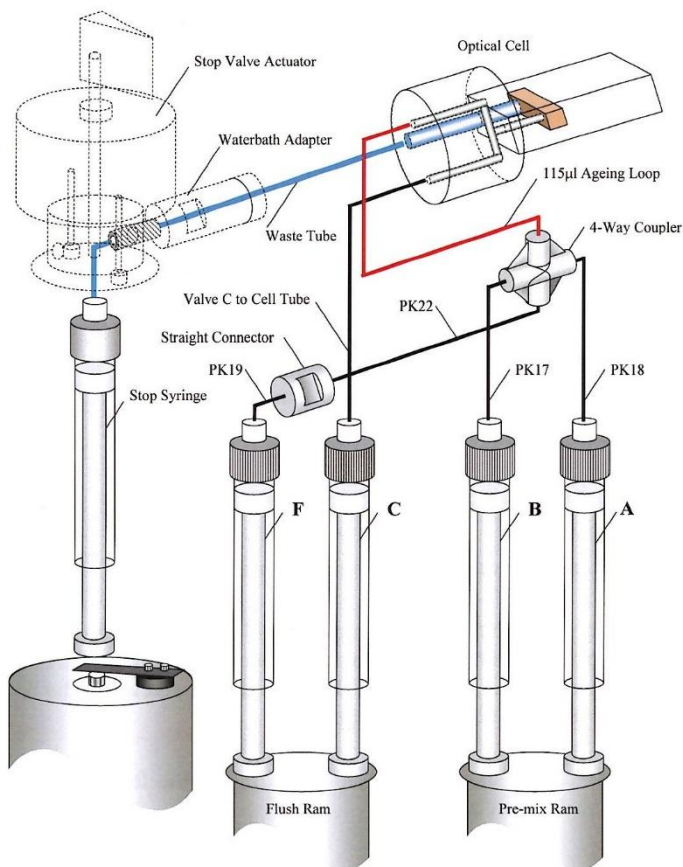
Munkánk során célul tűztük ki egy új SOD aktivitás mérési módszer kifejlesztését. Fiziológias pH-n a dizmutálási reakció gyorsan játszódik le, ezért ehhez a gyorskinetikai mérésekre alkalmas *stopped-flow* készüléket használtuk. Meg kell említeni, hogy a *stopped-flow* készülékre jellemző egy holtidő, amin belül nem lehetséges a tanulmányozott reakció időbeli követése. Az általunk használt készülék esetében a holtidő 1,5 milliszekundum, ami a vizsgált Ni(II)-komplexek SOD aktivitás mérését még lehetővé teszi amennyiben a kiértékelés során figyelembe vesszük, hogy a reakció részben a holtidő alatt játszódik le. A $O_2^{\cdot-}$ oldat előállítására a kálium-szuperoxid (KO_2) egy széles körben elterjedt vegyszer, ami nagy tisztaságban beszerezhető. A KO_2 -ból stabil vizes oldat nem készíthető, mert a vízzel reakcióba lépve elbomlik, dimetil-szulfoxidban (DMSO) azonban jól oldódik, és az oldhatósága 18-koronaéter hozzáadásával tovább növelhető. A 18-koronaéter nem lép reakcióba az oldószerkeleggyel és a Ni(II)-komplexekkel sem, egyedül a KO_2 oldódását segíti elő. Az így előállított elegy 260 nm-en abszorbancia maximumot mutat, ami a $O_2^{\cdot-}$ -hoz rendelhető. A módszerfejlesztés során megállapítottuk, hogy a szilárd KO_2 hozzáadása után a 18-koronaétert tartalmazó DMSO-ban kb. egy óra kevertetés után érhető el az optimális $(7 - 10) \times 10^{-4}$ mol/dm³-es $O_2^{\cdot-}$ koncentráció. Ezt követően 0,2 µm-es fecskendőszűrőn való szűréssel távolítottuk el a szilárd KO_2 maradékot. Az oldatokat általában steril, egyszerhasználatos műanyag fecskendővel juttatjuk be a *stopped-flow* készülék termosztált terében elhelyezkedő meghajtó fecskendőbe, azonban a KO_2 DMSO-s oldata esetében üvegfecskendőt alkalmaztunk az esetleges nem kívánatos oxidációs melléreakciók elkerülése érdekében.

A SOD aktivitás meghatározása fiziológias pH-n releváns, ezért a vizsgálatokat 7,6-es pH-jú HEPES puffer jelenlétében 1:1 térfogatarányú víz : DMSO oldószerkeleggyben végeztük. A Ni(II)-komplexek vizes oldatát a KO_2 DMSO-s oldatával keverve nem várt zavaró hatást tapasztaltunk az abszorbanciamérés során. Ez azzal magyarázható, hogy a víz és a DMSO elegyedése nem pillanatszerű, ami fényszórást okoz az oldatok elegyítését követően. Igazoltuk, hogy ez a zavaró hatás 40 másodperc alatt megszűnik. A probléma kiküszöbölésére szekvenciális módban használtuk a *stopped-flow* készüléket. A készülék sematikus rajza a 35. ábrán látható. Mérés előtt

a fecskendők a következő oldatokkal vannak feltöltve: A: KO_2 DMSO-s oldata; B: víz; C: a Ni(II)-komplex 1 : 1 víz : DMSO oldószerkeletben oldva, F: 1 : 1 víz : DMSO oldószerkelet.

A mérés első lépésében az A és B fecskendőkből a jobboldali meghajtó (*pre-mix ram*) által kinyomott KO_2 -ot tartalmazó DMSO és víz elegyítésére kerül sor 1:1 térfogatarányban a négyágú keverőben (*4-way coupler*). Ezzel az eleggyel töltődik fel az inkubátor-cső (*aging loop*). 40 másodperccel később a jobboldali meghajtó (*flush ram*) lép működésbe és a mosóoldattal (F fecskendő) az inkubátor-csőből kinyomott elegy közvetlenül az optikai cella előtt keveredik a Ni(II)-komplex oldatával (C fecskendő), és a katalitikus dizmutálási reakció elindul. A folyamatot 260 nm-en fotometriás módszerrel követjük. Az adatok kiértékeléséhez a $\text{O}_2^{\cdot -}$ kezdeti koncentrációját a dizmutálási reakció tanulmányozása előtt az előzőekben felvázolt kísérleti sémát alkalmazva határozzuk meg. Ekkor a C fecskendőt nem a Ni(II)-komplext tartalmazó eleggyel, hanem 1:1 térfogatarányú víz : DMSO oldószerkelettel töltöttük fel. A számításokhoz a $\text{O}_2^{\cdot -}$ 260 nm-en ismert moláris abszorpciós koefficiensét ($2686 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)¹⁶³ használtuk fel. 260 nm-en a peptidek Ni(II)-komplexeinek moláris abszorbanciája nagy ($\sim 13\,000 - 18\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ezért az általunk alkalmazott μM -os koncentráció tartományban is van hozzájárulásuk a mért abszorbanciához. A reakcióelegyek viszonylag jelentős abszorbanciája ($> 2,5$) miatt a mérésekhez 2,000 mm optikai úthosszat használtunk.

Az itt leírt módszerrel viszonylag nagy szuperoxid gyökanion koncentrációt tudunk elérni és, ellentétben a McCord-Fridovich féle módszerrel, közvetlenül a $\text{O}_2^{\cdot -}$ koncentrációváltozását követve valódi katalitikus körülmények között tanulmányozhatjuk a dizmutálási folyamatot. Emellett a kapott kinetikai görbék elemzése fontos információkkal szolgál a reakció mechanizmusáról.



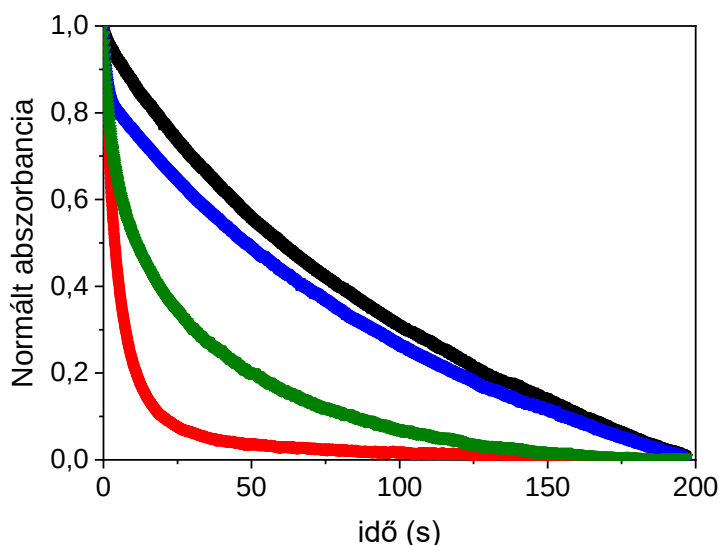
35. ábra: A szekvenciális stopped-flow készülék sematikus rajza¹⁶⁴

4.3.3. A Ni(II)-komplexek SOD aktivitásának vizsgálata stopped-flow technikával

Az előző részben felvázolt vizsgálati módszerrel lehetőségünk van a dizmutálási reakció részletes tanulmányozására. A méréseket különböző Ni(II)-komplex koncentrációk mellett végezzük el, a kinetikai görbék rendszerint három párhuzamos mérés átlagolásából származnak.

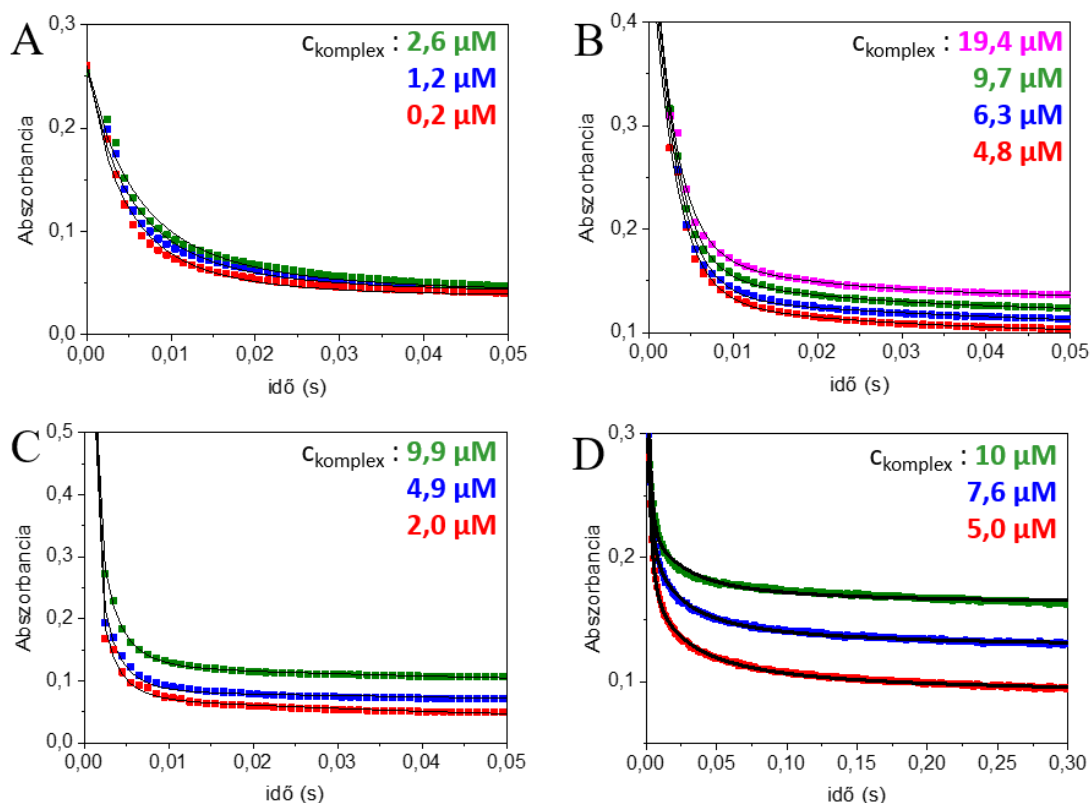
A wtNiSOD-HC és -HH peptidek esetén az IC_{50} értékek drasztikus növekedése miatt nem alkottuk meg a dizmutálási reakció részletes kinetikai modelljét. A 36. ábrán a wtNiSOD, a wtNiSOD-HC és a wtNiSOD-HH Ni(II)-komplexeinek hatását hasonlítjuk össze a $O_2^{\cdot -}$ bomlásában. A könnyebb összehasonlíthatóság érdekében normált abszorbanciák szerepelnek a kinetikai görbéken, így a komplexek eltérő fényelnyelési tulajdonságai kiküszöbölhetők. A kinetikai görbék lefutása alapján látható, hogy a wtNiSOD-HH csak kis mértékben képes gyorsítani a $O_2^{\cdot -}$ spontán bomlását,

azonban a wtNiSOD-HC esetében is lassabb a reakció, mint a wtNiSOD komplex jelenlétében. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy mindkét cisztein jelenléte szükséges a $O_2^{\cdot-}$ hatékony lebontásához.



