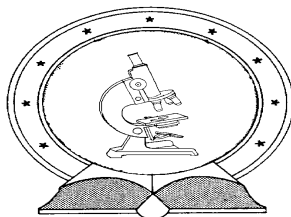


DE TTK



1949

**FEHÉRJÉK FÉMIONKÖTŐHELYEIT MODELLEZŐ
PEPTIDEK KOORDINÁCIÓS ÉS REDOXI
SAJÁTSÁGAI**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Csire Gizella

Témavezető: Dr. Várnagy Katalin egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi Doktori Tanács
Kémiai Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2017

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács **Kémiai Tudományok Doktori Iskola K/2 programja** keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.*

Debrecen, 2017. május 17.

a jelölt aláírása

*Tanúsítom, hogy **Csire Gizella** doktorjelölt **2013 - 2016** között a fent megnevezett Doktori Iskola **K/2** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.*

Debrecen, 2017. május 17.

a témavezető aláírása

FEHÉRJÉK FÉMIONKÖTŐHELYEIT MODELLEZŐ PEPTIDEK KOORDINÁCIÓS ÉS REDOXI SAJÁTSÁGAI

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

Írta: **Csire Gizella** okleveles vegyész

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

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

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Joó Ferenc
tagok: Dr. Gyurcsik Béla
Dr. Lente Gábor

A doktori szigorlat időpontja: 2016. október 28.

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2017.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm *Dr. Fábrián István* tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette számomra doktori munkám elkészítését a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken.

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, *Dr. Várnagy Katalin* egyetemi tanárnak sokoldalú segítségéért, hasznos és értékes tanácsaiért, biztatásáért.

Köszönettel tartozom *Dr. Kállay Csilla* tudományos főmunkatársnak, aki a doktori munkám során bevezetett az oxidáció rejtjelmeibe, végig kísérte munkámat és bármikor, bármilyen kérdéssel fordulhattam hozzá.

Köszönet illeti *Dr. Farkas Etelka* professor emeritát, *Dr. Sóvágó Imre* professor emeritust és *Dr. Buglyó Péter* egyetemi docenst, akik szívesen segítettek, ha kérdések merültek fel bennem.

Köszönettel tartozom a *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport* minden régi és jelenlegi tagjának, mert kérdéseimre választ adtak, és baráti légkört biztosítottak a munkám elvégzéséhez. Külön köszönöm *Dr. Baginé Dr. Timári Saroltának*, hogy megtanította a műszerek használatát, és tanácsért mindig fordulhattam hozzá. Köszönet illeti *Dr. Fáriné Turi Ildikót*, *Dr. Földi-Bíró Lindát*, *Dr. Lekkáné Szabó Orsolyát* és a D431-es szoba jelenlegi ifjú PhD hallgatóit szakmai, emberi támogatásukért és hogy egy-egy humorbonbonnal mindig megajándékoztak. Külön szeretném megköszönni *Dávid Ágnesnek*, *Dr. Grenács Ágnesnek*, *Bihari Zsoltnak* és *Lihi Norbertnek*, hogy bármiben számíthattam rájuk, mind emberi mind szakmai tekintetben a segítségemre voltak. Örömmel tölt el, hogy az életem részévé váltak és, hogy ilyen önzetlen, segítőkész barátokra tehettem szert.☺

Köszönet illeti *Hüse Ilona* vegyésztechnikust, *Godó Attila* műszaki ügyintézőt, valamint *Fekete Orsolya* vegyésztechnikust, akik segítségemre voltak a munkám során.

Szeretném megköszönni *Nagyné Dombi Gizella* tanszéki irodavezetőnek a hivatalos ügyek intézésében nyújtott segítségét.

Köszönöm *Dr. Kurtán Tibornak* a cirkuláris dikroizmus mérésekben nyújtott segítségét, *Dr. Nagy Lajosnak* az MS spektrumok felvételét és kiértékelésben nyújtott önzetlen segítségét.

Végül, de nem utolsósorban őszintén köszönöm családomnak és barátaimnak, külön kiemelve *a szüleimet, testvéreimet, keresztfiamat, józsai unokatestvéreimet és családját*, illetve a volt kollégiumi szobatársamat *Németh Nikolettet* és párját *Sebestyén Gergelyt*, folyamatos támogatásukat, szeretetüket és azt, hogy mindig bátorítottak és mellettem álltak az elmúlt évek során.♥

A kutatások anyagi támogatásáért az OTKA K 72956, K 115480, NK 105156 számú pályázatoknak, illetve a TAMOP 4.2.4.B/2-11/1-2012-0001 Campus Hungary ösztöndíj pályázatnak tartozunk köszönettel. A kutatás az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg. A kutatáshoz a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0043 (ENVIKUT) és GINOP-2.3.2-15-2016-00008 számú projekt is hozzájárult.

TARTALOMJEGYZÉK

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata	1
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	3
2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK	5
2.1. A Cu,Zn-SOD enzim	5
2.2. A humán prion fehérje (Hu-PrP^C) és a prion betegség	7
2.3. A reaktív oxigén származékok (ROS) szerepe az élő szervezet működésében	8
2.4. Cu(II)-, Ni(II)-komplexek	10
2.4.1. Aminosavak, peptidek komplexkémiai sajátosságai	10
2.4.2. Egy hisztidint tartalmazó terminálisan védett peptidek komplexkémiai viselkedése	12
2.4.3. Több hisztidint tartalmazó terminálisan védett peptidek komplexkémiai viselkedése	16
2.5. Cu(II)-komplexek redoxi sajátosságai, SOD modell Cu(II)-komplexek 26	
2.6. Fehérjék oxidációja	31
3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK ÉS ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	34
3.1. Felhasznált vegyszerek, vizsgált ligandumok	34
3.2. Szilárdfázisú peptidszintézis	36
3.3. pH-potenciometria	38
3.4. UV-látható spektrofotometria	41
3.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia	42
3.6. Ciklikus voltammetria	44
3.7. SOD enzim aktivitás mérése	46
3.8. Oxidáció körülményei	47
3.9. Tömegspektrometria (ESI-TOF-MS)	48
4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK	50
4.1. A humán prion fehérje fragmensének és mutánsainak komplexképző sajátosságai	50
4.1.1. A humán prion fehérje fragmensének és mutánsainak sav-bázis sajátosságai	50

4.1.2. A humán prion fehérje fragmensének és mutánsainak Cu(II)-komplexei	51
4.1.3. A humán prion fehérje fragmensének és mutánsainak Ni(II)-komplexei	54
4.2. Több hisztidint tartalmazó ligandumok komplexképző sajátosságai	56
4.2.1. A Cu,Zn-SOD enzimet modellező peptidek sav-bázis sajátosságai .	56
4.2.2. A Cu,Zn-SOD enzimet modellező peptidek Cu(II)-komplexei....	58
4.2.3. A Cu,Zn-SOD enzimet modellező peptidek Ni(II)-komplexei.....	67
4.3. A Cu,Zn-SOD enzimet modellező peptidek Cu(II)-komplexeinek redoxi sajátosságai	71
4.4. A Cu,Zn-SOD enzimet modellező peptidek Cu(II)-komplexeinek SOD aktivitása	75
4.5. A humán prion fehérje fragmensének és mutánsainak oxidációs vizsgálata	81
5. ÖSSZEFOGLALÁS	89
6. SUMMARY	92
7. IRODALOMJEGYZÉK	95
8. FÜGGELÉK	106

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata

a, b, c	a peptid fragmentálódása során keletkező termék, amely az N-terminális felőli molekularészletet foglalja magába
Ac	acetylsoport (védőcsoport)
Ac ₂ O	ecetsavanhidrid
ACN, MeCN	acetonitril, CH ₃ CN
Ac-S1H2-NH ₂	Ac-HisSarHis-NH ₂
Ac-S2H3-NH ₂	Ac-HisSarHisSarHis-NH ₂
Ac-S3H4-NH ₂	Ac-HisSarHisSarHisSarHis-NH ₂
Ala, A	alanin
apo-SOD	a szuperoxid diszmutáz enzim fehérje része
Arg, R	arginin
Asn, N	aszparagin
Asp, D	aszparaginsav
Boc	<i>tert</i> -butil-oxikarbonil (védőcsoport)
Bzl	benzil (védőcsoport)
CD	cirkuláris dikroizmus
CJD	Creutzfeldt-Jakob kór
CNS	központi idegrendszer
COO ⁻	karboxilátcsoport
CT sáv	töltésátviteli sáv (Charge Transfer)
CV	ciklikus voltammetria
Cys, C	cisztein
CCS	fehérje, ami a rezet szállítja a SOD enzimhez (chaperon)
DCM	diklórmétán
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropil-etilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DODT	2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol
EDT	etán-1,2-ditiol
ER	endoplazmatikus retikulum
ESI	elektroporlasztásos ionizáció (ElectroSpray Ionization)
Fmoc	9-fluorenil-metoxi-karbonil (védőcsoport)
Gln, Q	glutamin
Glu, E	glutaminsav
Gly, G	glicin
GPI	glikozil-foszfatidil-inozitol
His, H	hisztidin
His-BIMA	hisztidil-bisz(2-imidazolil)-metil-amin
HOBt	<i>N</i> -hidroxi-benzotriazol
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High-Performance Liquid Chromatography)

Fehérjék fémionkötőhelyeit modellező peptidek koordinációs és redoxi sajátosságai

HuPrP(60-114)	Ac-PHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQ-CGGTHSQWNKPSKPKTNMKHMAG-NH ₂
HuPrP(84-114)H85A	Ac-PAGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHMAG-NH ₂
HuPrP(84-114)H96A	Ac-PHGGGWGQGGGTASQWNKPSKPKTNMKHMAG-NH ₂
Lys, K	lizin
MCO	fémionkatalizált oxidáció
Me	metilcsoport
Met, M	metionin
MS	tömegspektrometria
N ⁻	deprotonált amidnitrogén
NBT	nitroblue-tetrazólium-klorid
NH ₂	aminocsoport
NHE	normál hidrogén elektród
N(Im)	imidazolnitrogén
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirrolidon
<i>O</i> tBu	<i>O-terc</i> -butil
PEG	polietilén-glikol
Phe, F	fenilalanin
Pro, P	prolin
PrP ^C	celluláris prion fehérje
PrP ^{Sc}	kóros szerkezetű prion fehérje
ROS	reaktív oxigén származékok
Sar	szarkozin
SCE	kalomel elektród
Ser, S	szerin
SOD	szuperoxid diszmutáz
TBTU	2-(1- <i>H</i> -benztriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium tetrafluoroborát
<i>t</i> Bu	<i>terc</i> -butil (védőcsoport)
TFA	trifluoecetsav
Thr, T	treonin
TIS	triizopropil-szilán
TOF	repülési idő (time of flight)
Trp, W	triptofán
Trt	tritol
Tyr, Y	tirozin
UV-vis	UV-látható spektrofotometria (UV-visible)
Val, V	valin
x, y, z	a peptid fragmentálódása során keletkező termék, amely a C-terminális felőli molekularészletet foglalja magába

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Egyes fémionok létfontosságúak az élő szervezet működésében. Funkciójukat tekintve több szerepet is betölthetnek: lehetnek szerkezetalakítók, aktiválhatnak enzimeket, katalizálhatnak reakciókat azáltal, hogy oxidációs állapotuk megváltozik a folyamat során. Továbbá az is ismert, hogy különböző idegrendszeri betegségekben (mint például az Alzheimer kór vagy a prion betegségek) fontos szerepet játszanak, különösképpen azok, amelyek redoxaktívak. Az élő szervezetben ezen fémionok megkötésére a legideálisabb ligandumok a fehérjék. A fehérjékben található aminosavak közül a hisztidin imidazolnitrogénje az, amely nagyon gyakran fémionok kötődési helye.

A Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz (Cu,Zn-SOD) enzim és a humán prion protein (Hu-PrP^C) két eltérő funkcióban szerepet játszó (metallo)protein, de közös pont, hogy mindkettőben az imidazolnitrogén a horgonydonor, illetve, hogy mindkettő esetén a fémion kötődése Cu(II) formában kedvezményezettebb. Ugyanakkor a Cu(II)/Cu(I) átalakulás is igen fontos szerepet játszik/játszhat a működésükben.

A Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz (Cu,Zn-SOD) enzim egy metalloenzim és az eukarióták sejtjeiben működik. Ezen enzim aktív centrumában egy Cu(II)- és egy Zn(II)-ion található. A Cu(II)-ion három imidazolnitrogénhez, míg a Zn(II)-ion két imidazolnitrogénhez és egy aszparaginsav karboxilátcsoportjához kapcsolódik és a két fémiont még egy imidazolátohid is összeköti. Ez az enzim az élő szervezetben található szuperoxid gyökkanionok bontásáért felelős. Az aktív centrumban található réz(II)ion vesz részt a káros gyökök bontásában, míg a cink(II)ionnak szerkezetalakító szerepe van.

A másik fehérje a humán prion protein (Hu-PrP^C), amely tartalmaz egy PHGGGWGQ tartományt, ahol ez a szekvencia négyszer ismétlődik egymás után és ezt tartják a fő Cu(II)-ionkötőhelynek a fehérjében, bár ez a rész nem rendelkezik rendezett szerkezettel. A Hu-PrP^C réz anyagcserében betöltött funkciója még nem teljesen tisztázott. Korábban azt állapították meg, hogy részt vesz a réz szállításában, anyagcseréjében és védi a sejtet a káros oxidatív hatásokkal szemben az intracelluláris SOD aktivitás szabályozásán keresztül. Mára inkább az a kép alakult ki, hogy redoxi szenzor és a feleslegben lévő Cu(II)-ionokat köti meg, és védi a neuronokat az oxidatív károsodás ellen.

Ezenkívül ismert az is, hogy a fehérjék oxidációjáért mind a fémionok, mind a szabadgyökök együttesen felelősek, úgynevezett fémionkatalizált oxidációban (MCO) vesznek részt, ezzel károsítva a fehérjét. Emiatt elveszíthetik funkciójukat, nem tudják betölteni az élő szervezetben ellátott szerepüket. Továbbá proteázrezisztenssé is válhatnak, lerakódhatnak különböző szövetekben és tönkre tehetik azokat a szerveket, amelyekben felhalmozódtak, ez nagy valószínűséggel betegségek kialakulásához vezet.

A fent említett fehérjéket mind szerkezetük megismerésében, mind funkciójukat tekintve kiterjedten vizsgálták már korábban különböző kutatócsoportok. A Debreceni Egyetem *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában* mindkét fehérje fémionkötőhelyeinek vizsgálata is a kutatási irányvonalak tárgyát képezik, és ezen a két területen folyó kutatásokhoz kapcsolódott a doktori munkám.

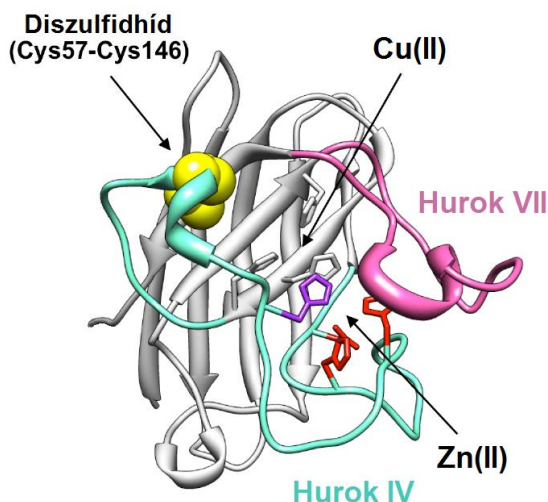
Munkánk során célul tűztük ki:

- a humán prion fehérje 103-112 fragmensének és négy mutánsának szintézisét, Cu(II)- és Ni(II)-komplexeinek jellemzését,
- a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumának modellezésére potenciálisan alkalmas terminálisan védett multihisztidin peptidek tervezését és szintézisét,
- a multihisztidin ligandumok Cu(II)- és Ni(II)-komplexei összetételének, stabilitásának és szerkezetének meghatározását,
- ugyanezen modellpeptidek Cu(II)-komplexeinek elektrokémiai vizsgálatát annak eldöntésére, hogy a komplexek alkalmas modelljei lehetnek-e a Cu,Zn-SOD enzimnek,
- a megfelelő elektrokémiai paraméterekkel jellemezhető Cu(II)-komplexek SOD aktivitásának meghatározását,
- a humán prion fehérje 103-112 fragmensének és mutánsainak oxidációs vizsgálatát, annak megállapítására, hogy a Cu(II)/H₂O₂ rendszer oxidálja-e a szekvenciában található oxidációra érzékeny hisztidin és metionin aminosavakat.

2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

2.1. A Cu,Zn-SOD enzim

A Cu,Zn-szuperoxid diszmutáz enzim nagy mennyiségben az élő szervezetben a citoszolban található¹. Két alegységből épül fel, amelyből egy 153 aminosavat tartalmaz.²⁻⁴ Mindkét alegység aktív centrumában megtalálható a Cu(II)- és Zn(II)-ion. Az alegység *szerkezetét tekintve* egy β -hordóból és két hurokból (IV, VI) áll (1. ábra)⁵. A β -hordót 8 antiparallel elrendezésű β -redő alkotja, a hurkok az előbb említett szerkezeten kívül helyezkednek el. A IV-es hurokban a Zn(II)-ion megkötéséért felelős oldalláncok, úgymint a His63, His71 és His80 és a diszulfid kötésben résztvevő Cys57 van jelen. A VII-es hurok az aktív üreg csatornát képezi, amelyek oldalláncai létrehoznak egy pozitív elektrosztatikus teret, ezáltal elősegítik a szuperoxid gyökianion kötődését és eljutását a Cu(II)-ionhoz.⁶⁻⁷

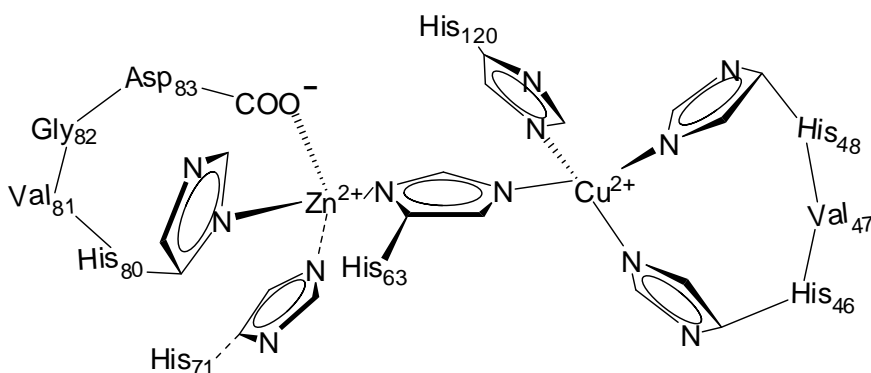


1. ábra: Cu,Zn-SOD enzim szerkezete

A Cu(II)-ion megkötéséért felelős oldalláncok (His46, His48, His120) és a Zn(II)-ion stabilizálásában résztvevő Asp83 együttesen két β -redőben foglalnak helyet. A diszulfidhíd kialakításában a Cys57-en kívül a Cys146 vesz részt. Ezenkívül a szekvenciában található további két cisztein (Cys6, Cys111), amelyek tiolcsoportja oxidációra érzékeny, hiszen azok között nem alakul ki diszulfidhíd.⁵ Két alegység egymással ellentétesen helyezkedik el és hidrofób kölcsönhatások tartják össze. A fehérje nagy kinetikai és termodinamikai stabilitással rendelkezik, amiért a fémionok és a diszulfidhíd felelősek továbbá a monomer-dimer egyensúlya is ezek által szabályozott.⁸⁻¹⁵ A CCS nevezetű chaperon (kísérő) fehérje szállítja és adja át a rezet Cu(I)-ion formában az apo-SOD enzimnek.¹⁶⁻¹⁷ A kísérő fehérjét már korábban részletesen tanulmányozták: három doménből áll,

amelyek közül a II-es közvetlen kölcsönhatásban van a humán SOD dimerrel.¹⁸⁻²¹ A CCS nemcsak a fémion átadásáért felelős, hanem elősegíti annak oxidációját Cu(II)-ionná és valószínűleg eközben alakul ki a diszulfidhíd is.

Az enzim legfontosabb része az *aktív centrum* (2. ábra), mert ez felelős a szabad szuperoxidgyökanyon elbontásáért. A Cu(II)-ionhoz három hisztidin (H46, H48, H120), míg a Zn(II)-ionhoz két hisztidin imidazolnitrogén (His71, His80) és a 83-as pozícióban található aszparaginsav β -karboxilátcsoportja koordinálódik. A két fémiont egy imidazolátohid köti össze és ezt a szerepet a His63 tölti be.²² A Cu(II)-ion környezetében továbbá jelen van még két vízmolekula is, illetve a szekvenciában a 143-as pozíciójú arginin hidrogénkötés kialakításával stabilizálja az aktív helyet. A Cu(II)-ion koordinációs szférája erősen torzult, átmenetet képez a négyzetes piramis és trigonális bipiramisos geometria között, míg a Zn(II)-ioné közel tetraéderes szerkezetű.