36. ábra: A $O_2^{\cdot-}$ bomlására jellemző kinetikai görbék Ni(II)-komplexek jelenlétében és távollétében (1:1 térfogatarányú víz/DMSO oldószerkeverékben; pH = 7,6). Fekete: a $O_2^{\cdot-}$ spontán bomlása; kék: wtNiSOD-HH; zöld: wtNiSOD-HC; piros: wtNiSOD. ($c(O_2^{\cdot-}) = 460 \mu M$; $c_{wtNiSOD} = 9,8 \mu M$; $c_{wtNiSOD-HC} = 27,3 \mu M$; $c_{wtNiSOD-HH} = 78 \mu M$; $\lambda = 260 \text{ nm}$; $l = 2,00 \text{ mm}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)

A wtNiSOD, a wtNiSOD-Pen, a wtNiSOD-CC és a wtNiSOD-dim peptidek nikkell-komplexei esetében már részletesen meghatároztuk a dizmutálási ciklus kinetikáját. A komplexek által katalizált bomlás tanulmányozása előtt minden esetben vizsgáltuk a $O_2^{\cdot-}$ spontán bomlását a komplexek távollétében. Az így kapott kinetikai görbék egyszerű másodrendű kinetikát mutatnak. A katalizált bomlás tanulmányozásakor a kinetikai görbéket minden esetben különböző komplex koncentrációk alkalmazásával, nagy $O_2^{\cdot-}$ koncentráció felesleg mellett vettük fel, ezáltal biztosítva a katalitikus körülményeket. Az így kapott kinetikai görbéket a 37. ábrán láthatjuk kiegészítve az adott színekhez tartozó komplex koncentrációkkal.

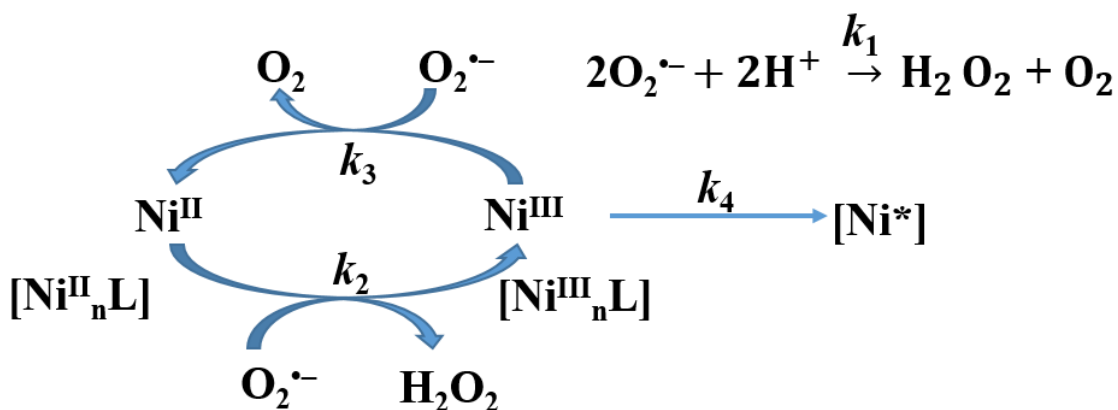


37. ábra: A Ni(II)/peptid komplexek és a $O_2^{\cdot-}$ között lejátszódó reakciók kinetikai görbéi az A: wtNiSOD, B: wtNiSOD-Pen, C: wtNiSOD-CC, D: wtNiSOD-dim peptid komplexei esetén. A pontok a mért, a folytonos vonalak az illesztett adatsorból származnak.

($c(O_2^{\cdot-}) = (9 - 16) \times 10^{-4} \text{ M}$; $\lambda = 260 \text{ nm}$; $l = 2,00 \text{ mm}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)

A kinetikai görbéken minden komplex esetében gyors bomlás figyelhető meg az első 30 ms-ban. Az első detektál pontban (2 ms-nál) már jelentős abszorbania csökkenést tapasztaltunk a komponensek moláris abszorpciós koefficiensei felhasználásával számolt fényelnyeléshez képest. Ebből arra következtethetünk, hogy a dizmutálási reakció jelentős része a készülék holtideje alatt (kb. 1,5 ms) lejátszódik. A $O_2^{\cdot-}$ spontán bomlása ettől lényegesen hosszabb időskálán játszódik le, ezek alapján az általunk vizsgált komplexek jelentős SOD aktivitást mutatnak. Korábbi feltételezések alapján, ha csak a dizmutálási ciklus játszódik le a Ni(II)- és Ni(III)-komplexek bizonyos idő után *steady state* koncentrációban vannak jelen és a kinetikai görbék egyszerű elsőrendű reakciót feltételezve illeszthetők. Ezzel a feltételezéssel nincsenek összhangban a kinetikai görbék, a mért abszorbanciák 50 ms-nál jóval nagyobbak a vártnál és egy viszonylag lassú folyamatban folyamatosan csökkennek. Összességében a kinetikai görbék nem illeszthetők

egyszerű elsőrendű kinetikai összefüggés alapján. A kinetikai modell megalkotásakor ezért a dizmutálási ciklushoz tartozó folyamatokon kívül egy további reakciót is figyelembe vettünk, amelyben egy az összetételében és szerkezetében ismeretlen, katalitikusan inaktív nikkkel-vegyület képződik. Az így feltételezett kinetikai modell a 38. ábrán látható. A Ni(II)-komplexek az oxidálószer távollétében stabilak, így a Ni*-gal jelölt forma képződését a Ni(III)-komplexek átalakulásához rendeljük.



38. ábra: A dizmutálási ciklus feltételezett mechanizmusa. Az $n = 1$ a wtNiSOD, wtNiSOD-Pen és wtNiSOD-CC peptidek, és $n = 2$ a wtNiSOD-dim peptid nikkkelkomplexei esetén.

A modell magába foglalja a $\text{O}_2^{\bullet-}$ spontán bomlását (k_1), a Ni(II)-komplex oxidációját Ni(III)-komplexszé (k_2), a Ni(III)-komplex redukcióját Ni(II)-komplexszé (k_3) és a Ni(III)-komplex átalakulását (k_4). Ezeket a reakciókat a 4.3.3.1 - 4.3.3.4 egyenletek írják le, míg a megfelelő differenciálegyenlet-rendszert a 4.3.3.5 - 4.3.3.9 egyenletek alkotják. Az egyenletekben látható „ n ” a komplexekben található fémionok számát jelöli, tehát a wtNiSOD, wtNiSOD-Pen és wtNiSOD-CC modellekben $n = 1$, míg a wtNiSOD-dim mutáns esetében $n = 2$.



$$\frac{d[\text{O}_2^{\bullet-}]}{dt} = -k_1 \times [\text{O}_2^{\bullet-}]^2 - k_2 \times [\text{Ni}^{\text{II}}_n\text{L}][\text{O}_2^{\bullet-}] - k_3 \times [\text{Ni}^{\text{III}}_n\text{L}][\text{O}_2^{\bullet-}] \quad (4.3.3.5)$$

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = k_2 \times [\text{Ni}^{\text{II}}_n\text{L}][\text{O}_2^{\bullet-}] + k_1 \times [\text{O}_2^{\bullet-}]^2 \quad (4.3.3.6)$$

$$\frac{d[\text{Ni}^{\text{II}}_{\text{nL}}]}{dt} = -k_2 \times [\text{Ni}^{\text{II}}_{\text{nL}}][\text{O}_2^{\bullet-}] + k_3 \times [\text{Ni}^{\text{III}}_{\text{nL}}][\text{O}_2^{\bullet-}] \quad (4.3.3.7)$$

$$\frac{d[\text{Ni}^{\text{III}}_{\text{nL}}]}{dt} = k_2 \times [\text{Ni}^{\text{II}}_{\text{nL}}][\text{O}_2^{\bullet-}] - k_3 \times [\text{Ni}^{\text{III}}_{\text{nL}}][\text{O}_2^{\bullet-}] - k_4 \times [\text{Ni}^{\bullet}_{\text{nL}}] \quad (4.3.3.8)$$

$$\frac{d[\text{Ni}^{\bullet}]}{dt} = k_4 \times [\text{Ni}^{\text{III}}_{\text{nL}}] \quad (4.3.3.9)$$

A wtNiSOD-dim esetében nem tisztázott, hogy csak az egyik, vagy mindkét nikkellion vesz részt a dizmutálási reakcióban, de a 38. ábrán látható reakcióséma és az egyenletek felírásakor feltételeztük, hogy mindkét fémcentrum részt vesz a $\text{O}_2^{\bullet-}$ bontásában. Mivel a két fémcentrum lényegében azonos, feltételezhető, hogy a kinetikai és redoxi tulajdonságaik is nagyon hasonlóak. A dizmutálási reakció és az intramolekuláris redoxi-degradáció mindkét centrumon közel azonos sebességgel történhet és a sémában szereplő sebességi állandók az egyes fémcentrumokban lejátszódó analóg reakciók egyedi sebességi állandóinak összegét fejezik ki.

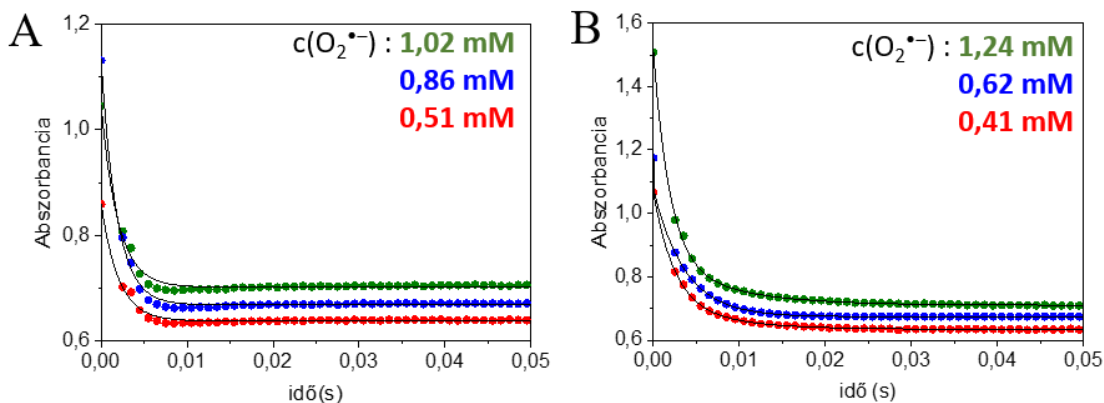
A kísérleti adatok alapján feltételezzük, hogy a $\text{Ni}^{\bullet}$ -gal jelölt komplex a Ni(III)-komplex intramolekuláris redoxi-degradációjakor képződik és katalitikus szempontból inaktív. A $\text{Ni}^{\bullet}$ komplexet a wtNiSOD-dim modell esetén tömegspektrometria segítségével vizsgáltuk annak érdekében, hogy meghatározzuk az összetételét. A tömegspektrumokkal igazoltuk, hogy mindkét nikkellion koordinációja megmaradt a részecskékben. Továbbá a tiolát-csoportok különböző oxidációs termékei jelentek meg: szulfoxid-, szulfon- és szulfonsav-származékokhoz rendelhető csúcsokat detektáltunk. Néhány NiSOD modell esetén már számoltak be hasonló oxidációs termékekről, de ezek mellett diszulfid-hidak kialakulásával di-, tri- és tetramer részecskék is képződtek.¹⁶⁵ Ezzel szemben a wtNiSOD-dim esetében nem figyelhető meg S-S kötés kialakulása. A tömegspektrum további részén olyan csúcsok jelentek meg, amelyek a tiolát-csoportok elvesztéséhez rendelhetők. Az ilyen jellegű termékek megjelenéséről szintén találhatunk szakirodalmi példákat.⁹²

A kinetikai görbék illesztéséhez definiálnunk kellett azokat a részecskéket, amelyek a detektálási hullámhosszon (260 nm-en) hozzájárulnak a fényelnyeléshez. A $\text{O}_2^{\bullet-}$ -on, valamint a Ni(II)- és Ni(III)-komplexeken kívül a $\text{Ni}^{\bullet}$ -gal jelölt komplexnek és a dizmutálási ciklusban képződő hidrogén-peroxidnak is van fényelnyelése 260 nm-en, így az abszorbanciát a fényelnyelő részecskék moláris abszorbanciáját figyelembe véve a 4.3.3.10 egyenlettel lehet megadni.

$$\text{Abs}_{260} = \varepsilon(\text{Ni}^{\text{II}}_{\text{nL}}) \times [\text{Ni}^{\text{II}}_{\text{nL}}] + \varepsilon(\text{Ni}^{\text{III}}_{\text{nL}}) \times [\text{Ni}^{\text{III}}_{\text{nL}}] + \varepsilon(\text{Ni}^*) \times [\text{Ni}^*] + \varepsilon(\text{O}_2^{\bullet-}) \times [\text{O}_2^{\bullet-}] + \varepsilon(\text{H}_2\text{O}_2) \times [\text{H}_2\text{O}_2] \quad (4.3.3.10)$$

A kísérleti adatok kiértékelésénél a kinetikai görbéket a 4.3.3.5 – 4.3.3.9 differenciál egyenletrendszer és a 4.3.3.10 egyenlet alapján illesztettük a nemlineáris legkisebb négyzetek módszerét alkalmazva. A k_1 sebességi állandót, valamint a Ni(II)-komplexek, a $\text{O}_2^{\bullet-}$ és a H_2O_2 részecskék moláris abszorbanciáit független kísérletekben határoztuk meg és rögzített értékkel vettük figyelembe. Az illesztés során igazoltuk, hogy a wtNiSOD-Pen és a wtNiSOD-dim modellek esetében a k_2 és k_3 egyidejű illesztése nem megvalósítható meg a paraméterek közötti erős korreláció miatt. Ezekben a rendszerekben akkor értük el a legjobb illesztést, ha ezen értékek valamelyikét kellően nagy értéken rögzítettük. A kapott kinetikai görbék végső illesztésekor ezért a k_2 -t rögzítettük: a wtNiSOD-Pen esetén $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ értéken, míg a wtNiSOD-dim modellnél $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ értéken. Ezen küszöbértékek alatt irreális eredményeket kaptunk a nem rögzített paraméterekre. A wtNiSOD alapvegyület és a wtNiSOD-CC esetében a kinetikai görbék leírásakor a k_2 és k_3 egyidejű illesztésére lehetőség van. A különböző Ni(II)-komplex koncentrációkhoz tartozó kinetikai görbék illesztésével kapott paraméterek hibája 10%-on belül van minden modellrendszerben, megerősítve ezáltal a kinetikai modell helyességét.