2. ábra: A Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumának szerkezete

A reakció során (1-2. egyenlet) a szuperoxid gyökanyont a Cu(II)-ion bontja el „ping-pong” mechanizmussal²³, amelyben a Cu(II)-ion ötödik pozíciójában lévő axiális helyzetben kötött vízmolekulát kiszorítja a O_2^- – ennek egyik oxigénje kötődik a Cu(II)-ionhoz, a másik hidrogénkötéssel az Arg143-hoz – és ez indukálja azt, hogy a Cu(II)-ion redukálódjon Cu(I)-ionná. Eközben a két fémion között jelenlévő His63 aminosavval kialakított imidazolátohid felbomlik és ennek eredményeként megjelenik az O_2 molekula, amely az első lépés terméke. A Cu(I)-ion körül tetraéderes geometria alakul ki. A második lépésben a következő szabadgyök elbontása megy végbe, amely folyamatban H_2O_2 képződik és oxidálódik a Cu(I)-ion Cu(II)-ionná.³ A Zn(II)-ionnak nemcsak szerkezetalkító, hanem katalitikus szerepe is van, fokozza az enzim aktivitását. Összegezve: az enzim egyetlen katalitikus ciklus során két szuperoxid gyökanyont képes átalakítani, miközben a réz(II)ion oxidációs állapota ciklikusan Cu(II) \rightarrow Cu(I) \rightarrow Cu(II) sorrendben változik, geometriája a négyzetes piramis \rightarrow torzult tetraéder \rightarrow négyzetes piramis változásokon megy át.



2.2. A humán prion fehérje²⁴ (Hu-PrP^C) és a prion betegség²⁵

A humán prion fehérje (Hu-PrP^C) 253 aminosavból épül fel és főleg a neuronokon expresszálódik. Megtalálható a testszövetekben és nagy mennyiségben a központi idegrendszerben (CNS) is. Legnagyobb mennyiségben az agyban, a szinaptikus membránokon van jelen, a Cu(II)-ionkötődés által a fehérje a szinaptikus résben is jelen van, és hatással van az idegingerület átvitelre. A sejtmembránhoz egy GPI (glikozil-foszfatidil-inozitol) horgonyon keresztül kötődik.

Az N-terminális részben található az oktarepeat (60-91) tartomány, ahol a PHGGGWGQ szekvencia négyszer ismétlődik egymás után és ezt tartják a fő Cu(II)-ionkötőhelynek a fehérjében, bár a proteinek ez a része nem rendelkezik rendezett szerkezettel.²⁶⁻²⁸ A C-terminális rendezett rész a 125-228 aminosavszekvenciát foglalja magába, ami három α -hélixet – ezekből kettőt diszulfidhíd köt össze – és két β -redőt tartalmaz. Ebben van jelen az úgynevezett neurotoxikus tartomány (106-126), amely a toxikus PrP^{Sc}-hez (erről a továbbiakban még bővebben lesz szó) hasonló hatása miatt kapta a nevét. Azért is nevezik toxikusnak, mert ha a fehérje aggregációja megindul, akkor ebben a tartományban kezdődik meg a szerkezetátalakulás és a C-terminus felé halad, ennek következtében a proteázrezisztens, β -redőben gazdag rész nagyobb lesz (90-231).²⁹ A prion fehérje Cu(II)-ion megkötésében a legnagyobb szerepet az oktarepeat régió tölti be, ez a tartomány négy ekvivalens Cu(II)-ion megkötésére képes.³⁰⁻³¹ Ezen kívül a 96-os és 111-es pozícióban lévő hisztidinek képviselik az oktarepeat tartományon kívüli rész fémionmegkötésben résztvevő horgonycsoportjait.³²⁻³⁴ A His187 szerepét korábban kizárták, de sok tanulmány jelent meg ennek a régióknak a vizsgálatával kapcsolatban.³⁵⁻³⁶ Az, hogy a prionban hány réz(II)ion kötődik pH-függő folyamat, pH 6 körül két ekvivalens Cu(II)-ion megkötésére képes. A teljes prion fehérje rézkötő kapacitása 5,3-12 ekvivalens közé tehető^{30, 37}, más közleményben leírtak alapján maximum 5 μM Cu(II)-ion megkötésére képes.³⁸

A Hu-PrP^C réz anyagcserében betöltött funkciója még nem teljesen tisztázott. Korábban azt állapították meg, hogy részt vesz a réz szállításában, a rézanyagcserében és védi a sejtet a káros oxidatív hatásokkal szemben az intracelluláris SOD aktivitás szabályozásán keresztül vagy SOD-hoz hasonló aktivitáson keresztül.^{28, 39} Hu-PrP^C expressziója növeli a különböző antioxidáns enzimek aktivitását és a glutation szintet, csökkenti a lipid peroxidációt. Stressz szenzor érzékenységgel rendelkezik, a Cu(II)-ion növekvő szintjével annak kötődése is megnövekszik a fehérjéhez, ezáltal védelmet nyújt a sejteknek a szabad

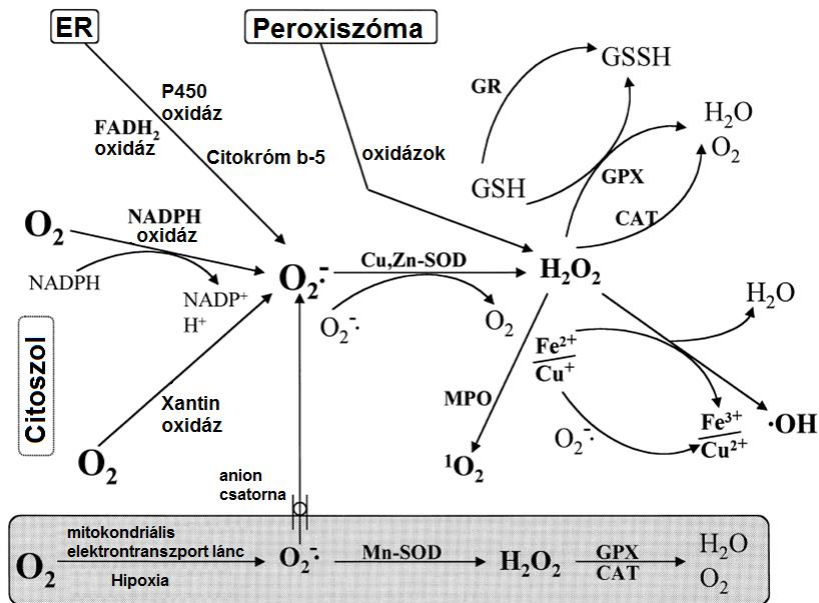
Cu(II)-ionnal való redox aktivitással szemben, azaz javítja a sejtvédelmet az antioxidáns rendszerben. Mások azt állapították meg, hogy a Hu-PrP^C a sejtmembrán külső oldalán köti a rezet és nem szállítja azt az extracelluláris térből a citoplazmába. Ebből arra a következtetésre jutottak, hogy a Hu-PrP^C nem Cu(II)-ionszállító fehérje, hanem inkább extracelluláris *réz szenzor*.^{24, 40} Ezzel ellentétben olyan eredményekről is beszámolnak, amely alapján a fehérje részt vehet a Cu(II)-ion sejtmembránon való átjuttatásában, hozzájárulhat a sejtek réz felvételéhez, annak a plazmamembránon való közvetlen átjuttatásával.^{28, 40-42} *Redox szenzor* is lehet, elsősorban a preszinaptikus membránokhoz kötődve érzékeli a Cu(II)-ion szintet, ezáltal befolyásolni tudja a Cu(II)-ion vagy a ROS redox aktivitását. A káros reaktív oxigén gyökök bontásában is részt vesz⁴³, így az *antioxidáns funkciója* a sejtmembrán külső részén nagyon fontos, különösen a neuronoknál.⁴⁴

45

A prion betegségek a fertőző szivacsos agyvelőgyulladással járó betegségek összefoglaló nevét jelentik. A prion elnevezés a betegség kórokozójának sajátágaiból – savval, formalinnal, nukleáz- és proteázkezeléssel szemben ellenálló részecske – fakad, amely igen sok kísérlet után arra engedett következtetni, hogy a kórokozó minden bizonnyal csak fehérje (**protein only**) lehet.⁴⁶ A PrP^C (prion protein cellular) a normál térbeli szerkezettel rendelkező, míg a PrP^{Sc} (prion protein scrapie) a kóros formájú fehérjét jelenti. A PrP^{Sc} szekvenciájában ugyanaz, mint az „egészséges” prion, de a konformációja más.⁴⁷ Az „egészséges” prion sok α -hélixet tartalmaz, ezzel szemben a „beteg” prion már β -redőket tartalmaz nagy mennyiségben.⁴⁸ A prion betegség során az „egészséges” PrP^C PrP^{Sc}-vel fertőződik meg. Úgynevezett templát hatással a „beteg” prion a saját konformációjára változtatja meg a PrP^C szerkezetét, és az fertőzi tovább a többi „egészséges” fehérjét.⁴⁹ A PrP^C \rightarrow PrP^{Sc} átalakulás megakadályozza a Cu(II)-ion kötődését a fehérjéhez. A PrP^{Sc}-t proteázok nem képesek ezt lebontani, hőre nem érzékeny, oldhatatlan fehérje. Extracelluláris felhalmozódása megváltoztatja a ROS egyensúlyát azáltal, hogy nem lesz képes a gyököket bontani és ez vezethet a prion betegség kialakulásához.

2.3. A reaktív oxigén származékok (ROS) szerepe az élő szervezet működésében

A reaktív oxigén gyökök (pl.: \bullet OH, \bullet OOH, O_2^- , NO \bullet) jelen vannak az atmoszférában szennyezőanyagokban, normál metabolikus folyamatokban és UV-, radioaktív-, mikrohullámú sugárzás által is keletkezik.⁵⁰ Az élő szervezetben a reaktív oxigén származékok képződésének útvonalát és annak megsemmisítésére létrejövő antioxidáns rendszert mutatja be a 3. *ábra*.²³



3. ábra: Antioxidáns rendszerek: SOD, glutation peroxidáz (GPX), kataláz (CAT), mieloperoxidáz, (MPO), glutation reduktáz (GR)

Egyrészt a ROS-ok konstans mennyiségben jelen vannak az aerob szervezetekben; kis koncentrációban nélkülözhetetlenek a biokémiai folyamatokban beleértve az intracelluláris jelátviteli folyamatokat, és részt vesznek a sejt növekedésében, fejlődésében, halálában, illetve a mikroorganizmusok pusztításában. Másrészt a ROS fontos szerepet játszik az öregedésben és különböző betegségekben (rák, idegrendszeri betegség és egyéb immun- és endokrin-rendszer zavarában). A lipidek oxidációjának elkerülése nagyon fontos feladat, azért mert a folyamat során keletkező epoxidok spontán reagálnak nukleofil centrumokkal úgymint a DNS, RNS és fehérjék.⁵¹⁻⁵² Ez a folyamat citotoxicitáshoz, allergiához, mutagenézishez, karcinogenezishez vezet és nem utolsósorban a fehérjék közvetlen inhibícióját okozza.⁵³⁻⁵⁷ Az oxidációt a „2.6. Fehérjék oxidációja” című fejezetben bővebben is ismertetem. A ROS inaktív formába történő átalakításában vagy képződésének megakadályozásában számos enzimatis és nem enzimatis antioxidáns rendszer vesz részt. Amikor az oxidatív stressz emelkedik, akkor megindul az enzimek regulációja és expressziója. Antioxidáns enzimek, mint a szuperoxid diszmutáz, glutation peroxidáz és kataláz együttes munkája segítségével bontják a ROS-okat az emberi sejtekben, és fenntartják az aktív oxigén egyensúlyát az élő szervezetben. Az antioxidánsok pl. C-vitamin, alfa-tokoferol (E-vitamin), glutation (GSH), béta-karotin és A-vitamin, amelyek szintén a szabad gyökök bontásáért felelősek.