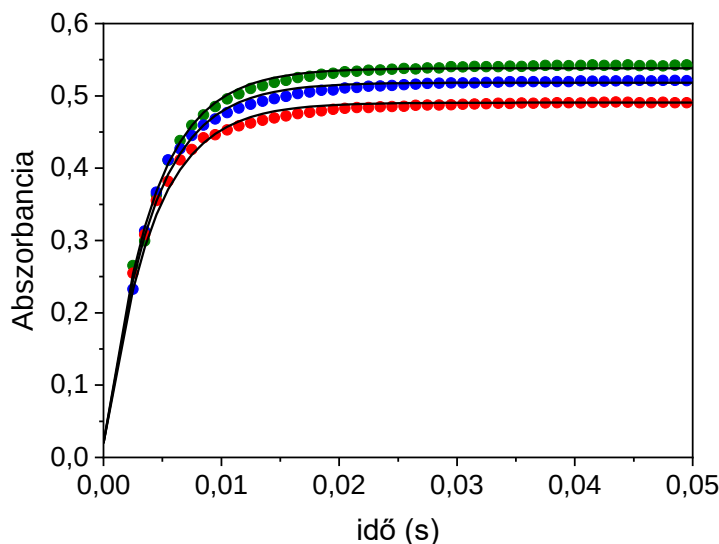
A Ni(III)-komplex intramolekuláris redoxi-degradációja jelentősen befolyásolja a dizmutálási ciklust, ezért a wtNiSOD és wtNiSOD-Pen rendszerek esetében vizsgáltuk a dizmutálási reakciót kis $\text{O}_2^{\bullet-}$ felesleg mellett 260 nm-en. Ilyen reakciókörülmények között a pseudoelsőrendű megközelítés nem alkalmazható a 4.3.3.2. és 4.3.3.3. reakciókra. Ezzel a módszerrel kívántuk igazolni, hogy a 38. ábrán látható reakciósema nem katalitikus körülmények között is leírja a dizmutálási reakció mechanizmusát. A Ni(II)-komplexek koncentrációját állandó értéken tartottuk, míg a $\text{O}_2^{\bullet-}$ koncentrációja 2 - 6 ekvivalens mennyiségű volt. Az így kapott kinetikai görbék a 39. ábrán láthatóak.



39. ábra: Kinetikai görbék másodrendű koncentráció körülmények között az A: wtNiSOD és B: wtNiSOD-Pen rendszerek esetén. A pontok a mért, míg a folytonos vonalak az illesztett görbéket jelölik. ($c_{\text{Ni(II)}} = 0,20 \text{ mM}$; $\lambda = 260 \text{ nm}$; $l = 2,00 \text{ mm}$; $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

Hasonló megfontolások alapján a wtNiSOD-Pen esetén 376 nm-en is tanulmányoztuk a dizmutálási reakciót kis $\text{O}_2^{\bullet-}$ felesleg alkalmazásával. Ezen a hullámhosszon kizárólag a nikkel-komplexek átalakulását tanulmányozhatjuk, ugyanis a szuperoxid gyökanionnak és a H_2O_2 -nak nincsen elnyelése. Ez alapján a mért abszorbanciát a 4.3.3.11 egyenlet definiálja, melyben kizárólag a nikkel-komplexek moláris abszorpciós koefficiensei és koncentrációi szerepelnek. Az így kapott kinetikai görbék a 40. ábrán láthatók.

$$\text{Abs}_{376} = \varepsilon(\text{Ni}^{\text{II}}_{\text{nL}}) \times [\text{Ni}^{\text{II}}_{\text{nL}}] + \varepsilon(\text{Ni}^{\text{III}}_{\text{nL}}) \times [\text{Ni}^{\text{III}}_{\text{nL}}] + \varepsilon(\text{Ni}^*) \times [\text{Ni}^*] \quad (4.3.3.11)$$



40. ábra: A Ni(II)/wtNiSOD-Pen és a $O_2^{\bullet -}$ között lejátszódó reakció kinetikai görbéi változó $O_2^{\bullet -}$ koncentráció mellett. A pontok a mért, míg a folytonos vonalak az illesztett görbéket jelölik.
($C_{Ni(II)} = 0,21 \text{ mM}$; $c(O_2^{\bullet -})$: 1,30 mM (zöld), 0,88 mM (kék), 0,43 mM (piros); $\lambda = 376 \text{ nm}$;
 $l = 2,00 \text{ mm}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)

A 260 és 376 nm-en ilyen módon felvett kinetikai görbék segítségével meghatároztuk a wtNiSOD-Pen esetében a Ni(III)-komplex bomlására jellemző sebességi együttható értékét ($k_4 = 292 \pm 2 \text{ s}^{-1}$), valamint 260 nm-en a Ni(III)-komplex és Ni^* részecske moláris abszorbanciáit. A két különböző hullámhosszon meghatározott, a Ni^* képződését jellemző sebességi együtthatók kiváló egyezésben voltak egymással, ami alátámasztja a kinetikai modell helyességét.

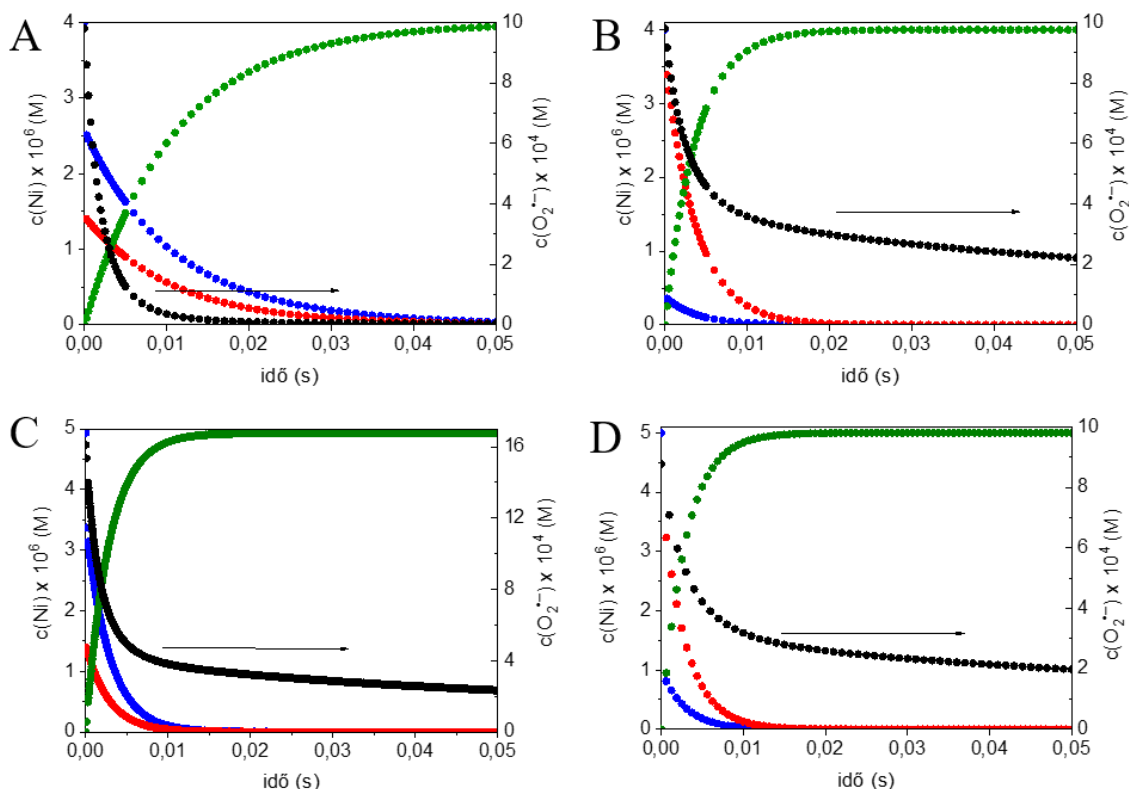
A négy különböző modellvegyületre kapott kinetikai görbék illesztéséből nyert paraméterek a 7. táblázatban találhatóak, melyben szerepelnek a dizmutálási reakcióban résztvevő részecskék moláris abszorpciós koefficiensei is. A k_1 -el jelölt sebességi állandó a $O_2^{\bullet -}$ spontán bomlását írja le, melyet minden esetben meghatároztunk az adott modellrendszerek dizmutálási reakciójának vizsgálata előtt. Fontos megjegyezni, hogy a 7. táblázatban látható illesztett paraméterek többsége várhatóan pH-függő, az adatok pH = 7,6 és víz/DMSO = 1:1 térfogatarányú oldószerkeletben érvényesek.

7. táblázat: A wtNiSOD, wtNiSOD-Pen, wtNiSOD-CC és wtNiSOD-dim modellek nikkel-komplexei és a $O_2^{\cdot-}$ közötti reakciót leíró kinetikai görbék illesztéséből származó kinetikai paraméterek. ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 7,6$; víz/DMSO = 1:1 térfogatarányú oldószerre)

Paraméter	wtNiSOD Érték	wtNiSOD-Pen Érték	wtNiSOD-CC Érték	wtNiSOD-dim Érték	Egység
k_1^a	$(3,84 \pm 0,03) \times 10^4$	$(3,84 \pm 0,03) \times 10^4$	$3,84 \times 10^4$	$(3,86 \pm 0,06) \times 10^4$	$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
k_2	$(9,6 \pm 0,3) \times 10^7$	$> 3,0 \times 10^8^b$	$(6,6 \pm 0,6) \times 10^7$	$> 1,0 \times 10^8^b$	$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
k_3	$(1,72 \pm 0,08) \times 10^8$	$(3,15 \pm 0,04) \times 10^7$	$(1,6 \pm 0,4) \times 10^8$	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^7$	$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
k_4	258 ± 2	292 ± 2^a	1310 ± 90	215 ± 6	s^{-1}
$\varepsilon(\text{Ni}^{\text{II}}_{\text{nL}})^a$	$(1,48 \pm 0,06) \times 10^4$	$(1,99 \pm 0,02) \times 10^4$	$(1,33 \pm 0,03) \times 10^4$	$(2,13 \pm 0,02) \times 10^4$	$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
$\varepsilon(\text{Ni}^{\text{III}}_{\text{nL}})$	$(2,44 \pm 0,09) \times 10^4$	$(2,58 \pm 0,02) \times 10^4^a$	$(1,7 \pm 0,3) \times 10^4$	$(3,19 \pm 0,08) \times 10^4$	$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
$\varepsilon_{\text{Ni}^*}$	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,57 \pm 0,06) \times 10^4^a$	$(6,18 \pm 0,07) \times 10^3^a$	$(6,60 \pm 0,04) \times 10^4$	$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
$\varepsilon(\text{O}_2^{\cdot-})^a$			2686		$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
$\varepsilon(\text{H}_2\text{O}_2)^a$			38		$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

^a Az adatok független kísérletben lettek meghatározva. ^b A paraméter rögzítésre került az illesztés során.

Az egyes modellrendszerekben a különböző komponensek koncentráció-idő profilja a 41. ábrán kerül összehasonlításra.



41. ábra: Az egyes részecskék számított koncentrációprofilja az idő függvényében a $O_2^{\cdot-}$ bomlása során az A: wtNiSOD, B: wtNiSOD-Pen, C: wtNiSOD-CC és D: wtNiSOD-dim peptidek nikkel-komplexeinek jelenlétében. Kék: Ni^{II}_nL , piros: Ni^{III}_nL , zöld: Ni^* , fekete: $O_2^{\cdot-}$. ($c(O_2^{\cdot-})^0 = (9 - 16) \times 10^{-4} M$; $c_{komplex}^0 = (4 - 10) \times 10^{-6} M$; $\lambda = 260 nm$; $l = 2,00 mm$; $T = 25 ^\circ C$)

A koncentrációprofilok alapján két csoportra oszthatjuk a modelleket. A wtNiSOD és wtNiSOD-CC esetén a Ni(III)-komplex redukciója Ni(II)-komplexszé gyorsabb, mint a vele ellentétes irányú oxidációs folyamat. Ennek eredményeként a Ni(II)-komplex koncentrációja a reakció lefutása során mindig nagyobb lesz, mint a Ni(III)-komplex koncentrációja. Ekkor a dizmutálási reakció hatékony, a wtNiSOD esetén a $O_2^{\cdot-}$ teljes mennyisége, míg a wtNiSOD-CC esetén a 90 %-a elbomlik 50 ms alatt. A másik csoportba a wtNiSOD-Pen és wtNiSOD-dim modellek tartoznak, ahol a dizmutálási reakcióban a Ni(II)-komplex oxidációja gyorsabb folyamat, mint a Ni(III)-komplex redukciója. Ennek következtében a Ni(III)-komplex a reakció kezdeti szakaszában felhalmozódik és ezt követően minden időpillanatban nagyobb koncentrációban van jelen, mint a Ni(II)-komplex. Ekkor a peptidek nikkelkomplexei kevésbé hatékonyak a $O_2^{\cdot-}$ bontásában, melynek csak a 80 %-a dizmutálódik 50 ms alatt. Ez azzal magyarázható, hogy a Ni(III)-komplex nem csak a redukciós folyamatban vesz részt, hanem az intramolekuláris redoxi

degradációja révén a katalitikusan inaktív Ni^* részecske képződése is megtörténik. Bár a wtNiSOD-CC modell esetén a Ni(II) -komplex pillanatnyi koncentrációja a dizmutálási reakció során mindig nagyobb, mint a Ni(III) -komplexszé, a k_4 sebességi állandó ennél a rendszernél a legnagyobb, így a Ni^* -gal jelölt részecske koncentrációja 20 ms alatt eléri a maximumot, csak úgy, mint a wtNiSOD-Pen és a wtNiSOD-dim esetében. A k_4 sebességi állandó kiugróan nagy értéke a wtNiSOD-CC modell esetén a feltehetően az első helyen lévő cisztein tiolát-csoportjának hatása, mely kedvezményezetté teszi az intramolekuláris redoxireakciót, ami a ligandum oxidációjához vezet. Meg kell jegyezni, hogy ettől függetlenül mindegyik modellrendszer SOD aktivitása jó és hatékonyan katalizálja a $\text{O}_2^{\cdot -}$ bontását.