2.4. Cu(II)-, Ni(II)-komplexek

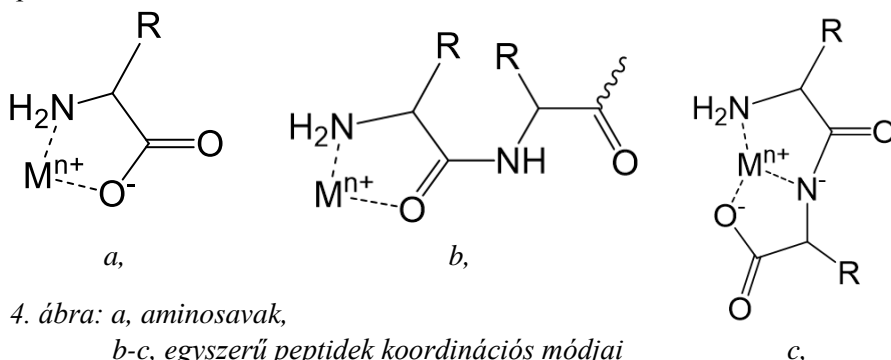
2.4.1. Aminosavak, peptidek komplexkémiái sajátosságai

Számos kutatócsoport foglalkozik a peptidek fémionokkal való kölcsönhatásának tanulmányozásával és a témában már sok irodalmi mű és emellett összefoglalók is megjelentek.⁵⁸⁻⁶⁴

A peptidek építőkövei az aminosavak, így elsőként érdemes ezen molekulák komplexképző sajátosságaival foglalkozni. Tartalmaznak egy terminális amino- és karboxilátcsoportot, amelyek a fémionokkal stabilis öttagú kelátgyűrűt képeznek (*4. a ábra*), ez az úgynevezett aminosavszerű koordináció. Ha az aminosav oldallánca is képes kölcsönhatást kialakítani a fémionnal, akkor az hatással van a komplexképződésre, azaz a kialakuló komplex szerkezetét és stabilitását is befolyásolja.⁶⁵⁻⁶⁶ Ezen aminosavak közé tartozik a hisztidin, a cisztein, az aszparaginsav és glutaminsav, amelyekben a koordinálódásra alkalmas donorcsoportok rendre a következők: az imidazolnitrogén, a tiolátkén és a két sav esetén a karboxiláttoxigén. Azonban az egyszerű aminosavakkal a fehérjékben, metalloenzimekben jelenlévő koordinációs környezetet nem lehet modellezni, mert komplexkémiái viselkedését tekintve eltérés mutatkozik egy adott szekvenciában jelenlévő aminosavval szemben.

Ezért a modellezés szempontjából egy szinttel tovább lépve, azaz a peptidek vizsgálatára érdemes helyezni a hangsúlyt. Így a továbbiakban ezen ligandumok komplexkémiái viselkedését foglalom össze. A peptidekben az amino- és karboxilátcsoportok egymástól való távolsága megnő, így nincs lehetőség stabilis kelátgyűrű kialakítására és a fémion minősége határozza azt meg, hogy a koordináció melyik horgonydonoron keresztül megy végbe. A peptidvázban komplexképzésre alkalmas donatoratomok vannak, ezek a peptidkötésben vagy amidkötésben megtalálható karboniloxigént és amidnitrogént jelentik, ezek által lehetőség adódik öttagú kelátgyűrű képződésére (*4. b ábra*). A karboniloxigén részvételével létrejövő ML összetételű részecske stabilitása kisebb, mint az egyszerű aminosavakkal képzett $[\text{NH}_2, \text{COO}^-]$ koordinációs módú komplexé. Az amidnitrogén gyenge bázisként és még gyengébb savként viselkedik pK értéke ~ 15 , amiből az következik, hogy csak nagyon lúgos közegben megy végbe a szabad ligandumban a deprotonálódása. Azonban ez a folyamat fémionok (Cu(II)-, Ni(II)-, Pd(II)-ionok) jelenlétében kisebb pH-n bekövetkezik abban az esetben, ha az amidnitrogénnel kelátképző helyzetben lévő horgonydonort tartalmaz a molekula. Dipeptidek esetében a kialakuló részecske $[\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{COO}^-]$ koordinációs móddal (*4. c ábra*) jellemezhető. A lánc növekedésével az abban lévő peptidkötések, ezáltal az amidnitrogének száma is növekszik, amelyek szintén képesek deprotonálódni és részt tudnak venni a fémion koordinálásában. A keletkező komplexek MLH_1 MLH_2 MLH_3 összetétellel írhatók le, amelyekben

csatolt kelátrendszer alakul ki.⁶³ A peptidnitrogének deprotonálódása Cu(II)-ion jelenlétében már semleges oldatban végbemegy, míg a Ni(II)-ion lúgos közegben képes indukálni azt.



4. ábra: a, aminosavak,
b-c, egyszerű peptidek koordinációs módjai

Az eddig ismertetett koordinációs módok azonban befolyásolhatóak olyan oldalláncokkal, amelyek kölcsönhatásba tudnak lépni a fémionokkal. A peptidet felépítő aminosavak három kategóriába sorolhatók aszerint, hogy az oldalláncok, nem, gyengén vagy erősen koordinálnak az adott fémionhoz. Az első kategóriába sorolható a valin, fénilalanin, alanin, ezek nem tartalmaznak fémionkötésre alkalmas donorcsoportot így nincs újabb koordinációs mód kialakulására lehetőség, de a kialakuló komplexek stabilitására hatással lehetnek.⁶⁷

Az általunk vizsgált fémionok (Cu(II)-, Ni(II)-ion) szempontjából a gyengén koordinálódó oldalláncok az aszparaginsav, glutaminsav β - és γ -karboxilcsoportja, a szerin és treonin alkoholos hidroxilcsoportja, a lizin ϵ -aminocsoportja és a metionin tioéter kénatomja, amelyeknél nemcsak a képződött komplex stabilitásában van változás, hanem a komplexek szerkezetében is.

A fentebb említett fémionok megkötését tekintve az utolsó és egyben legfontosabb funkciós csoportokat tartalmazó aminosavak a hisztidin és a cisztein. A hisztidin oldalláncában imidazolgyűrűt, míg a cisztein tiolcsoportot tartalmaz és ezek horgonydonorként tudnak viselkedni a peptidekben, képesek a fémionokhoz koordinálódni és elő tudják segíteni az amidnitrogének deprotonálódását.⁵⁹

A fentebb említett komplexek kialakításában a terminális aminocsoport horgonycsoportként viselkedik, ezáltal segíti elő az amidnitrogén deprotonálódását. Ezt a szabad aminocsoportot és természetesen a karboxilcsoportot is blokkolva jobban lehet a fehérjék fémionkötőhelyeit modellezni, mert számos enzim és fehérje fémionkötéséért gyakran az oldalláncokban lévő donorcsoportok felelősek.

Munkánk során egy és több hisztidint tartalmazó terminálisan védett ligandumok vizsgálatát tűztük ki célul, így a továbbiakban a hisztidintartalmú peptidek komplexkémiai viselkedését külön alfejezetként mutatom be.

2.4.2. Egy hisztidint tartalmazó terminálisan védett peptidek komplexkémiai viselkedése⁶⁴

Egy hisztidin mellett glicint tartalmazó ligandumok⁶⁸⁻⁷¹ vizsgálata során a kutatások arra világítottak rá, hogy a komplexképződés savas közegben minden esetben a hisztidinbeli horgonycsoport (N(Im)) koordinálódásával kezdődik, és egyfogú donorként vesz részt a Cu(II)-ion megkötésében. Továbbá dipeptideknél ligandumfelesleget tartalmazó rendszerben ki tudtak mutatni CuL₂ összetételű biszkomplexeiket. Egy bizonyos pH-tartományban csapadék kiválást tapasztaltak és azt megvizsgálva azt találták, hogy az előbb említett CuL₂ jelenik meg az oldatban, amely kis oldékonyságú. A pH emelésével az amidnitrogének deprotonálódnak és a peptidek tagszámától függően egy, kettő vagy három vesz részt a fémion koordinációjában az imidazolnitrogének mellett. Ha a szekvenciában első helyen hisztidin van, akkor a peptidnitrogének deprotonálódása a C-terminális irányba megy végbe 7,5,5 tagú csatolt kelát képződése közben, a többi pozícióban lévő hisztidinek például: Ac-GHGG, Ac-GGGH) a stabilisabb (5,6)- és (5,5,6)-tagú csatolt kelátokat alakítják ki a fémionnal.

A Cu(II)-Ac-HVGD-NH₂ rendszerben enyhén savas oldatban képződő CuL₂ összetételű komplexben a peptid imidazolnitrogén donoratomja az elsődleges fémkötőhely. Stabilitását tekintve nagyobbak adódik, mint az egyszerű imidazolil-oldalláncot tartalmazó peptidek ugyanilyen összetételű komplexei.⁷² Erre magyarázatként az aszparaginsav β-karboxilátcsoportjának fémionhoz történő koordinációja szolgál, így egy [N(Im), β-COO⁻] összetételű makrokelát alakul ki. pH > 10 fölött CuLH₃ és CuLH₄ részecskék jelennek meg az oldatban. A CuLH₄-ben négy amidnitrogén vesz részt a koordinációban, amelyek az ekvatoriális síkban helyezkednek el. A CuLH₃ összetételű komplex viszont többféle szerkezettel is leírható a spektrális paramétereinek alapján. A koordinálódó donoratomokat tekintve a [3N⁻, COO⁻] vagy [N(Im), 2N⁻ + OH⁻] koordinációs mód is valószínűsíthető. Három-, négy- és öttagú peptidek – amelyek szekvenciájukban közbenső helyzetben aszparaginsavat tartalmaznak – fémionnal alkotott komplexeinek vizsgálata során arra a következtetésre jutottak, hogy az aszpartil-oldallánc β-karboxilátcsoportja a fémionhoz kötődve elősegíti az előtte található amidcsoport deprotonálódását és koordinálódását.⁷³⁻⁷⁴

Egy újabb kutatásban a glutaminsavat és aszparaginsavat is tartalmazó Ac-PDEKHEL-NH₂ ligandum vizsgálata során arra a következtetésre jutottak, hogy a kialakuló makrokelát szerkezetű Cu(II)-komplexben nagy valószínűséggel nincs kölcsönhatásban az oldalláncában lévő karboxilátcsoport a fémionnal, és nem változtatja meg annak koordinációs környezetét sem.⁷⁵ Ugyanakkor ligandumfelesleget tartalmazó rendszerben nem tudták kizárni a karboxilátcsoport

kötődését. Két amidnitrogén és egy imidazolnitrogén koordinációjával létrejövő részecskénél valószínűsíthető a karboxilátóxiógen részvétele a koordinációban.