A koncentrációprofilok összehasonlításakor az is szembetűnő, hogy a wtNiSOD alapvegyület esetén a Ni^* koncentrációja jóval lassabban éri a maximumot, mint a másik három modellrendszerben, valamint a $\text{O}_2^{\cdot -}$ teljes mennyisége elbomlik 50 ms alatt. A wtNiSOD szekvenciája teljes egészében megegyezik a NiSOD enzim fémkötésért és katalitikus aktivitásért felelős nikkel-kötő hurok felépítésével. A NiSOD enzimek esetén azonban nem számoltak be a Ni^* -hoz hasonló részecskék képződéséről. Ennek feltételezésünk szerint az lehet az oka, hogy az enzimből található terjedelmes fehérjeláncok szerkezetstabilizáló hatása megakadályozza a fémcentrumok környezetében a további oxidációs folyamatokat.

Az irodalmi bevezetőben említésre került, hogy a $\text{O}_2^{\cdot -}$ spontán bomlásának sebessége erősen pH-függő folyamat, mely pH = 4,2-en a leggyorsabb. Annak felderítése érdekében, hogy a $\text{O}_2^{\cdot -}$ komplex katalizált bomlásának sebessége is mutat-e pH-függést, a wtNiSOD-CC esetében egy további kísérletsort is végeztünk. Az 7. táblázatban található sebességi állandó értékek pH = 7,6-en lettek meghatározva, a wtNiSOD-CC esetén 7,8-es és 8,1-es pH-jú TRIS puffer jelenlétében is vizsgáltuk a dizmutálási reakciót *stopped-flow* módszerrel. A három különböző pH-n kapott sebességi állandó értékek a 8. táblázatban találhatók. A 7,6-es pH-n a koncentráció eloszlási diagram alapján a $[\text{NiHL}]^{2-}$ komplex a domináns részecske, így ésszerű feltételezni, hogy főként a $[\text{NiHL}]^{2-}$ komplex a katalitikusan aktív forma. Azonban a pH növelésével párhuzamosan csökken a koncentrációja és 8,1-es pH-n már a $[\text{NiL}]^{3-}$ komplex van jelen nagyobb koncentrációban, így ez a részecske is hozzájárulhat a $\text{O}_2^{\cdot -}$ katalizált bomlásához. Ebben az esetben a dizmutálási reakció a két különböző protonáltsági fokú komplex jelenlétében teljesen analóg módon játszódik le.

8. táblázat: A wtNiSOD-CC Ni(II)-komplexe és a $O_2^{\cdot-}$ között lejátszódó reakció kinetikai paraméterei különböző pH értékeken.

	pH = 7,6	pH = 7,8	pH = 8,1	Egység
k_2	$(6,6 \pm 0,6) \times 10^7$	$(2,6 \pm 0,2) \times 10^7$	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^7$	$M^{-1}s^{-1}$
k_3	$(1,6 \pm 0,4) \times 10^8$	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^8$	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^8$	$M^{-1}s^{-1}$
k_4	1310 ± 90	842 ± 4	801 ± 6	s^{-1}

A 8. táblázatban található sebességi állandók összehasonlításakor láthatjuk, hogy a k_2 és k_4 sebességi állandó értékek jelentősen csökkennek a pH növelésével, míg a k_3 hibahatáron belül változatlan maradt. Ez azt jelenti, hogy a Ni(II)-komplex oxidációja és a Ni^* képződése lassul, míg a Ni(III)-komplex $O_2^{\cdot-}$ általi redukciója ilyen körülmények között a pH-tól független folyamat. Így összességében a $O_2^{\cdot-}$ bomlása a pH növelésével kevésbé hatékony a nikkell-komplexek távollétében és jelenlétében is.

5. Összefoglalás

Az oxidatív stressz elsődleges kiváltó tényezőjének a szuperoxid gyökanion ($O_2^{\cdot-}$) tekinthető. Ez a reaktív oxigén részecske (ROS) közvetlenül károsíthatja a biomolekulákat, vagy közvetett úton is azáltal, hogy további ROS-okat generál. Az evolúció során az élő szervezetek különböző védekezési mechanizmusokat fejlesztettek ki a ROS-ok koncentrációjának szabályzására. A kóros mennyiségben megjelenő $O_2^{\cdot-}$ bontásáért a szuperoxid dizmutáz (SOD) enzimek felelősek. A SOD enzimek a dizmutálási ciklus során hatékonyan bontják le a $O_2^{\cdot-}$ -t, a folyamatban az aktív centrumukban található fémionok két különböző oxidációs állapot között változnak. A legkésőbb felfedezett SOD enzimek nikkelionokat tartalmaznak, a fehérjék szerkezete és fémkötő helyük jelentősen eltér a korábban széles körben tanulmányozott vas-, mangán- és réz-cink SOD enzimektől.

A munkánk első részében célul tűztük ki, hogy a NiSOD enzim N-terminális végének első kilenc aminosavából álló peptid (wtNiSOD: HCDLPCGVY) különböző mutánsait és Ni(II)-komplexeit termodinamikai és szerkezetvizsgálati módszerekkel jellemezzük annak érdekében, hogy felderítsük az egyes funkciós csoportok szerepét a fémion megkötésében. A NiSOD enzim elsődleges fémkötő helyei a hisztidin imidazol nitrogénje, a ciszteinek tiolát-csoportjai, az első amid nitrogén és az N-terminális aminocsoport. Így munkánk során hat különböző, kilenc aminosavból álló peptidet és ezek Ni(II)-komplexét jellemeztük pH-potenciometria, UV-látható, CD- és NMR spektroszkópia segítségével. Ezen peptideket a wtNiSOD szerkezeti módosításával kaptuk, mely változtatások a hisztidint, a ciszteineket és az N-terminális aminocsoportot érintették. Ezen eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a második helyen lévő cisztein a NiSOD enzim redukált formájára jellemző geometria kialakításában kulcsfontosságú, míg a hatodik helyen lévő cisztein befolyásolhatja a Ni(II)/Ni(III) pár redoxi tulajdonságait. Az első helyen lévő hisztidin - cisztein pontmutációt tartalmazó modell két nagyságrenddel jobban köti a Ni(II)-iont, mint a wtNiSOD peptid a pNi értékek alapján, azonban a NiSOD enzim redukált formájára jellemző koordinációs módú Ni(II)-komplex képződése a lúgos pH tartományba tolódik el. Az N-terminális aminocsoport metilezésével kapott modell 1,2 logK egységgel nagyobb stabilitású komplexet képez a Ni(II)-ionnal fiziológiás pH-n, mint a wtNiSOD peptid. Azon modell esetében, ahol az első helyen lévő hisztidint egy arginin helyettesíti az (NH_2 , N^+ , S^- , S^-) kötésmódú Ni(II)-komplex már savas pH-n kialakul, majd széles pH-tartományban domináns részecske.

A NiSOD enzim hat fémion megkötésére alkalmas, azonban az eddig felsorolt kilenc aminosavból álló peptidek és a szakirodalomban közölt modellek csak egy fémion koordinálására képesek, így célunk volt egy olyan modell vizsgálata, amely több fémion megkötésére is alkalmas. Ennek érdekében vizsgáltunk egy 19 aminosavból álló peptidet, amely két wtNiSOD alegység C-terminális végének lizin aminosavval való kapcsolásával jött létre. Eredményeink alapján ez a modell már a fémion/ligandum 1:1 koncentráció arányú elegyében is nagy mennyiségben képez kétmagvú komplexet a Ni(II)-ionnal fiziológiás pH-n. Bár a komplexképződés lassú, a sebesség-meghatározó lépés valószínűleg egy szerkezeti átrendeződés, amelyet az első fémion koordinálása idéz elő a peptid távolabbi részén, elősegítve ezzel a második Ni(II)-ion kötődését.

Munkánk következő részében az enzimmodellek dizmutálási ciklusában feltételezhetően képződő Ni(III)-komplexek szerkezetét vizsgáltuk ESR spektroszkópia segítségével. Ehhez a Ni(II)-komplexeket kálium-szuperoxid segítségével oxidáltuk. A második vagy hatodik helyen lévő cisztein - hisztidin pontmutációt tartalmazó modellek esetén nem sikerült a NiSOD enzim oxidált formájára jellemző jellegzetes triplett felhasadást detektálni az ESR spektrumokban, ami a Ni(III)-komplexek hiányára utal. Azonban megállapítottuk, hogy a Ni(II)-komplexek adduktumot képeznek a $O_2^{\cdot-}$ -nal. Az extra metilcsoportokat tartalmazó modellek (wtNiSOD-Pen és wtNiSOD-NMe) esetében a wtNiSOD peptid Ni(III)-komplexére jellemző ESR spektrumokat kaptunk, bár a meghatározott ESR paraméterek mindkét modellnél eltérőek az alapvegyület azonos paramétereitől képest. Ez a jelenség a wtNiSOD-Pen modellnél a második helyen lévő penicillamin β -szénatomján, míg a wtNiSOD-NMe mutánsnál az N-terminális aminocsoporton található metilencsoportok elektronküldő sajátságával magyarázható, ami befolyásolja az *in situ* képződő Ni(III)-ionokon lokalizálódó spinsűrűséget. Azon modellek esetén, ahol az első helyen lévő hisztidint cseréltük le az ESR spektrumokon nem jelentek meg a NiSOD enzim oxidált formájára jellemző szuperhiperfinom felhasadások. A hisztidin - cisztein pontmutációt tartalmazó wtNiSOD-CC esetén azonban egyértelműen kimutatható, hogy jelentős mennyiségű $O_2^{\cdot-}$ fogy el a rendszerből, míg a hisztidin - arginin pontmutációt tartalmazó wtNiSOD-RC modellnél imidazol segédligandum hozzáadása után kis mértékű változás figyelhető az ESR spektrumban. A két fémion megkötésére alkalmas wtNiSOD-dim modell esetén rendkívül változatos ESR spektrumokat detektáltunk a különböző fémion/ligandum koncentrációarányú és pH-jú Ni(II)-komplexek oxidálásával kapott minták esetén. A spektrumok elemzésekor megállapítottuk, hogy öt különböző állapotú Ni(III)-komplexnek megfeleltethető ESR spektrumból és ezek keverékéből épülnek fel a különböző állapotú minták.

Az eddig felsorolt peptidek Ni(II)- és Ni(III)-komplexeinek szerkezeti jellemzése után munkánkat a Ni(II)-komplexek SOD aktivitás vizsgálatával folytattuk. A szakirodalomban széles körben alkalmazott McCord-Fridovich féle módszerrel a legtöbb peptid Ni(II)-komplexének IC_{50} értékét meghatároztuk. Ez alapján megállapítottuk, hogy a wtNiSOD-HC és -HH modelleknek, amelyek csak egy ciszteint tartalmaznak, jelentősen kisebb a SOD aktivitásuk, mint a wtNiSOD alapvegyület Ni(II)-komplexének. A többi kilenc tagszámú peptid esetén azonos nagyságrendű, de nagyobb IC_{50} értékeket kaptunk, kivéve a hisztidin - arginin pontmutációt tartalmazó modell esetét, amelynek jobb a SOD aktivitása, mint a wtNiSOD Ni(II)-komplexnek. Ez a módszer azonban csak szemikvantitatív információt ad, a dizmutálási ciklus mechanizmusáról semmilyen információval nem szolgál.