Kutatócsoportunkban is vizsgáltak egy hisztidint tartalmazó peptideket, amely mellett glutaminsav is van a szekvenciában (*Ac-SGAEGHAQK-NH₂*, *Ac-SGAEGAHQK-NH₂*).⁷⁶ Az egy imidazolnitrogén koordinációjával létrejövő komplex stabilitási állandója nagyobb, mint ami a monodentát koordinációra jellemző, ez a glutaminsav stabilizáló hatásának lehet a következménye. Az *Ac-SGAEGHAQK-NH₂* Cu(II)-ionnal képzett egy imidazolnitrogén és két amidnitrogén részvételével kialakuló komplexének stabilitása nagyobb, mint a másik ligandummal képzett ugyanilyen összetételű részecskéé. A kitüntetett stabilitás azzal magyarázható, hogy kisebb távolságban van egymástól a hisztidin és a glutaminsav. A glutamin hatása abban nyilvánulhat meg, hogy hidrogénkötéseken keresztül képes stabilizálni a komplex szerkezetét.⁷⁷

A humán prion fehérje fémkötőhelyeit számos egy hisztidint tartalmazó védett peptiddel modellezték. A továbbiakban ezek komplexképző sajátosságait mutatom be, mivel az általunk vizsgált ligandumok egyik körét a humán prion fehérje fragmense és mutánsai jelentik.

A humán prion fehérjében lévő oktarepeat tartományban található *Ac-PHGGGWGQ-NH₂* fragmenst vizsgáltak, mivel a glicingazdag régió az oktarepeat tartományban két fő szerepet tölthet be: az egyik a strukturálatlan N-terminális prion egység flexibilitásában való közreműködés és a másik, hogy lehetővé teszi a Cu(II)-ion specifikus kötődését és elengedését a fent említett pH-tartományban a biológiai szállítás folyamata során. A fragmens vizsgálata során azt állapították meg, hogy az imidazolnitrogén mellett amidnitrogént is tartalmazó komplexekben a kevésbé stabilis 7,5,5-tagú csatolt kelát alakul ki, ugyanis a prolin miatt a C-terminális irányába következik be az amidnitrogének deprotonálódása.⁷⁸ Ha a három egymás mellett lévő glicint cserélték alaninra, illetve lizinre⁷⁹, akkor is ugyanolyan összetételű komplexek keletkeznek, de valamivel kisebb stabilitásúak. Nem drámai ez a stabilitásváltozás, viszont a Cu(II)-kötő és elengedő mechanizmusban ez fontos szerepet játszhat (pH 6,5-7).⁸⁰ A

A humán prion fehérje oktarepeat tartományon kívüli hisztidinjei (His96^{130, 140}, His111^{130, 146}, His187¹²⁰) kiváló réz(II)ionkötők és hatékonyabbak a fémionmegkötés szempontjából, mint az oktarepeat tartományban lévő hisztidintartalmú monomer peptidfragmens.^{30, 33, 81-87} A külső hisztidint tartalmazó peptidfragmensek vizsgálata során kimutatták, hogy az imidazolnitrogén a horgonydonor szerepét tölti be és elősegíti az N-terminális vég felé az amidnitrogének deprotonálódását, és a fémionhoz történő kötődését. A komplexképződés során három fő részecske keletkezését tudták kimutatni. Első lépésben az imidazolnitrogén koordinálódik és CuL összetételű komplex keletkezik. Majd az első két amidnitrogén kooperatív deprotonálódási

folyamatában CuLH_2 [2N^- , $\text{N}(\text{Im})$], pH 7 és 9 közötti tartományban CuLH_3 [3N^- , $\text{N}(\text{Im})$] koordinációs módú részecskék alakulnak ki. Az oktarepeat tartományon kívüli hisztidinek részvételével kialakuló CuLH_3 összetételű komplexekben a nagyobb stabilitású (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer alakul ki az imidazolnitrogén és a megfelelő amidnitrogének koordinációjával. Emellett foglalkoztak a hal és a csirke prion fehérjék koordinációs környezetének leírásával is, ahol hasonló megállapításokra jutottak, mint az előbbi esetben.⁸⁷⁻⁸⁸

Ugyanakkor a szekvenciában jelenlévő egyéb aminosavak hatását vizsgálva kismértékű eltéréseket figyeltek meg a koordinációs módban és a spektrális paraméterekben. A következők pár bekezdésben ezeket az eltéréseket mutatom be.

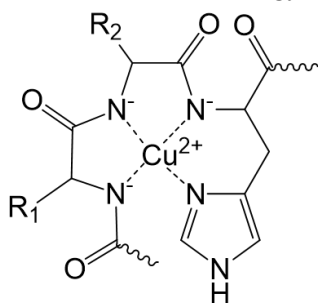
Az emberi prion fehérje H111 körüli aminosavsorrendjét modellező **Ac-MKHM-NH₂** tetrapeptid $\text{Cu}(\text{II})$ -ionnal való komplexképződési folyamatainak vizsgálata során azt állapították meg, hogy egy imidazol- és két amidnitrogén koordinációja által kialakuló komplexben a 109-s metionin tioéter kénatomja is kölcsönhatásban van a fémionnal. Ezt a CD spektrumban kb. 380 nm-nél megjelenő $\text{S} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ töltésátviteli sáv megjelenése is igazolja. A szekvencia tartalmaz egy lizint is, amely ϵ -aminocsoportja ugyan nem vesz részt a fémion megkötésében, de pH < 9,5 protonált formában van, így azt a sztöchiometria felírásánál figyelembe kell venni.³⁴

Az **Ac-GTHS-NH₂** HuPrP(94-97), a 96-os kötőhelynek megfelelő szekvenciájú ligandum $\text{Cu}(\text{II})$ -komplexei CD spektrumainak paraméterei a 111-es hisztidint tartalmazó tetrapeptidtól különbözőnek adódtak, ez a szekvenciában lévő optikailag inaktív glicin hatása miatt van.⁸⁹

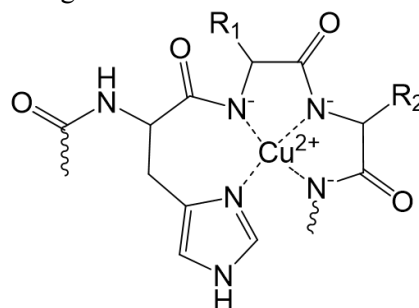
A humán prion fehérje mutánsait vizsgálva érdekes eredményre jutottak az **Ac-SKHM-NH₂** és **Ac-TKHM-NH₂** peptid $\text{Cu}(\text{II})$ -ionnal való komplexképződésének vizsgálata során. A szerin és a treonin alkoholos hidroxilcsoportjának gyenge axiális kölcsönhatásával képes elősegíteni a harmadik amidnitrogén deprotonálódását és koordinálódását. A kialakuló hidrogénkötés a szerin vagy treonin alkoholos hidroxilcsoportja és a lizin aminocsoportja között elősegítheti az amidnitrogén kötődését.⁹⁰

A $\text{Ni}(\text{II})$ -ion kötődése az oktarepeat tartományhoz igen kismértékű, ezért ezzel a fémionnal elsősorban a H96-os, H111-s humán prion fehérje és a H110-s és H124-s csirke prion kötőhelyét modellező peptideket vizsgálták.^{89, 91-95} Ez a választás annak tudható be, hogy az oktarepeat tartomány $\text{Ni}(\text{II})$ -ion megkötésére való hajlama igen csekély. Ezzel a fémionnal és a fent említett ligandumokkal pH > 6 fölött kezdődik a komplexképződés, ami az imidazolil-oldallánc deprotonálódásának pH-tartományában van.⁸⁹ Lúgos oldatban a négy nitrogén donoratomot tartalmazó síknégyszetes geometriájú, diamágneses komplexek képződését feltételezik [3N^- , $\text{N}(\text{Im})$] koordinációs móddal.⁹⁶

Összességében az állapítható meg az egy hisztidint tartalmazó ligandumok komplexképző sajátosságairól, hogy a fémion megkötésében a legfontosabb szerepet az imidazolnitrogén tölti be, ami horgonycsoportként képes elősegíteni az amidnitrogének deprotonálódását. Savas pH-tartományban az imidazol egyfogú koordinációjával CuL összetételű részecske keletkezik, a pH emelésével az amidnitrogének is deprotonálódnak és koordinálódnak. Ebben az esetben az imidazolnitrogén mellett egy, kettő vagy három amidnitrogén vesz részt a koordinációban. Egy hisztidint tartalmazó peptidok Cu(II) -komplexeinek vizsgálata során arra a következtetésre jutottak, hogy ahol a közbelső⁸⁹ vagy C-terminális pozícióban⁹⁷ van a hisztidin, az első két amidnitrogén deprotonálódása kooperatívan megy végbe. A CuLH_3 összetételű három amidnitrogén és egy imidazolnitrogén koordinációjával létrejövő komplexre jellemző abszorpciós maximum értéke 510-530 nm között, míg az ESR paraméterei, az A_{\parallel} és g_{\parallel} értéke $180\text{-}200 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ és 2,17-2,19 tartományban vannak.⁹⁸ Ha a hisztidint megelőző vagy az azt követő amidnitrogének deprotonálódnak és koordinálódnak (5,5,6)-vagy (7,5,5)-tagú kelátok jöhetnek létre (5. a ábra). A kevésbé stabilis (7,5,5)-tagú kelátgyűrű kialakulására akkor van lehetőség, ha a szekvenciában az N-terminális végen van jelen a hisztidin (például Ac-HGGG^{71}). Ha prolin^{62, 99} vagy szarkozin¹⁰⁰ kerül a hisztidin elé a szekvenciába, akkor is a C-terminális vég felé történik az amidnitrogének deprotonálódása (5. b ábra), mivel ezen aminosavak által létrejövő peptidkötésben nincs olyan amidnitrogén, ami disszociábilis protont tartalmazna. Ezeketől az esetektől eltekintve az N-terminális irányba történő amidnitrogén deprotonálódás a kedvezményezett, mert a 6-tagú kelátgyűrű termodinamikai stabilitása nagyobb, mint a 7-tagúé.⁶³



5. a ábra: $\text{CuLH}_3, [N^-, N^-, N^-, N(\text{Im})]$, N-terminális irányba történő amidnitrogén deprotonálódás



5. b ábra: $\text{CuLH}_3, [N(\text{Im}), N^-, N^-, N^-]$, C-terminális irányba történő amidnitrogén deprotonálódás

A Ni(II) -ionnal képzett komplexeknél kialakuló koordinációs módok és a keletkező részecskék sztöchiometriája a Cu(II) -komplexeivel általában megegyezik. Például az egymagvú 4N-es Cu(II) -komplexeikkel analóg módon, szintén három amidnitrogén, és egy imidazolnitrogén koordinálódik a nikkell(II)ionhoz mind az $\text{Hu-PrP(92-96) Ac-GGGTH}$ és $\text{Hu-PrP(107-111) Ac-}$

TNMKH ligandumok esetében.⁹² Ugyanakkor azt is megállapították, hogy a Ni(II)-komplexek képződése nagyobb pH-n következik be és stabilitásuk kisebb, mint a Cu(II)-komplexeké.

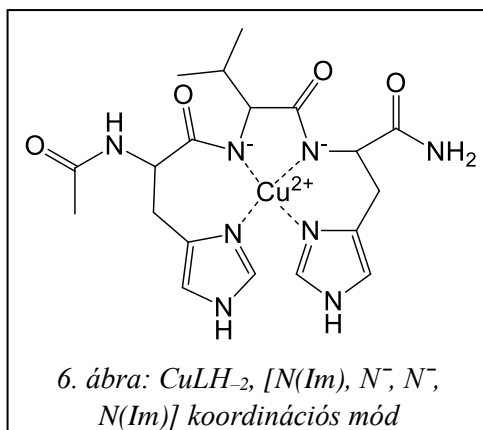
2.4.3. Több hisztidint tartalmazó terminálisan védett peptidok komplexkémiai viselkedése⁶⁴

Multihisztidin peptidok esetében a kialakuló komplexek még változatosabb képet mutatnak. Védett multihisztidin peptidok esetében – melyek a C- és N-terminális végükön egyaránt védőcsoporttal vannak ellátva – nincs szabad aminos- és karboxilcsoport, ezáltal komplexkémiai viselkedésük is megváltozik a nem védett peptidokhoz képest. Olyan több hisztidint tartalmazó peptidokat is vizsgáltak már, amelyekben a hisztidineket egy, kettő vagy több aminosav választja el egymástól.^{98, 101-105}

Ha két hisztidint egymástól egy aminosav választ el, mint például az **Ac-HVH-NH₂**¹⁰¹ vagy **Ac-HGH-NHMe**, **Ac-HHGH-NHMe**¹⁰² ligandumoknál, akkor CuL összetételű imidazol-koordinációjú komplex alakul ki, annyi hisztidin részvételével, amennyi jelen van a ligandumban. A fent említett glicintartalmú ligandumok szabad karboxilátcsoportot tartalmazó analógjainál feltételezhető továbbá annak koordinációja is a makrokelát szerkezetű komplexekben. A Cu(II)-Ac-HVH-NH₂ rendszerben ligandumfelesleg jelenlétében jelentős mennyiségben keletkezik CuL₂ összetételű biszkomplex, amelyben három vagy négy nitrogén donoratom koordinációja valószínűsíthető a spektrális paraméterei alapján. Ezeknél a ligandumoknál az első két amidnitrogén deprotonálódása átfedő lépésben játszódik le és CuLH₂ összetételű részecske keletkezik, amelynél a HXH szekvenciában lévő két imidazolnitrogén és a hisztidinek közötti amidnitrogének vesznek részt a koordinációban, ezáltal egy (7,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer (6. ábra) alakul ki.

Mindhárom ligandum CuLH₃ összetételű komplexében egy (5,5,6)-tagú csatolt kelát képződésével [N⁻, N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációs mód alakul ki.⁷⁰ Továbbá ebben a részecskében az Ac-HGH-NHMe első és Ac-HHGH-NHMe második imidazolnitrogénjének axiális koordinációja is feltételezhető négyzetes piramis geometriával.⁵⁸

Az **Ac-HGHG-OH**¹⁰⁶ ligandum Cu(II)-ionnal csak 1:1 komplexeket képez, nem tudtak kimutatni sem biszkomplexeket, sem többmagvú részecskéket. Az imidazol-

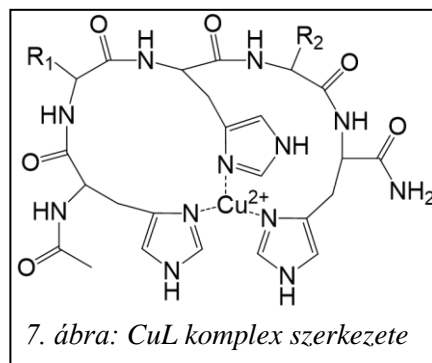


koordinációjú komplexekben az egy és két imidazolnitrogén mellett a C-terminális végen lévő szabad karboxilátcsoport is részt vesz a fémion megkötésében. A peptidnitrogének lépcsőzetes deprotonálódása és koordinálódása megy végbe, amely folyamatban elsőként a CuLH_{-1} összetételű részecske képződésével egy amidnitrogén mellett két imidazolnitrogén van jelen a koordinációs szférában. A két és három amidnitrogén koordinációjával létrejövő komplexekben az imidazolnitrogén mellett a szabad karboxilátcsoport az ekvatoriális síkban helyezkedik el és axiálisan további egy imidazolnitrogén vesz részt a koordinációban torzult oktaédes geometriát eredményezve. A peptidnitrogének kötődésével párhuzamosan kék eltolódás figyelhető meg az abszorpciós spektrumban. A CuLH_{-2} és CuLH_{-3} CD spektruma között nagy eltérés mutatkozik, ami a Cu(II) -ion körüli konformációs átrendeződésre utal a harmadik amidnitrogén belépésével.¹⁰⁷

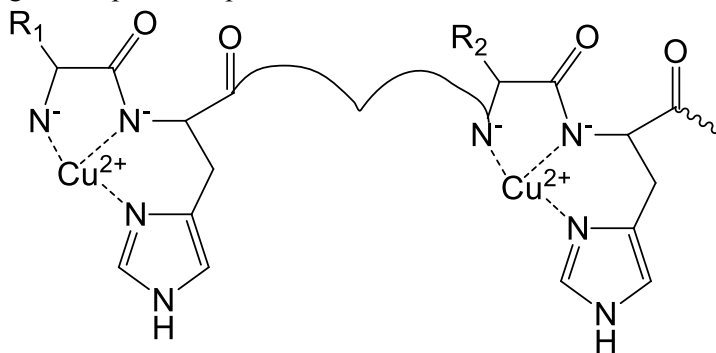
Azonban, ha a hisztidinek között már két aminosavnyi a távolság, erre jó példa az **Ac-HVVH-NH₂**⁹⁸, akkor a CuLH_{-1} számottevő mennyiségben van jelen az oldatban, az első amidnitrogén deprotonálódása elkülönült lépésben megy végbe. Az amidnitrogének koordinációjával kialakuló komplexekben egy imidazolnitrogén mellett egy, kettő illetve három amidnitrogén vesz részt a fémion megkötésében és a C-terminális végen lévő hisztidin tölti be a horgonydonor szerepét. Ezeknél a rövid peptideknél CuL_2 összetételű biszkomplexek kialakulására is lehetőség van, amelyek ligandumfeleslegnél viszonylag nagy koncentrációban vannak jelen. Az **Ac-HGGH-NH₂** ligandumnál is hasonló összetételű részecskék képződnek. Az amidnitrogének részvételével létrejövő komplexeknél viszont az N-terminális végen lévő hisztidin nincs jelen az ekvatoriális síkban és így nincs meg a stabilizáló hatása sem, kisebb stabilitású komplexek keletkeznek.

Az **Ac-HXHZH-NH₂**¹⁰³ szekvenciájú peptideknél mindhárom imidazolgyűrű részvételével makrokelát szerkezetű CuL összetételű komplex alakul ki (7. ábra).

A makrokelátok visszaszorítják az amidnitrogének deprotonálódását, de nem akadályozzák meg. Fiziológias pH-tartományban a CuLH_{-2} komplex lesz a meghatározó, amelyben a fémionok két amidnitrogénhez és két imidazolnitrogénhez koordinálódnak, $[\text{N}(\text{Im}), \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$ koordinációs móddal. Az oldatban koordinációs izomerek alakulnak ki, de általában a C-terminális végen kedvező a fémion kötődése. A pH emelésével még egy amidnitrogén deprotonálódik, CuLH_{-3} komplex jön létre $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$ típusú koordinációval. Fémion felesleg esetén lehetőség van többmagvú



komplexek kialakulására is. A kétmagvú komplexek közül a Cu_2LH_4 (8. ábra) a meghatározó 7 és 9 közötti pH-tartományban, amelyben a fémion a közbelső és a C-terminális végen lévő hisztidinhez kötődik $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$ koordinációs mód kialakítása mellett. Abban az esetben, ha prolin van beépítve a szekvenciába, akkor az egymagvú komplexeknél nincs lehetőség koordinációs izomerek kialakulására, és többmagvú komplexek képződnek.



8. ábra: Cu_2LH_4 komplex szerkezete

A továbbiakban a hisztidinek mellett olyan különböző aminosavakat tartalmazó ligandumok komplexképző sajátosságainak összefoglalását mutatom be, amelyek oldalláncai a fémionok megkötését, és ezáltal a kialakuló komplexek stabilitását, szerkezetét valamilyen irányban megváltoztatják.

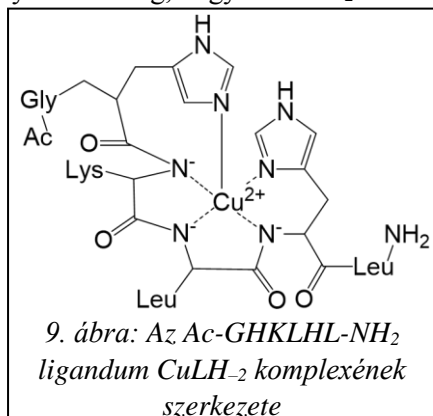
Az **Ac-HPHH-NH₂**-nél¹⁰⁸ szintén lehetőség van makrokelát kialakulására mind a három imidazolil-oldallánc részvételével, továbbá ligandumfelesleg jelenlétében biszkomplex is képződik, ami 5-8 közötti pH-tartományban uralkodik. A CuL komplex stabilitása kisebb, mint más ugyanilyen összetételű komplexé. Ez a prolin merev szerkezetéből adódik, ami miatt a peptid flexibilitása csökken. A CuLH_1 összetételű részecskében a két egymás melletti hisztidin imidazolnitrogénje és a közöttük lévő amidnitrogén van jelen a koordinációs szférában. $\text{pH} > 8$ tartományban keletkezik a CuLH_2 komplex, amely folyamatot nem kíséri nagymértékű spektrális változás, ami a koordinált vízmolekula deprotonálódásának tudható be. Egy újabb lúgfogyasztó folyamatban egy második amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja zajlik, továbbá az egyik imidazolnitrogén kiszorul az ekvatoriális síkból és axiálisan kötődik a fémionhoz $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im}), \text{OH}^- + \text{N}(\text{Im})_{\text{ax}}]$ koordinációs módot kialakítva, amely torzult geometriát mutat.