Munkánk során célunk volt egy új SOD aktivitás mérési módszer fejlesztése, amely a Ni(II)-komplexek és a $O_2^{\cdot-}$ közötti reakció részletesebb tanulmányozását teszi lehetővé. Ez szekvenciális *stopped-flow* készülékkel, spektrofotometriás detektálás mellett, víz/DMSO = 1:1 térfogatarányú oldószerelegyen valósult meg. A módszer alkalmazása során nagyobb $O_2^{\cdot-}$ koncentrációt tudtunk elérni, mint a McCord-Fridovich féle módszerrel, amivel valódi katalitikus körülményeket teremtünk, valamint a kinetikai görbék illesztésével extra információt kaphatunk a dizmutálási reakció kinetikájáról. Az első helyen ciszteint, a második helyen penicillamint tartalmazó, a 19 tagszámú modellek, valamint wtNiSOD peptidek Ni(II)-komplexei és $O_2^{\cdot-}$ közötti reakciókat részletesen tanulmányoztuk az általunk fejlesztett SOD aktivitás mérési módszerrel. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a dizmutálási cikluson kívül (ahol Ni(II)-komplex oxidációja és a Ni(III)-komplex redukciója történik $O_2^{\cdot-}$ -nal való reakció során) egy további folyamat is lejátszódik, mely a Ni(III)-komplex intramolekuláris redoxi-degradációjakor egy katalitikusan inaktív komplex képződését eredményezi. Ezen Ni(II)-komplexek két csoportra oszthatók az alapján, hogy a Ni(II)-komplex oxidációja vagy a Ni(III)-komplex redukciója a gyorsabb folyamat. A wtNiSOD és wtNiSOD-CC esetén a Ni(III)-komplex redukciója gyorsabb és a dizmutálási reakció hatékonyabb, mint a másik két modellnél, ahol a Ni(III)-komplex a reakció kezdeti szakaszában felhalmozódik, ezért az intramolekuláris redoxi-degradáció eredményeképpen a rendszer gyorsabban elveszti katalitikus aktivitását és kevésbé hatékonyan bontja el a $O_2^{\cdot-}$ -t. Ezzel együtt is ki kell emelni, hogy az általunk vizsgált modellek mindegyike képes katalizálni a $O_2^{\cdot-}$ bontását, melyek közül a cisztein - hisztidin pontmutációt tartalmazó modellek kivételével mindegyiknek rendkívül jó a SOD aktivitása.

Az általunk vizsgált peptidek Ni(II)- és Ni(III)-komplexeinek termodinamikai és szerkezeti jellemzésével kapott eredményeink hozzájárulhatnak a NiSOD enzim szerkezet-hatás összefüggéseinek mélyebb megértéséhez. A szekvenciális *stopped-flow* készülékre fejlesztett SOD aktivitás mérési módszer nem csak nikkelkomplexek, hanem más, antioxidáns tulajdonságú vegyületek enzim mimetikus hatásának részletesebb tanulmányozását is lehetővé teszi.

6. Summary

The superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) is considered the primary trigger of oxidative stress. This reactive oxygen species (ROS) directly damages biomolecules or acts indirectly by generating additional ROS. During evolution, living organisms have developed various defense mechanisms to regulate ROS concentrations. The superoxide dismutase (SOD) enzymes are capable of catalyzing the decomposition of $O_2^{\cdot-}$ in the extracellular matrix. During the dismutation cycle, SOD enzymes efficiently decompose $O_2^{\cdot-}$, while the metal ions located in their active centers alternate between two different oxidation states. The most recently discovered SOD enzymes contain nickel ions in the active center. However, their structure and metal-binding sites differ significantly from those of the extensively studied iron-, manganese-, and copper–zinc-containing SOD enzymes.

In the first part of our work, our aim was to characterize various peptides mimicking the active site of NiSOD enzyme and their Ni(II) complexes using thermodynamic and spectroscopic techniques to understand the role of individual functional groups involved in binding the metal ion. The primary metal-binding sites of the NiSOD enzyme are the imidazole nitrogen of histidine, the thiolate groups of cysteines, the first amide nitrogen, and the N-terminal amino group. Therefore, we characterized six different nonapeptides where the point mutations were as follows: the cysteine residues were systematically replaced to histidine and penicillamine, the terminal histidine was replaced with arginine or cysteine, and the N-terminal amino group was methylated. Based on our results, we revealed that the cysteine at position 2 plays a key role in the formation of square-planar geometry in the reduced form of the NiSOD enzyme, while the cysteine at position 6 may influence the redox properties of the Ni(II)/Ni(III) redox couple. A model peptide containing a histidine-to-cysteine point mutation at position 1 binds the Ni(II) ion two orders of magnitude stronger than that of the wtNiSOD peptide based on their calculated pNi values, the formation of a Ni(II) complex with a coordination mode characteristic of the reduced form of NiSOD shifts toward the alkaline pH range. The model peptide obtained by methylation of the N-terminal amino group forms a complex with the Ni(II) ion that is 1.2 logK units more stable at physiological pH than that of the wtNiSOD peptide. In the model where the histidine at position 1 is replaced by arginine, the complex formation processes start at approximately pH 5, however, the [NiL] complex with the (NH_2 , N^- , S^- , S^-) coordination mode is already formed under these conditions.

Although the NiSOD enzyme can bind six metal ions, the nine-amino-acid peptides discussed above and the models reported in the literature are only capable of coordinating a single metal ion. Therefore, our aim was to investigate a model binding multiple metal ions. For this purpose, we examined a peptide consisting of 19 amino acids. In this case, two nonapeptides with the characteristic amino acid sequence of wtNiSOD (HCDLPCGVY) were linked by lysine at the C termini. The results confirm that this model forms a dinuclear complex with the Ni(II) ion even at a 1:1 metal-to-ligand concentration ratio at physiological pH. The complex formation is relatively slow; the rate-determining step is likely a structural rearrangement induced by the coordination of the first metal ion at a more distant region of the peptide, thereby facilitating binding of the second Ni(II) ion.

In the next part of our work, we have investigated the structure of Ni(III) complexes presumably formed during the dismutation cycle using EPR spectroscopy. For this purpose, the Ni(II) complexes were oxidized with potassium superoxide. In models containing cysteine–histidine point mutations at either the second or sixth position, the characteristic triplet splitting typical of the oxidized form of the NiSOD enzyme could not be detected in the EPR spectra. However, we have confirmed that the Ni(II) complexes form adducts with $O_2^{\cdot-}$. In the case of models containing penicillamine function or additional methyl groups (wtNiSOD-Pen and wtNiSOD-NMe), the oxidation leads to the formation of Ni(III) transient species, although the EPR parameters differ from those obtained for the oxidized form of the native NiSOD enzyme fragment. This phenomenon can be explained by considering the presence of the electron-donating properties of the β -carbon atom of penicillamine at position 2 in the wtNiSOD-Pen model, and by the methylene groups on the N-terminal amino group in the wtNiSOD-NMe mutant, both of which influence the spin density localized on the in situ formed Ni(III) ions. In models where the histidine at position 1 was replaced to cysteine, the superhyperfine splittings characteristic for the oxidized form of the NiSOD enzyme did not appear in the EPR spectra. However, in the wtNiSOD-CC model containing a histidine-to-cysteine point mutation, a significant amount of $O_2^{\cdot-}$ was consumed in the oxidation, while in the wtNiSOD-RC model containing a histidine-to-arginine point mutation, a slight change in the EPR spectrum was detected after the addition of an imidazole auxiliary ligand. In the case of the wtNiSOD-dim model capable of binding two metal ions, the structure and the coordination mode of Ni(III) transient species significantly depend on the metal ion to ligand concentration ratios and pH. The analysis and the simulation of these spectra revealed that the samples feature EPR spectra attributable to the mixture of five different Ni(III) complex states.

After thorough equilibrium and structural characterization of the corresponding Ni(II) and Ni(III) complexes, we continued our work by investigating the SOD activity of the nickel complexes. Using the commonly applied McCord–Fridovich assay, IC_{50} values were determined for most complexes. Based on these results, we found that the wtNiSOD-HC and wtNiSOD-HH models, which contain only one cysteine residue, exhibit significantly lower SOD activity than that of the Ni(II) complex formed with the native NiSOD enzyme fragment. For the other nickel(II) complexes of nonapeptides, the IC_{50} values are of the same order of magnitude but slightly higher than in the case of the native enzyme. The only exception is the model containing a histidine–arginine point mutation, which has better SOD activity than that of the Ni(II) complex formed with wtNiSOD. This method allows only semi-quantitative comparison of the SOD activities and does not provide information on the mechanism of the dismutation cycle.

Therefore, another goal of our work was to develop a new method for measuring SOD activity that enables a more detailed study of the reaction between Ni(II) complexes and $O_2^{\cdot-}$. This was achieved by using a sequential *stopped-flow* instrument with spectrophotometric detection in a water/DMSO = 1:1 (V/V) solvent mixture. This method allows the use of higher $O_2^{\cdot-}$ concentrations than the McCord–Fridovich assay, thereby accommodating real catalytic conditions. Furthermore, fitting the kinetic traces provides additional information on the mechanism of the dismutation reaction. Using this newly developed method, we studied the reactions between $O_2^{\cdot-}$ and the Ni(II) complexes of peptides containing cysteine at position 1, penicillamine at position 2, the 19-membered model, and the wtNiSOD peptides in detail. Based on our results, we established that, in addition to the dismutation cycle, where oxidation of the Ni(II) complex and reduction of the Ni(III) complex occur with $O_2^{\cdot-}$, an additional process takes place. It is the intramolecular redox degradation of the Ni(III) complex that yields a catalytically inactive complex.

The Ni(II) complexes can be divided into two groups depending on whether the oxidation of the Ni(II) complex or the reduction of the Ni(III) complex is faster. In the case of wtNiSOD and wtNiSOD-CC, the reduction of the Ni(III) complex is faster, and the dismutation reaction is more efficient than in the other two models where the accumulation of the Ni(III) complex in the initial stage of the reaction. As a result of intramolecular redox degradation, the system loses faster catalytic activity and decomposes $O_2^{\cdot-}$ less efficiently. Nevertheless, it should be noted that all investigated models are capable of catalyzing the degradation of $O_2^{\cdot-}$, and—with the exception of

the models containing histidine–cysteine point mutations—all exhibit remarkably good SOD activity.

Our results obtained from the thermodynamic and structural characterization of the Ni(II) and Ni(III) complexes of the peptides investigated by us may contribute to a deeper understanding of the structure–function relationships of the NiSOD enzyme. The SOD activity assay developed for a sequential *stopped-flow* instrument enables a more detailed investigation not only of nickel complexes, but also of the enzyme-mimetic effects of other compounds with antioxidant properties.

7. Hivatkozások

1. Case, A. J., On the Origin of Superoxide Dismutase: An Evolutionary Perspective of Superoxide-Mediated Redox Signaling. *Antioxidants (Basel)* **2017**, 6 (4).
2. Youn, H. D.; Kim, E. J.; Roe, J. H.; Hah, Y. C.; Kang, S. O., A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem J* **1996**, 318 (Pt 3) (Pt 3), 889-96.
3. Bryngelson, P. A.; Maroney, M. J., Nickel Superoxide Dismutase. In *Nickel and Its Surprising Impact in Nature*, 2007; pp 417-443.
4. Pizzino, G.; Irrera, N.; Cucinotta, M.; Pallio, G.; Mannino, F.; Arcoraci, V.; Squadrito, F.; Altavilla, D.; Bitto, A., Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, 2017, 8416763.
5. Dröge, W., Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **2002**, 82 (1), 47-95.
6. Nishikawa, T.; Edelstein, D.; Du, X. L.; Yamagishi, S.; Matsumura, T.; Kaneda, Y.; Yorek, M. A.; Beebe, D.; Oates, P. J.; Hammes, H. P.; Giardino, I.; Brownlee, M., Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **2000**, 404 (6779), 787-90.
7. Munro, J. M., Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases. *Eur Heart J* **1993**, 14 Suppl K, 72-7.
8. Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; Rhodes, C. J.; Telser, J., Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* **2004**, 266 (1-2), 37-56.
9. Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **2006**, 160 (1), 1-40.
10. Young, I. S.; Woodside, J. V., Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* **2001**, 54 (3), 176-86.
11. Bahorun, T.; Soobrattee, M.; Luximon-Ramma, V.; Aruoma, O., Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet Journal of Medical Update* **2006**, 1 (2), 25-41.
12. Steinberg, D., Low Density Lipoprotein Oxidation and Its Pathobiological Significance *. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272 (34), 20963-20966.
13. Christen, Y., Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* **2000**, 71 (2), 621s-629s.
14. Butterfield, D. A., Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res* **2002**, 36 (12), 1307-13.
15. Guo, R. F.; Ward, P. A., Role of oxidants in lung injury during sepsis. *Antioxid Redox Signal* **2007**, 9 (11), 1991-2002.
16. Mahajan, A.; Tandon, V. R., Antioxidants and rheumatoid arthritis. *J Indian Rheumatol Assoc* **2004**, 12, 139-142.
17. Galle, J., Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* **2001**, 16 (11), 2135-7.
18. Navarro-Yepes, J.; Zavala-Flores, L.; Anandhan, A.; Wang, F.; Skotak, M.; Chandra, N.; Li, M.; Pappa, A.; Martinez-Fong, D.; Del Razo, L. M.; Quintanilla-Vega, B.; Franco, R., Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. *Pharmacol Ther* **2014**, 142 (2), 206-30.
19. Stein, T. P., Space flight and oxidative stress. *Nutrition* **2002**, 18 (10), 867-871.
20. Al-Gubory, K. H.; Garrel, C.; Faure, P.; Sugino, N., Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reprod Biomed Online* **2012**, 25 (6), 551-60.
21. Birnboim, H. C., DNA strand breaks in human leukocytes induced by superoxide anion, hydrogen peroxide and tumor promoters are repaired slowly compared to breaks induced by ionizing radiation. *Carcinogenesis* **1986**, 7 (9), 1511-1517.
22. Huang, P.; Feng, L.; Oldham, E. A.; Keating, M. J.; Plunkett, W., Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature* **2000**, 407 (6802), 390-395.
23. Martins-Costa, M. T. C.; Anglada, J. M.; Francisco, J. S.; Ruiz-Lopez, M. F., Reactivity of Atmospherically Relevant Small Radicals at the Air–Water Interface. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, 51 (22), 5413-5417.

24. Sheng, Y.; Abreu, I. A.; Cabelli, D. E.; Maroney, M. J.; Miller, A.-F.; Teixeira, M.; Valentine, J. S., Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chemical Reviews* **2014**, 114 (7), 3854-3918.
25. Wei, Y.; Wu, K.; Wu, Y.; Hu, S., Electrochemical characterization of a new system for detection of superoxide ion in alkaline solution. *Electrochemistry Communications* **2003**, 5 (9), 819-824.
26. Zhang, D.; Yan, S.; Song, W., Photochemically Induced Formation of Reactive Oxygen Species (ROS) from Effluent Organic Matter. *Environmental Science & Technology* **2014**, 48 (21), 12645-12653.
27. Anpo, M.; Che, M.; Fubini, B.; Garrone, E.; Giamello, E.; Paganini, M. C., Generation of superoxide ions at oxide surfaces. *Topics in Catalysis* **1999**, 8 (3), 189-198.
28. Dietzel, P. D. C.; Kremer, R. K.; Jansen, M., Tetraorganylammonium Superoxide Compounds: Close to Unperturbed Superoxide Ions in the Solid State. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126 (14), 4689-4696.
29. Afanas'ev, I. B., *Superoxide Ion Chemistry and Biological Implications*. Boca Raton, 1989.
30. Wadhawan, J. D.; Welford, P. J.; Maisonhaute, E.; Climent, V.; Lawrence, N. S.; Compton, R. G.; McPeak, H. B.; Hahn, C. E. W., Microelectrode Studies of the Reaction of Superoxide with Carbon Dioxide in Dimethyl Sulfoxide. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 105 (43), 10659-10668.
31. Li, H. R.; Shen, S. H.; Gao, X. S.; Peng, L.; Luo, D. Y., The Efficacy and Safety of Dimethyl Sulfoxide Into the Bladder for the Treatment of Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neurourol Urodyn* **2025**, 44 (5), 1036-1046.
32. Chen, H.; Lin, L.; Lin, Z.; Guo, G.; Lin, J.-M., Chemiluminescence Arising from the Decomposition of Peroxymonocarbonate and Enhanced by CdTe Quantum Dots. *The Journal of Physical Chemistry A* **2010**, 114 (37), 10049-10058.
33. Lin, J.-M.; Yamada, M., Oxidation Reaction between Periodate and Polyhydroxyl Compounds and Its Application to Chemiluminescence. *Analytical Chemistry* **1999**, 71 (9), 1760-1766.
34. Chen, J.; Wollenberger, U.; Lisdat, F.; Ge, B.; Scheller, F. W., Superoxide sensor based on hemin modified electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2000**, 70 (1), 115-120.
35. Chih, T.; Yeh, S. Y.; Wang, C. M., Evidence and applications for electron transfer between vitamin K3 and oxygen. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2003**, 543 (2), 135-142.
36. Du, Y.; Fu, Q. S.; Li, Y.; Su, Y., Photodecomposition of 4-chlorophenol by reactive oxygen species in UV/air system. *Journal of Hazardous Materials* **2011**, 186 (1), 491-496.
37. Stoin, U.; Shames, A. I.; Malka, I.; Bar, I.; Sasson, Y., In situ generation of superoxide anion radical in aqueous medium under ambient conditions. *Chemphyschem* **2013**, 14 (18), 4158-64.
38. Sugimoto, H.; Matsumoto, S.; Sawyer, D. T., Oxygenation of polychloro aromatic hydrocarbons by superoxide ion in aprotic media. *Journal of the American Chemical Society* **1987**, 109 (26), 8081-8082.
39. Watts, R. J.; Stanton, P. C.; Howsawkung, J.; Teel, A. L., Mineralization of a sorbed polycyclic aromatic hydrocarbon in two soils using catalyzed hydrogen peroxide. *Water Research* **2002**, 36 (17), 4283-4292.
40. Nouri-Nigjeh, E.; Permentier, H. P.; Bischoff, R.; Bruins, A. P., Lidocaine Oxidation by Electrogenated Reactive Oxygen Species in the Light of Oxidative Drug Metabolism. *Analytical Chemistry* **2010**, 82 (18), 7625-7633.
41. Singh, M.; Singh, K. N.; Dwivedi, S.; Misra, R. A., Superoxide ($O_2^{\cdot-}$) - Initiated Oxidation of Primary Alcohols to Carboxylic Acids. *Synthesis* **1991**, 1991 (04), 291-293.
42. Casadei, M. A.; Moracci, F. M.; Zappia, G.; Inesi, A.; Rossi, L., Electrogenated Superoxide-Activated Carbon Dioxide. A New Mild and Safe Approach to Organic Carbamates. *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, 62 (20), 6754-6759.
43. Goto, H.; Hanada, Y.; Ohno, T.; Matsumura, M., Quantitative analysis of superoxide ion and hydrogen peroxide produced from molecular oxygen on photoirradiated TiO_2 particles. *Journal of Catalysis* **2004**, 225 (1), 223-229.
44. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M., *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press: 2015.
45. Thomas, E. L.; Milligan, T. W.; Joyner, R. E.; Jefferson, M. M., Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci. *Infect Immun* **1994**, 62 (2), 529-35.

46. Dada, L. A.; Chandel, N. S.; Ridge, K. M.; Pedemonte, C.; Bertorello, A. M.; Sznajder, J. I., Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *J Clin Invest* **2003**, *111* (7), 1057-64.
47. Fridovich, I., The Biology of Oxygen Radicals. *Science* **1978**, *201* (4359), 875-880.
48. Sies, H., Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem* **2014**, *289* (13), 8735-41.
49. Dickinson, B. C.; Chang, C. J., Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature chemical biology* **2011**, *7* (8), 504-511.
50. Hyslop, P. A.; Chaney, M. O. Mechanism of GAPDH Redox Signaling by H₂O₂ Activation of a Two-Cysteine Switch *International Journal of Molecular Sciences* [Online], 2022.
51. Andrés, C. M.; Pérez de la Lastra, J. M.; Juan, C. A.; Plou, F. J.; Pérez-Lebeña, E. Chemistry of Hydrogen Peroxide Formation and Elimination in Mammalian Cells, and Its Role in Various Pathologies *Stresses* [Online], 2022, p. 256-274.
52. Castagna, R.; Eiserich, J. P.; Budamagunta, M. S.; Stipa, P.; Cross, C. E.; Proietti, E.; Voss, J. C.; Greci, L., Hydroxyl radical from the reaction between hypochlorite and hydrogen peroxide. *Atmospheric Environment* **2008**, *42* (26), 6551-6554.
53. Pastor, N.; Weinstein, H.; Jamison, E.; Brenowitz, M., A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol* **2000**, *304* (1), 55-68.
54. Lipinski, B., Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid Med Cell Longev* **2011**, *2011*, 809696.
55. Chatgililoglu, C.; Ferreri, C.; Krokidis, M. G.; Masi, A.; Terzidis, M. A., On the relevance of hydroxyl radical to purine DNA damage. *Free Radic Res* **2021**, *55* (4), 384-404.
56. Dizdaroğlu, M.; Kirkali, G.; Jaruga, P., Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. *Free Radic Biol Med* **2008**, *45* (12), 1610-21.
57. Hackbarth, S.; Islam, W.; Fang, J.; Šubr, V.; Röder, B.; Etrych, T.; Maeda, H., Singlet oxygen phosphorescence detection in vivo identifies PDT-induced anoxia in solid tumors. *Photochem Photobiol Sci* **2019**, *18* (6), 1304-1314.
58. Denys, G. A.; Devoe, N. C.; Gudis, P.; May, M.; Allen, R. C.; Stephens, J. T., Jr., Mechanism of Microbicidal Action of E-101 Solution, a Myeloperoxidase-Mediated Antimicrobial, and Its Oxidative Products. *Infect Immun* **2019**, *87* (7).
59. Russell, G. A., Deuterium-isotope effects in the autoxidation of aralkyl hydrocarbons. mechanism of the interaction of peroxy radicals¹. *Journal of the American Chemical Society* **1957**, *79* (14), 3871-3877.
60. Khan, A. U.; Kasha, M., Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91* (26), 12365-7.
61. Miyamoto, S.; Ronsein, G. E.; Corrêa, T. C.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H.; Di Mascio, P., Direct evidence of singlet molecular oxygen generation from peroxynitrate, a decomposition product of peroxynitrite. *Dalton Trans* **2009**, (29), 5720-9.
62. Lu, W.; Sun, Y.; Tsai, M.; Zhou, W.; Liu, J., Singlet O(2) Oxidation of a Deprotonated Guanine-Cytosine Base Pair and Its Entangling with Intra-Base-Pair Proton Transfer. *Chemphyschem* **2018**, *19* (20), 2645-2654.
63. Ishikawa, A.; Ito, J.; Shimizu, N.; Kato, S.; Kobayashi, E.; Ohnari, H.; Sakata, O.; Naru, E.; Nakagawa, K., Linoleic acid and squalene are oxidized by discrete oxidation mechanisms in human sebum. *Ann N Y Acad Sci* **2021**, *1500* (1), 112-121.
64. Murotomi, K.; Umeno, A.; Shichiri, M.; Tanito, M.; Yoshida, Y., Significance of Singlet Oxygen Molecule in Pathologies. *Int J Mol Sci* **2023**, *24* (3).
65. Meunier, B., *Biomimetic Oxidations Catalyzed by Transition Metal Complexes*. 2000.
66. Saito, M.; Sigman, D.; Morel, F., The bioinorganic chemistry of the ancient ocean: The co-evolution of cyanobacterial metal requirements and biogeochemical cycles at the Archean-Proterozoic boundary? *Inorganica Chimica Acta* **2003**, *356*, 308-318.
67. Yost, F. J., Jr.; Fridovich, I., An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **1973**, *248* (14), 4905-8.

68. Kirby, T. W.; Lancaster, J. R.; Fridovich, I., Isolation and characterization of the iron-containing superoxide dismutase of *Methanobacterium bryantii*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1981**, 210 (1), 140-148.
69. Dufernez, F.; Yernaux, C.; Gerbod, D.; Noël, C.; Chauvenet, M.; Wintjens, R.; Edgcomb, V. P.; Capron, M.; Oppendoes, F. R.; Viscogliosi, E., The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in trypanosomatidae: characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic Biol Med* **2006**, 40 (2), 210-25.
70. Kwiatowski, J.; Safianowska, A.; Kaniuga, Z., Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from tomato leaves, *Lycopersicon esculentum*. *Eur J Biochem* **1985**, 146 (2), 459-66.
71. Vance, C. K.; Miller, A. F., Novel insights into the basis for *Escherichia coli* superoxide dismutase's metal ion specificity from Mn-substituted FeSOD and its very high E(m). *Biochemistry* **2001**, 40 (43), 13079-87.
72. Pennington, C. D.; Gregory, E. M., Isolation and reconstitution of iron- and manganese-containing superoxide dismutases from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J Bacteriol* **1986**, 166 (2), 528-32.
73. Hamre, A. G.; Al-Sadawi, R.; Johannesen, K. M.; Bisarro, B.; Kjendseth, Å. R.; Leiros, H.-K. S.; Sørli, M., Initial characterization of an iron superoxide dismutase from *Thermobifida fusca*. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2023**, 28 (7), 689-698.
74. Lah, M. S.; Dixon, M. M.; Patridge, K. A.; Stallings, W. C.; Fee, J. A.; Ludwig, M. L., Structure-function in *Escherichia coli* iron superoxide dismutase: comparisons with the manganese enzyme from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry* **1995**, 34 (5), 1646-60.
75. Miller, A. F., Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett* **2012**, 586 (5), 585-95.
76. Hong, Z.; LoVerde, P. T.; Thakur, A.; Hammarskjöld, M. L.; Rekosh, D., *Schistosoma mansoni*: a Cu/Zn superoxide dismutase is glycosylated when expressed in mammalian cells and localizes to a subtegumental region in adult schistosomes. *Exp Parasitol* **1993**, 76 (2), 101-14.
77. Chang, L. Y.; Slot, J. W.; Geuze, H. J.; Crapo, J. D., Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J Cell Biol* **1988**, 107 (6 Pt 1), 2169-79.
78. Pilon, M.; Ravet, K.; Tapken, W., The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta* **2011**, 1807 (8), 989-98.
79. Pesce, A.; Capasso, C.; Battistoni, A.; Folcarelli, S.; Rotilio, G.; Desideri, A.; Bolognesi, M., Unique structural features of the monomeric Cu,Zn superoxide dismutase from *Escherichia coli*, revealed by X-ray crystallography. *J Mol Biol* **1997**, 274 (3), 408-20.
80. McCord, J. M.; Fridovich, I., Superoxide Dismutase: AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN). *Journal of Biological Chemistry* **1969**, 244 (22), 6049-6055.
81. Lewandowski, L.; Kepinska, M.; Milnerowicz, H., The copper-zinc superoxide dismutase activity in selected diseases. *European Journal of Clinical Investigation* **2019**, 49 (1), e13036.
82. Levanon, D.; Lieman-Hurwitz, J.; Dafni, N.; Wigderson, M.; Sherman, L.; Bernstein, Y.; Laver-Rudich, Z.; Danciger, E.; Stein, O.; Groner, Y., Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase. *Embo j* **1985**, 4 (1), 77-84.
83. Folz, R. J.; Crapo, J. D., Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. *Genomics* **1994**, 22 (1), 162-71.
84. Tainer, J. A.; Getzoff, E. D.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C., Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* **1983**, 306 (5940), 284-7.
85. Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I., Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chemical Reviews* **1996**, 96 (7), 2239-2314.
86. Cabelli, D.; Riley, D.; Rodriguez, J.; Valentine, J.; Zhu, H., Models of superoxide dismutases. Biomimetic Oxidations Catalyzed by Transition Metal Complexes. Imperial College Press: 1999.
87. Herbst, R. W.; Guce, A.; Bryngelson, P. A.; Higgins, K. A.; Ryan, K. C.; Cabelli, D. E.; Garman, S. C.; Maroney, M. J., Role of conserved tyrosine residues in NiSOD catalysis: a case of convergent evolution. *Biochemistry* **2009**, 48 (15), 3354-69.