Vizsgáltak olyan ligandumokat is, amelyben a prolin nagymértékben megváltoztatja a kialakuló komplexek szerkezetét, a láncban lévő helyzetétől függően érdekes koordinációs módokat tud előidézni az úgynevezett „peptidláncban töréspontot létrehozó” hatása miatt. Az **Ac-HPSGHA-NH₂**¹⁰⁹ CuLH_2 komplexben $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$ koordinációs mód van jelen, az N-terminális végen lévő hisztidin nem vesz részt a koordinációban és az amidnitrogének

lépcsőzetes deprotonálódása játszódik le. Ezzel ellentétben, ha a glicint és a prolint megcseréljük a szekvenciában, abban az esetben az amidnitrogének kooperatív deprotonálódásával $[N(\text{Im}), N^-, N^-]$ koordinációjú komplex keletkezik (7,5,5)-tagú csatolt kelátot eredményezve, és a C-terminális végen lévő hisztidin képes axiálisan koordinálni.

Hisztidint és szarkozint tartalmazó terminálisan védett peptidok **Ac-(((HisSarHis)SarHis)SarHis)-NH₂** (**S1H2**, **S2H3**, **S3H4**)¹⁰⁰Cu(II)-ionnal való kölcsönhatásának vizsgálata során azt állapították meg, hogy az imidazol-koordinációjú komplexek 5-7 közötti pH-tartományban vannak jelen a legnagyobb mennyiségben és nem elég stabilisak ahhoz, hogy enyhén lúgos közegben megakadályozzák a fémion hidrolízisét.

Két hisztidint tartalmazó ligandumban (**Ac-(KG)HKLHL-NH₂**)¹¹⁰, ahol a hisztidineket két aminosav választja el ugyanolyan összetételű komplexek keletkeznek, mint az Ac-HXXH-NH₂ ligandumoknál. A különbség abban nyilvánul meg, hogy a CuLH₂ összetételű részecskében az N-terminális vég felőli



hisztidin lehet az ekvatoriális síkban vagy akár axiális pozícióban is. A harmadik amidnitrogén koordinációjával létrejövő komplexben az ekvatoriális síkban egy imidazolnitrogén és három amidnitrogén van jelen, míg axiálisan kötődik a C-terminális véghez közeli hisztidin imidazolnitrogénje (9. ábra). A pH emelésével a lizin ϵ -aminocsoportja is elveszti protonját, de az nem vesz részt a fémion megkötésében.

Azoknál a ligandumoknál, amelyekben a hisztidin mellett aszparaginsav is jelen van a szekvenciában (például az **Ac-HHVGD-NH₂** és **Ac-HVGDH-NH₂**)¹⁰⁴, a csak imidazol-koordinációjú komplexeikben ezen aminosav stabilitásnövelő hatása megmutatkozik. A pH növelésével bekövetkezik az amidnitrogének deprotonálódása és azok is részt vesznek a fémion megkötésében. Az első két amidnitrogén deprotonálódása kooperatív módon megy végbe.⁸⁹ A kialakuló CuLH₂ összetételű komplexben $[N(\text{Im}), N^-, N^-, N(\text{Im})]$ a koordinációs mód, aminek következtében a harmadik amidnitrogén belépése az imidazolnitrogén kiszorításával lehetséges, és pH > 9 felé tolódik el.

Ac- β DHGH ligandum fémionkötő-képessége növekszik azáltal, hogy az aszparaginsav α -karboxilátcsoportja részt vesz a fémion koordinálásában.¹¹¹

Védett **Ac-KHGH-NH₂** és **Ac-DHGH-NH₂**¹¹² vizsgálata során arra a következtetésre jutottak, hogy mind az imidazol-koordinációjú mind, az egy és két amidnitrogén koordinációjával létrejövő komplexekben mindkét imidazolnitrogén

részt vesz a fémion megkötésében. A harmadik amidnitrogén belépésével az egyik imidazolnitrogén kiszorul a koordinációs szférából. Továbbá azt is feltételezik, hogy nincs kimutatható kölcsönhatás a fémion és a lizin ϵ -aminocsoportja, illetve az aszparaginsav β -karboxilátcsoportja között.

Glutaminsavtartalmú peptidekben (**Ac-GHEITHG-NH₂**, **Ac-GHTIEHG-NH₂**)¹¹³ már a makrokelát képződésénél kimutatták a karboxilátcsoport koordinációban való részvételét, ez a folyamat nagymértékben befolyásolja a kialakuló komplex stabilitását és szerkezetét is. Azt állapították meg, hogy a HEXXH szekvenciát tartalmazó peptiddel a [2N(Im), COO⁻] koordinációs módú makrokelát komplex képződése kedvezőbb. A többi komplex szerkezetében is az a különbség adódik, hogy a HEXXH szekvenciájú ligandumoknál a glutaminsav γ -karboxilátcsoportja erősebb kölcsönhatás kialakítására képes, mint a másik ligandumnál. Ez az erősebb kötődés a komplex másodlagos szerkezetére is hatással van.

Az A β feltételezett rézkötőhelyének modelljét, az **Ac-SGAEGHHQK-NH₂**⁷⁶ peptidet, és annak Cu(II)-ionnal való komplexképződési folyamatait kutatócsoportunkban tanulmányozták. Ennél a ligandumnál biszkomplexek létezését is feltételezik négy imidazolnitrogén koordinációjának részvételével. A makrokelát szerkezetű komplexben az imidazolnitrogének mellett a glutaminsav γ -karboxilátcsoportjának koordinációját is valószínűsítik. A két hisztidin jelenléte a szekvenciában arra a feltételezésre ad okot, hogy izomerek alakulnak ki az amidnitrogének által kialakított részecskékben. Az [N⁻, N⁻ N(Im)] koordinációs módú komplexekben az amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja azonos mértékben következik be mind a két hisztidintől indulva az N-terminális irányba, az izomerek aránya 1:1. A három amidnitrogén és egy imidazolnitrogén jelenléte mellett a másik hisztidin imidazolnitrogénjének axiális kötődése is valószínűsíthető a CuLH₋₃ komplexben. A többmagvú Cu₂LH₋₆ összetételű részecskékben az amidnitrogének deprotonálódása a hatos hisztidintről az N-terminális, míg a hetes pozíciójú hisztidintről a C-terminális irányba következik be.

Az **Ac-EDDAHAHAHAHAG-NH₂**, **Ac-EDDHAHAHAHAHG-NH₂**¹¹⁴ ligandumok Cu(II)-ionnal való kölcsönhatásának vizsgálata során az 1:1 fémion-ligandum aránynál egymagvú komplexek keletkezése valószínűsíthető. Savas pH-tartományban az imidazolnitrogének részvételével protonált komplexek képződnek. A *négy hisztidintartalmú* peptid CuL összetételű részecskéjében három imidazolnitrogén és egy amidnitrogén vesz részt a koordinációban, míg a negyedik imidazolnitrogén protonált. A pH emelésével az utolsó imidazolnitrogén is elveszti protonját, de az már nem vesz részt a fémion megkötésében, tehát megmarad a már fentebb leírt koordinációs geometria. Ezzel ellentétben az *öt hisztidint* tartalmazó ligandum CuLH komplexében már négy imidazol koordinációja valószínűsíthető. Ami arra enged következtetni, hogy további

hisztidinek jelenléte a szekvenciában megakadályozza a vázban lévő peptidnitrogének deprotonálódását ebben a komplexben. Elméleti számítások alapján az is megállapítható, hogy a kialakuló komplex legideálisabb másodlagos szerkezete α -helikális struktúrával írható le. Nagyobb pH-n kettő, illetve három amidnitrogén is bekerül a koordinációs szférába egy-egy imidazolnitrogént kiszorítva ezáltal, tehát a kialakuló komplexek $[N(\text{Im}), 2N^-, N(\text{Im})]$ és $[3N^-, N(\text{Im})]$ koordinációs móddal jellemezhetők. A glutaminsav kötődése az **Ac-EDDAHAHAHAHAG-NH₂** ligandum esetében valószínűbb, ezzel ellentétben a másik ligandumnál nem feltételezik a karboxilátcsoport koordinálódását.¹¹⁵ Az alternáló pozícióban hisztidint tartalmazó ligandumok (például az **Ac-EDDHAHAHAHAHG-NH₂**) nagyobb stabilitású komplexeket képeznek, mint azok, amelyeknél a hisztidinek szinte mindegyike egymás mellett foglal helyet és megegyező számú hisztidint tartalmaz (**Ac-THHHHAHGG-NH₂**).¹¹⁶ Ezzel ellentétben a hisztidinek számának növelésével (**Ac-EDDHHHHHHHHHG-NH₂**)¹¹⁵ nagyobb stabilitású komplexek keletkeznek a kevesebb hisztidint alternáló pozícióban tartalmazó ligandumokénál. Ez az α -helikális másodlagos struktúra és annak kialakulásában szerepet játszó több hidrogénkötés stabilizáló hatásának eredménye.¹¹⁴

Mint ahogy az egy hisztidint tartalmazó ligandumoknál a prion fehérje fémionkötőhelyeit modellező fragmensek és mutánsainak komplexképző sajátságait említettem, ezek alapján a több hisztidint tartalmazó peptideknél is adódik a lehetőség, hogy bemutassam a hosszabb fragmens Cu(II)-komplexeinek sajátságait.