88. Wuerges, J.; Lee, J. W.; Yim, Y. I.; Yim, H. S.; Kang, S. O.; Djinnovic Carugo, K., Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Proc Natl Acad Sci USA* **2004**, *101* (23), 8569-74.
89. Choudhury, S.; Lee, J.-W.; Davidson, G.; Yim, Y.-I.; Bose, K.; Sharma, M.; Kang, S.-O.; Cabelli, D.; Maroney, M., Examination of the Nickel Site Structure and Reaction Mechanism in *Streptomyces seoulensis* Superoxide Dismutase. *Biochemistry* **1999**, *38*, 3744-52.
90. Barondeau, D. P.; Kassmann, C. J.; Bruns, C. K.; Tainer, J. A.; Getzoff, E. D., Nickel Superoxide Dismutase Structure and Mechanism. *Biochemistry* **2004**, *43* (25), 8038-8047.
91. Neupane, K. P.; Gearty, K.; Francis, A.; Shearer, J., Probing Variable Axial Ligation in Nickel Superoxide Dismutase Utilizing Metallopeptide-Based Models: Insight into the Superoxide Disproportionation Mechanism. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (47), 14605-14618.
92. Lihi, N.; Csire, G.; Szakács, B.; May, N. V.; Várnagy, K.; Sóvágó, I.; Fábíán, I., Stabilization of the Nickel Binding Loop in NiSOD and Related Model Complexes: Thermodynamic and Structural Features. *Inorganic Chemistry* **2019**, *58* (2), 1414-1424.
93. Shearer, J., Dioxygen and superoxide stability of metallopeptide based mimics of nickel containing superoxide dismutase: The influence of amine/amidate vs. bis-amidate ligation. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2013**, *129*, 145-149.
94. Shearer, J., Insight into the structure and mechanism of nickel-containing superoxide dismutase derived from peptide-based mimics. *Acc Chem Res* **2014**, *47* (8), 2332-41.
95. Shearer, J.; Neupane, K. P.; Callan, P. E., Metallopeptide based mimics with substituted histidines approximate a key hydrogen bonding network in the metalloenzyme nickel superoxide dismutase. *Inorg Chem* **2009**, *48* (22), 10560-71.
96. Nakane, D.; Wasada-Tsutsui, Y.; Funahashi, Y.; Hatanaka, T.; Ozawa, T.; Masuda, H., A novel square-planar Ni(II) complex with an amino-carboxamido-dithiolato-type ligand as an active-site model of NiSOD. *Inorg Chem* **2014**, *53* (13), 6512-23.
97. Nielsen, F. H., Ultratrace elements in nutrition. *Annu Rev Nutr* **1984**, *4*, 21-41.
98. Phipps, T.; Tank, S.; Wirtz, J.; Brewer, L.; Coyner, A.; Ortego, L.; Fairbrother, A., Essentiality of nickel and homeostatic mechanisms for its regulation in terrestrial organisms. *Environmental Reviews* **2011**, *10*, 209-261.
99. Vignais, P.; Billoud, B., Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview. *Chemical reviews* **2007**, *107*, 4206-72.
100. Ito, M.; Kotera, M.; Song, Y.; Matsumoto, T.; Tatsumi, K., Structural Models for the Active Site of Acetyl-CoA Synthase: Synthesis of Dinuclear Nickel Complexes Having Thiolate, Isocyanide, and Thiourea on the Nip Site. *Inorganic Chemistry* **2009**, *48* (3), 1250-1256.
101. 27 - Nickel, Palladium and Platinum. In *Chemistry of the Elements (Second Edition)*, Greenwood, N. N.; Earnshaw, A., Eds. Butterworth-Heinemann: Oxford, 1997; pp 1144-1172.
102. Kozłowski, H.; Bal, W.; Dyba, M.; Kowalik-Jankowska, T., Specific structure-stability relations in metallopeptides. *Coordination Chemistry Reviews* **1999**, *184* (1), 319-346.
103. Sjöberg, S., Critical evaluation of stability constants of metal-imidazole and metal-histamine systems (Technical Report). **1997**, *69* (7), 1549-1570.
104. Brookes, G.; Pettit, L. D., 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**, (20), 2112-2117.
105. Szabó-Plánka, T.; Nagy, N. V.; Rockenbauer, A.; Korecz, L., Microspeciation in the copper(II)-L-histidylglycine system. An ESR study by the two-dimensional computer simulation method. *Inorganic Chemistry* **2002**, *41* (13), 3483-3490.
106. Sóvágó, I.; Farkas, E.; Gergely, A., Studies on transition-metal-peptide complexes. Part 7. Copper(II) complexes of dipeptides containing L-histidine. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1982**, (11), 2159-2163.
107. Rainer, M. J. A.; Rode, B. M., The complex formation of copper(II) with GHL and related peptides. *Inorganica Chimica Acta* **1985**, *107* (2), 127-132.

108. Gajda, T.; Henry, B.; Delpuech, J., Complexes of copper(II) ion with histamine-containing dipeptides: Formation constants and structure. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1993**, (8), 1301-1306.
109. Perkins, C. M.; Rose, N. J.; Weinstein, B.; Stenkamp, R. E.; Jensen, L. H.; Pickart, L., The structure of a copper complex of the growth factor glycyl-L-histidyl-L-lysine at 1.1 Å resolution. *Inorganica Chimica Acta* **1984**, 82 (1), 93-99.
110. Morris, P. J.; Bruce Martin, R., Tetramer formation in tetragonal transition metal ion complexes of glycyl-L-histidine. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **1971**, 33 (9), 2913-2918.
111. Wienken, M.; Lippert, B.; Zangrando, E.; Randaccio, L., Gold(III) glycyl-L-histidine dipeptide complexes. Preparation and x-ray structures of monomeric and cyclic tetrameric species. *Inorganic Chemistry* **1992**, 31 (11), 1983-1985.
112. Rabenstein, D. L.; Daignault, S. A.; Isab, A. A.; Arnold, A. P.; Shoukry, M. M., Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. 21. The complexation of zinc by glycylhistidine and alanylhistidine peptides. *Journal of the American Chemical Society* **1985**, 107 (23), 6435-6439.
113. Farkas, E.; Sóvágó, I.; Gergely, A., 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**, (8), 1545-1551.
114. Harford, C.; Sarkar, B., Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-Binding (ATCUN) Motif of Proteins and Peptides: Metal Binding, DNA Cleavage, and Other Properties. *Accounts of Chemical Research* **1997**, 30 (3), 123-130.
115. Gajda, T.; Henry, B.; Aubry, A.; Delpuech, J. J., Proton and Metal Ion Interactions with Glycylglycylhistamine, a Serum Albumin Mimicking Pseudopeptide. *Inorganic Chemistry* **1996**, 35 (3), 586-593.
116. Turi, I.; Sanna, D.; Garribba, E.; Pappalardo, G.; Sóvágó, I., The effect of non-coordinating side chains on the metal binding affinities of peptides of histidine. *Polyhedron* **2013**, 62, 7-17.
117. Best, S. L.; Chattopadhyay, T. K.; Djuran, M. I.; Palmer, R. A.; Sadler, P. J.; Sóvágó, I.; Varnagy, K., Gold(III) and palladium(II) complexes of glycylglycyl-L-histidine: Crystal structures of [AuIII(Gly-Gly-L-His-H-2)]Cl·H₂O and [PdII(Gly-Gly-L-His-H-2)]·1.5H₂O and HiseNH deprotonation. *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions* **1997**, (15), 2587-2596.
118. Pettit, L. D.; Pyburn, S.; Bal, W.; Kozlowski, H.; Bataille, M., A study of the comparative donor properties to CuII of the terminal amino and imidazole nitrogens in peptides. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1990**, (12), 3565-3570.
119. Bal, W.; Kozlowski, H.; Robbins, R.; Pettit, L. D., Competition between the terminal amino and imidazole nitrogen donors for coordination to Ni(II) ions in oligopeptides. *Inorganica Chimica Acta* **1995**, 231 (1-2), 7-12.
120. Várnagy, K.; Szabó, J.; Sóvágó, I.; Malandrinos, G.; Hadjiliadis, N.; Sanna, D.; Micera, G., Equilibrium and structural studies on copper(II) complexes of tetra-, penta- And hexa-peptides containing histidyl residues at the C-termini. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **2000**, (4), 467-472.
121. Damante, C. A.; Ösz, K.; Nagy, Z.; Pappalardo, G.; Grasso, G.; Impellizzeri, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I., The metal loading ability of β -amyloid N-terminus: A combined potentiometric and spectroscopic study of copper(II) complexes with β -amyloid(1-16), its short or mutated peptide fragments, and its polyethylene glycol (PEG)-ylated analogue. *Inorganic Chemistry* **2008**, 47 (20), 9669-9683.
122. Sóvágó, I.; Várnagy, K.; Lihi, N.; Grenács, Á., Coordinating properties of peptides containing histidyl residues. *Coordination Chemistry Reviews* **2016**, 327-328, 43-54.
123. Livera, C. E.; Pettit, L. D.; Bataille, M.; Perly, B.; Kozlowski, H.; Radomska, B., A thermodynamic and spectroscopic study of the proton and copper (II) complexes of L-prolyl-L-histidine, D-prolyl-L-histidine, L-histidyl-L-histidine, and D-histidyl-L-histidine. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1987**, (3), 661-666.
124. Ueda, J.; Ikota, N.; Hanaki, A.; Koga, K., Copper(II) complexes of l-histidylglycyl-l-histidylglycine and l-histidyl-l-histidylglycylglycine: Coordination mode of histidyl residues. *Inorganica Chimica Acta* **1987**, 135 (1), 43-46.

125. Bonomo, R. P.; Bonsignore, F.; Conte, E.; Impellizzeri, G.; Pappalardo, G.; Purrello, R.; Rizzarelli, E., Thermodynamic and spectroscopic characterization and in vitro O₂-scavenger activity of copper (II) glycyl-L-histidyl-glycyl-L-histidine complexes. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1993**, (8), 1295-1300.
126. P. Bonomo, R.; Casella, L.; De Gioia, L.; Molinari, H.; Impellizzeri, G.; Jordan, T.; Pappalardo, G.; Purrello, R.; Rizzarelli, E., Metal ion and proton stabilisation of turn motif in the synthetic octapeptide histidyltris(glycylhistidyl)glycine. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1997**, (14), 2387-2390.
127. Jancsó, A.; Selmeczi, K.; Gizzi, P.; Nagy, N. V.; Gajda, T.; Henry, B., The role of terminal amino group and histidine at the fourth position in the metal ion binding of oligopeptides revisited: Copper(II) and nickel(II) complexes of glycyl-glycyl-glycyl-histamine and its N-Boc protected derivative. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2011**, 105 (1), 92-101.
128. Józai, V.; Nagy, Z.; Ösz, K.; Sanna, D.; Di Natale, G.; La Mendola, D.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I., Transition metal complexes of terminally protected peptides containing histidyl residues. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006**, 100 (8), 1399-1409.
129. Timári, S.; Kállay, C.; Sz, K.; Sóvágó, I.; Várnagy, K., Transition metal complexes of short multihistidine peptides. *Dalton Transactions* **2009**, (11), 1962-1971.
130. Bóka, B.; Myari, A.; Sóvágó, I.; Hadjiliadis, N., Copper(II) and zinc(II) complexes of the peptides Ac-HisValHis-NH₂ and Ac-HisValGlyAsp-NH₂ related to the active site of the enzyme CuZnSOD. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2004**, 98 (1), 113-122.
131. Kállay, C.; Sz, K.; Dávid, A.; Valastyán, Z.; Malandrinos, G.; Hadjiliadis, N.; Sóvágó, I., Zinc(ii) binding ability of tri-, tetra- and penta-peptides containing two or three histidyl residues. *Dalton Transactions* **2007**, (36), 4040-4047.
132. Rajković, S.; Kállay, C.; Serényi, R.; Malandrinos, G.; Hadjiliadis, N.; Sanna, D.; Sóvágó, I., Complex formation processes of terminally protected peptides containing two or three histidyl residues. Characterization of the mixed metal complexes of peptides. *Dalton Transactions* **2008**, (37), 5059-5071.
133. Kállay, C.; Várnagy, K.; Malandrinos, G.; Hadjiliadis, N.; Sanna, D.; Sóvágó, I., Copper(ii) complexes of terminally protected pentapeptides containing three histidyl residues in alternating positions, Ac-His-Xaa-His-Yaa-His-NH₂. *Dalton Transactions* **2006**, (38), 4545-4552.
134. Sóvágó, I.; Ösz, K., Metal ion selectivity of oligopeptides. *Dalton Transactions* **2006**, (32), 3841-3854.
135. Cherifi, K.; Reverend, B. D.-L.; Loucheux, C.; Varnagy, K.; Kiss, T.; Sovago, I.; Kozłowski, H., Transition metal complexes of L-cysteine containing Di- and tripeptides. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1990**, 38 (1), 69-80.
136. Kozłowski, H.; Révérénd, B. D.-L.; Ficheux, D.; Loucheux, C.; Sovago, I., Nickel(II) complexes with sulfhydryl containing peptides. potentiometric and spectroscopic studies. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1987**, 29 (3), 187-197.
137. Sóvágó, I.; Kállay, C.; Várnagy, K., Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, 256 (19), 2225-2233.
138. Kulon, K.; Woźniak, D.; Wegner, K.; Grzonka, Z.; Kozłowski, H., Specific interactions of metal ions with Cys-Xaa-Cys unit inserted into the peptide sequence. *J Inorg Biochem* **2007**, 101 (11-12), 1699-706.
139. Lukács, M.; Csilla Pálinskás, D.; Szunyog, G.; Várnagy, K., Metal Binding Ability of Small Peptides Containing Cysteine Residues. *ChemistryOpen* **2021**, 10 (4), 451-463.
140. Gockel, P.; Vogler, R.; Vahrenkamp, H., Solution behavior and zinc complexation of dipeptides made up solely from histidine and cysteine. *Chemische Berichte* **1996**, 129 (8), 887-895.
141. Gockel, P.; Vogler, R.; Gelinsky, M.; Meißner, A.; Albrich, H.; Vahrenkamp, H., Zinc complexation of cyclic dipeptides containing cysteine and/or histidine. *Inorganica Chimica Acta* **2001**, 323 (1), 16-22.
142. Lihi, N.; Sanna, D.; Bányai, I.; Várnagy, K.; Sóvágó, I., Unusual binding modes in the copper(ii) and palladium(ii) complexes of peptides containing both histidyl and cysteinyl residues. *New Journal of Chemistry* **2017**, 41 (3), 1372-1379.

143. Raics, M.; Lihi, N.; Laskai, A.; Kállay, C.; Várnagy, K.; Sóvágó, I., Nickel(ii), zinc(ii) and cadmium(ii) complexes of hexapeptides containing separate histidyl and cysteinyl binding sites. *New Journal of Chemistry* **2016**, 40 (6), 5420-5427.
144. Chekmeneva, E.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., Identification of heavy metal complexes of a hexapeptide inhibitor of the human immunodeficiency virus integrase protein by using a voltammetric approach. *Analytical Biochemistry* **2006**, 348 (2), 252-258.
145. Yousef, E. N.; Angel, L. A., Comparison of the pH-dependent formation of His and Cys heptapeptide complexes of nickel(II), copper(II), and zinc(II) as determined by ion mobility-mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2020**, 55 (3), e4489.
146. Lin, Y.-F.; Yousef, E. N.; Torres, E.; Truong, L.; Zahnow, J. M.; Donald, C. B.; Qin, Y.; Angel, L. A., Weak Acid-Base Interactions of Histidine and Cysteine Affect the Charge States, Tertiary Structure, and Zn(II)-Binding of Heptapeptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2019**, 30 (10), 2068-2081.
147. Sènèque, O.; Latour, J.-M., Coordination Properties of Zinc Finger Peptides Revisited: Ligand Competition Studies Reveal Higher Affinities for Zinc and Cobalt. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132 (50), 17760-17774.
148. Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A., SUPERQUAD: an improved general program for computation of formation constants from potentiometric data. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1985**, (6), 1195-1200.
149. Zekany, L.; Nagypal, I., PSEQUAD. In *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, Leggett, D. J., Ed. Springer US: Boston, MA, 1985; pp 291-353.
150. *Chemical Equilibrium Diagrams*, 2020.
151. Irving, H. M.; Miles, M. G.; Pettit, L. D., A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode. *Analytica Chimica Acta* **1967**, 38, 475-488.
152. Császár, J.; Bán, M., *Optikai színekép, ligandumtér-elmélet, komplexszerkezet*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1972.
153. Chang, J. W.; Martin, R. B., Visible circular dichroism of planar nickel ion complexes of peptides and cysteine and derivatives. *The Journal of Physical Chemistry* **1969**, 73 (12), 4277-4283.
154. Klewpatinond, M.; Viles, J. H., Empirical rules for rationalising visible circular dichroism of Cu²⁺ and Ni²⁺ histidine complexes: applications to the prion protein. *FEBS Lett* **2007**, 581 (7), 1430-4.
155. Sigel, H.; Martin, R. B., Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands. *Chemical Reviews* **1982**, 82 (4), 385-426.
156. Heinz Engelhardt, W. B., Thomas Schmitt, *Capillary electrophoresis*. Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH: Braunschweig/Wiesbaden, 1996.
157. Goldstein, S.; Michel, C.; Bors, W.; Saran, M.; Czapski, G., A critical reevaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity. *Free Radic Biol Med* **1988**, 4 (5), 295-303.
158. *SCIENTIST*, version 2.0, 2.0; Micromath Software: Salt Lake City, UT, USA, 1995.
159. Grenács, Á.; Lihi, N.; Sóvágó, I.; Várnagy, K., The influence of penicillamine/cysteine mutation on the metal complexes of peptides. *Dalton Transactions* **2017**, 46 (39), 13472-13481.
160. Lihi, N.; Grenács, Á.; Timári, S.; Turi, I.; Bánya, I.; Sóvágó, I.; Várnagy, K., Zinc(ii) and cadmium(ii) complexes of N-terminally free peptides containing two separate cysteinyl binding sites. *New Journal of Chemistry* **2015**, 39 (11), 8364-8372.
161. Pfaff, F. F.; Heims, F.; Kundu, S.; Mebs, S.; Ray, K., Spectroscopic capture and reactivity of S = 1/2 nickel(iii)-oxygen intermediates in the reaction of a NiII-salt with mCPBA. *Chemical Communications* **2012**, 48 (31), 3730-3732.
162. Thomas, F., Ligand-centred oxidative chemistry in sterically hindered salen complexes: an interesting case with nickel. *Dalton Transactions* **2016**, 45 (27), 10866-10877.
163. Kim, S.; DiCosimo, R.; San Filippo, J., Spectrometric and chemical characterization of superoxide. *Analytical Chemistry* **1979**, 51 (6), 679-681.
164. User Manual - SX20 Stopped Flow Spectrometer. <https://www.photophysics.com/faqs/methods-techniques/stopped-flow-faqs/> (accessed 2025.12.09.).

165. Tietze, D.; Sartorius, J.; Koley Seth, B.; Herr, K.; Heimer, P.; Imhof, D.; Mollenhauer, D.; Buntkowsky, G., New insights into the mechanism of nickel superoxide degradation from studies of model peptides. *Sci Rep* **2017**, 7 (1), 17194.

8. Függelék

Az értekezés alapját képző közlemények

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények

1. N. Lihi, D. Kelemen, N. V. May, I. Fábián, **The Role of the Cysteine Fragments of the Nickel Binding Loop in the Activity of the Ni(II)-Containing SOD Enzyme**, *Inorganic Chemistry*, 59 (2020) 4772-4780
[Q1, IF.: 5,165, Cit.: 14/22]
2. D. Kelemen, N. V. May, M. Andrási, A. Gáspár, I. Fábián, N. Lihi, **High enzyme activity of a binuclear nickel complex formed with the binding loops of the NiSOD enzyme**, *Chemistry - A European Journal*, 26 (2020) 1676-16773
[D1, IF.: 5,236, Cit.: 1/8]
3. D. Bonczidai-Kelemen, G. Sciortino, N. V. May, E. Garribba, I. Fábián, N. Lihi, **Introducing the penicillamine moiety into a metalloprotein mimicking the NiSOD enzyme: electronic and kinetic effects**, *Inorganic Chemistry Frontiers*, 9 (2022) 310-322
[D1, IF.: 7,779, Cit.: 2/8]
4. D. Bonczidai-Kelemen, K. Tóth, I. Fábián, N. Lihi, **The role of the terminal cysteine moiety in a metalloprotein mimicking the active site of the NiSOD enzyme**, *Dalton Transactions*, 53 (2024) 1648-1656
[Q2, IF.: 3,3, Cit.: 3/4]
5. Bonczidai-Kelemen D., Fábián I., Borsos A., Lihi N., **Nikkeliont tartalmazó szuperoxid dizmutáz (SOD) enzimmodellek SOD aktivitásának vizsgálata**, *Scientia et Securitas*, 6 (2026) 296-304
[D hazai]

Az értekezés anyagához szorosan nem kapcsolódó közlemények

1. Sz. Bunda, N. V. May, D. Bonczidai-Kelemen, A. Udvardy, H. Y. V. Ching, K. Nys, M. Samanipour, S. Van Doorslaer, F. Joó, N. Lihi, **Copper(II) Complexes of Sulfonated Salan Ligands: Thermodynamic and Spectroscopic Features and Applications for Catalysis of the Henry Reaction**, *Inorganic Chemistry*, 60 (2021) 11259-11272
[Q1, IF.: 5,436, Cit.: 9/10]
2. R. Diószegi, D. Bonczidai-Kelemen, A. Cs. Bényei, N. V. May, I. Fábián, N. Lihi, **Copper(II) Complexes of Pyridine-2,6-dicarboxamide Ligands with High SOD Activity**, *Inorganic Chemistry*, 61 (2022) 2319-2332
[Q1, IF.: 5,436, Cit.: 16/20]

3. N. Lihi, N. V. May, A. Udvardy, F. Najóczki, D. Bonczidai-Kelemen, R. Diószegi, D. Szalóki, Sz. Santa, I. Fábián, **Complexes of 1,10-phenanthroline-mono-N-oxides with copper(II) and nickel(II) in aqueous solution and solid phase**, *Inorganica Chimica Acta*, 557 (2023) 121715
[Q2, IF.: 2,96, Cit.: 2/2]
4. D. Szalóki, M. Szabó, D. Bonczidai-Kelemen, A. Udvardy N. V. May, K. Kovács, L. Virág, I. Fábián, N. Lihi, **Chromone-Based Antioxidant Copper(II) Complex with High Superoxide Dismutase Activity**, *Inorganic Chemistry*, 64 (2025) 21718-21729
[Q1, IF.: 4,735, Cit.: 2/2]
5. R. Diószegi, A. Guidetti, N. Ág, I. Serra, D. Szalóki, D. Bonczidai-Kelemen, N. V. May, E. Fekete, L. Karaffa, I. Fábián, N. Lihi, **Highly active superoxide dismutase mimic: pyridine carboxamide-based copper(ii) complexes**, *Inorganic Chemistry Frontiers*, 12 (2025) 8690-8705
[D1, IF.: 6,4, Cit.: 1/1]

Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások

1. Bonczidai-Kelemen Dóra, May Nóra Veronika, Fábián István, Lihi Norbert: **Egy új dinukleáris nikkel-komplex, mint potenciális NiSOD modell**. *XLIII. Kémiai Előadói Napok*, online platform, 2020. október 28.
2. Bonczidai-Kelemen Dóra, May Nóra Veronika, Fábián István, Lihi Norbert: **NiSOD enzimmodellek katalitikus sajátságai**. *54. Komplexkémiái Kollokvium*, online platform, 2021. május 26.
3. Bonczidai-Kelemen Dóra, May Nóra Veronika, Fábián István, Lihi Norbert: **Szuperoxid-dizmutáz vizsgálatok NiSOD enzimmodellekben**. *Reakciókinetikai és Fotokémiai Munkabizottsági Ülés*, online platform, 2021. május 27.
4. Bonczidai-Kelemen Dóra, May Nóra Veronika, Fábián István, Lihi Norbert: **NiSOD enzimmodellek koordinációs és kinetikai sajátságai**. *II. FKF Szimpózium*, online platform, 2021. június 18.
5. Norbert Lihi, Dóra Bonczidai-Kelemen, Nóra V. May, István Fábián: **Coordination chemistry and catalytic activity of a NiSOD related metallopeptide**. *5th European Colloquium on Inorganic Reaction Mechanisms (ECIRM)*, Kraków, 2022. September 21-23.
6. Norbert Lihi, Klaudia Tóth, Dóra Bonczidai-Kelemen, Nóra V. May, István Fábián: **NiSOD related metalloptides: coordination chemistry and superoxide dismutase**

- activity.** 16th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC), Ioannina, 2023. June 11-14.
7. Lihi Norbert, Tóth Klaudia, Bonczidai-Kelemen Dóra, May Nóra V., Fábián István: **NiSOD metallopeptidek: koordinációs kémia és SOD aktivitás.** 56. Komplexkémiái Kollokvium, Szeged, 2023. május 31.
 8. Bonczidai-Kelemen Dóra, May Nóra Veronika, Fábián István, Lihi Norbert, **NiSOD enzimmodellek: egyensúly, spektroszkópia, kinetika.** 57. Komplexkémiái Kollokvium, Szeged, 2024. május 28.
 9. Dóra Bonczidai-Kelemen, Róbert Diószegi, István Fábián, Norbert Lihi: **SOD activity measurement of superoxide dismutase mimics.** 6th European Colloquium on Inorganic Reaction Mechanisms (ECIRM), Toulouse, 2024. September 8-11.
 10. Bonczidai-Kelemen Dóra, May Nóra Veronika, Fábián István, Lihi Norbert: **SOD-aktivitás vizsgálat NiSOD enzimmodellek esetében.** 58. Komplexkémiái Kollokvium, Balatonszárszó, 2025. május 28.
 11. Bonczidai-Kelemen Dóra, May Nóra Veronika, Fábián István, Lihi Norbert: **SOD-aktivitás mérési módszerek NiSOD enzimmodellek esetén,** Intézményi EKÖP Konferencia, Debrecen, Magyarország, 2025. június 19-20.