Az **Ac(-PEG₁₁)₃HuPrP(60-114)**¹¹⁷ peptidben, ahol a 61, 69, 77, 85-s pozícióban lévő hisztidinek jelentik az oktarepeat tartománybelieket, a 96 és 111-s helyzetűek a tetraoktarepeat tartományon kívülieket, a hisztidinek egymástól két aminosavnál nagyobb távolságban, szeparáltan helyezkednek el. Ebben az esetben is lehetőség van makrokelát kialakulására, amelyben négy hisztidin vesz részt a fémion megkötésében. Ki tudtak mutatni olyan komplexeket is, amelyekben az imidazol koordinációja mellett egy és két amidnitrogén vesz részt a fémion koordinálásában. Sőt a tetraoktarepeat egységben a két amidnitrogén és egy imidazolnitrogén koordinációja mellett még egy imidazolnitrogén is kölcsönhatásba kerülhet a fémionnal. Elmondható továbbá erről a peptidről, hogy annyi réz(II)ion megkötésére képes, ahány hisztidin van benne. A legfontosabb megállapítás viszont az, hogy a koordinációs mód nagyban függ a fémion-ligandum aránytól és a pH-tól. A három és négy imidazol-koordinációjú makrokelát gyengén savas közegben és kis Cu(II)-ion koncentrációnál domináns. Ekvimoláris mintában az amidkötött részecskék semleges és enyhén lúgos körülmények között vannak jelen. A növekvő fémion-koncentrációval az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja már enyhén savas közegben

bekövetkezik és a két fő koordinációs mód: $[N(\text{Im}), N^-, N^-]$ és $[N(\text{Im}), N^-, N^-, N^-]$. Ha a hisztidin oldallánc/Cu(II) aránya kisebb, mint hat, akkor nagyszámú koordinációs izomer jelenlétével kell számolni, mert az egyes kötőhelyek egymástól függetlenül működnek, így minden egyes hisztidin képes betölteni a horgonydonor szerepét.⁶⁴

A multihisztidin peptidek Cu(II)-ionnal alkotott komplexeiről összességében az állapítható meg, hogy savas pH-tartományban az oldalláncbeli hisztidinnitrogének a fő fémionkötőhelyek és a kialakuló komplex CuL összetétellel írható le. A természetes peptideknél beleértve a prionokat, amiloid és hiszton peptideket a hisztidinek számának növekedése kedvez a makrokelátok képződésének savas és semleges körülmények között.¹¹⁸⁻¹²² Számos kutatási eredmény arra világít rá, hogy minél több imidazolnitrogén kerül a koordinációs szférába, annál nagyobb stabilitású CuL komplex keletkezik. Nemcsak a szekvenciában lévő hisztidinek számától, hanem azok egymáshoz viszonyított helyzetétől is függ a keletkező makrokelát szerkezetű részecskék stabilitása. Szomszédos, alternáló pozícióban és egymástól távoli hisztidineket tartalmazó ligandumok CuL komplexeinek stabilitását összehasonlítva az állapítható meg, hogy azok a ligandumok a leghatékonyabbak a Cu(II)-ion megkötésében, amelyeknél alternáló pozícióban van jelen a hisztidin a peptidben.^{64, 78} A két imidazol-koordinációjú komplex stabilitását növeli a C-terminális és az aszparaginsav vagy glutaminsav oldalláncában lévő karboxilátcsoport. A lizin oldalláncában lévő ϵ -aminocsoport fiziológiás körülmények között protonált és nem vesz részt a koordinációban, a makrokelát szerkezet stabilitásában nem játszik szerepet, de pozitív töltésének köszönhetően destabilizáló hatású lehet.¹⁰⁰ Azért kerül bővebb tárgyalásra ez a típusú komplex, mert a Cu,Zn-szuperoxid diszmutáz (Cu,Zn-SOD) enzim modellezése szempontjából az imidazol-koordinációjú, általában CuL vagy CuL_2 összetételű komplexek a legfontosabbak, ugyanis szerkezetükben ezek hasonlítanak az enzim aktív centrumához. A fent említett CuL komplexek elektrokémiai és SOD aktivitás vizsgálatát is elvégezték.^{101, 106, 123-127}

Ezenkívül az *amidnitrogének* részvételével kialakuló komplexek is jó modellként szolgálhatnak, így érdemes azokat is a vizsgálat tárgykörébe beemelni. A korábbi kutatási eredmények alapján tehát, ha a hisztidinek között egy aminosav van, abban az esetben a pH emelésével végbemegy az amidnitrogének deprotonálódása és azok koordinálnak az imidazolnitrogén mellett CuLH_2 összetételű komplex létrejöttével. Az egymástól egy aminosavnál nagyobb távolságban elhelyezkedő hisztidineket tartalmazó ligandumok Cu(II)-komplexeinél a pH növelésével itt is lejátszódik az amidnitrogének deprotonálódása, ebben a rendszerben a CuLH_3 összetételű komplex a

meghatározó, melyben $[N^-, N^-, N^-, N(\text{Im})]$ típusú koordinációs mód van jelen. Mind a láncvégi, mind a közbenső helyzetű imidazolnitrogén képes horgonycsoportként elősegíteni az amidnitrogének deprotonálódását, így ekvimoláris oldatban koordinációs izomerek képződhetnek. Ezek létrejöttét a nemkoordinálódó oldalláncok hidrofób és szterikus kölcsönhatása jelentősen befolyásolhatja.

A kettőnél több hisztidint tartalmazó ligandumok Cu(II)-ionnal képzett komplexeinél lehetőség van többmagvú komplexek kialakulására is fémionfelesleg mellett. Ezekben a rendszerekben a ligandum általában annyi Cu(II)-ion megkötésére képes, ahány hisztidin található a szekvenciában. A létrejövő kétmagvú komplex Cu_2LH_4 összetétellel jellemezhető, és benne a koordinációs mód $[N^-, N^-, N(\text{Im})]$ típusú. A pH emelésével többmagvú négynitrogénes $[N^-, N^-, N^-, N(\text{Im})]$ koordinációs módú komplexek keletkeznek. A komplexek sztöchiometriája hasonló a különböző ligandumoknál, de a különböző részecskék relatív koncentrációja eltérő, ami arra utal, hogy a hisztidinek egymáshoz viszonyított növekvő távolságával a ligandum fémionkötő affinitása is változik.

Fontos a több hisztidint tartalmazó ligandumok Ni(II)-komplexeinek képződéséről, stabilitásáról és szerkezetéről is szót ejteni, hiszen ez a másik fémion amely a kutatás egy részét képezi.

Két és három hisztidintartalmú rövidebb tagszámú peptideknél (**Ac-HGH-NHMe**, **Ac-HGH-OH**, **Ac-HisSarHis-NH₂**, **Ac-HHGH-OH**, **Ac-HisSarHisSarHis-NH₂**)¹⁰⁵ lehetőség van Ni(II)-ionokkal biszkomplexek képződésére, azonban a legmeghatározóbb részecskék a rendszerben az 1:1 komplexek. A komplexképződés pH > 5 fölött kezdődik, ami egy pH-egységgel nagyobb, mint a Cu(II)-komplexek esetén, és a folyamatban egy, kettő és három imidazol-koordinációjú komplexek alakulnak ki. Ezek közül a fő részecske a NiL összetételű komplex, amelynél a szekvenciában jelenlévő összes hisztidin koordinálódik a fémionhoz és makrokelát alakul ki oktaéderes geometriával. A hisztidinek számának növekedése a koordinációs szférában növeli az imidazol-koordinációjú komplexek stabilitását. Továbbá a C-terminális végen jelenlévő karboxilátcsoport koordinációjával és a komplex töltésének megváltozásával fokozza annak stabilitását. Extra lúgfogyasztó folyamat figyelhető meg 8-9 pH tartományban és ez a folyamat a peptidnitrogének deprotonálódásához és koordinációjához köthető. Az első két amidnitrogén deprotonálódása kooperatív módon megy végbe, mely folyamat során NiLH₂ összetételű komplex keletkezik és $[N(\text{Im}), N^-, N^-, N(\text{Im})]$ koordinációs móddal írható le a szerkezete, 7,5,6-tagú csatolt kelát stabilizálja, ami síknégyzetes geometriájú. A következő deprotonálódási lépésben három amid- és egy imidazolnitrogén vesz részt a fémion megkötésében, így egy NiLH₃ összetételű részecske keletkezik.

Az **Ac-HGGH-NH₂** ligandumnál két részecske képződését feltételezik. Az egyik az imidazol koordinációjával kialakuló NiL részecske. A másik a NiLH₃, amelyben három amid- és egy imidazolnitrogén alakítja ki a síknégyzetes komplexet. Abban az esetben, ha a C-terminális végtől számolva harmadik helyen foglal helyet a glicin, akkor ellentétes előjelű Cotton effektus mérhető, mind a Cu(II)- mind a Ni(II)-komplexek esetén. Ezen ligandum NiLH₃ komplexénél is ezt tapasztalták.

A három hisztidint tartalmazó pentapeptidek (**Ac-HAHVH-NH₂**, **Ac-HVHGH-NH₂**, **Ac-HGHVH-NH₂**)¹⁰⁵ NiLH₂ és NiLH₃ komplexeinél szélesebb abszorpciós sáv jelenik meg, mint a tri- és tetrapeptideknél, ami koordinációs izomerek képződésére utal. A CD spektrumok alapján további következtetéseket lehet levonni az izomerek arányáról. A C-terminális végen lévő hisztidin részvételével kialakuló NiLH₂ komplex általában a domináns részecske, erre jó példa az Ac-HVHGH-NH₂ ligandum Ni(II)-komplexe. Ha a C-terminális végen nagyobb térkitöltésű csoport található (például az Ac-HGHVH-NH₂, Ac-HAHVH-NH₂), akkor viszont az izomerek összehasonlítható mennyiségben vannak jelen. Nagyobb pH-n egy újabb amidnitrogén deprotonálódás következik be, és NiLH₃ összetételű komplex keletkezik [N⁻, N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációs móddal.^{92, 98, 128} Ennél a komplexnél is lehetőség van koordinációs izomerek kialakulására, szintén a közbenső és a C-terminális végen lévő hisztidin részvételével és általában az utóbbinál történő fémionkötődés a kedvező szterikus okokból, de például az **Ac-HAHVH-NH₂** ligandumnál összehasonlítható mennyiségben keletkezik a két izomer. Fémionfelesleg jelenlétében a pentapeptideknél kétmagvú komplexek is képződnek lúgos körülmények között. A legnagyobb mennyiségben a Ni₂LH₄ részecske van jelen, amelyben a koordinációs mód [N(Im), N⁻, N⁻, N(Im)] és [N⁻, N⁻, N(Im)]. A két peptidnitrogén deprotonálódása kooperatív módon megy végbe és kisebb pH-n, mint az egymagvú komplexeknél. pH > 10,5 fölött az acetamidocsoport is képes deprotonálódni és Ni₂LH₅ összetételű komplex keletkezik, amelynél az N-terminális végen lévő imidazolnitrogén kizorul a koordinációs szférából és átveszi a helyét az ötödik amidnitrogén.

A Ni(II)-**Ac-HAAHVH-NH₂**⁹⁸ rendszerben fiziológiás pH-n makrokelát szerkezetű komplex alakul ki az imidazolnitrogének részvételével, majd az amidnitrogének deprotonálódásával egymagvú komplexek keletkeznek, többmagvú komplexeket nem tudtak kimutatni. A NiLH₁ részecskében feltételezhetően a fémion koordinálásában egy imidazol- és egy amidnitrogén vesz részt oktaéderes környezetben. A NiLH₃ komplex a már fentebb említett koordinációs móddal és geometriával jellemezhető. A közbenső és a C-terminális hisztidinben lévő imidazolnitrogén alkalmas arra, hogy horgonydonorként viselkedjen és elősegítse az N-terminális vég felé történő amidnitrogén deprotonálódást, ezáltal lehetőség nyílik koordinációs izomerek létrejöttére. A két

izomer közül a közbenső hisztidin részvételével kialakuló részecske lesz a domináns.

*Ac-HPHH-NH₂*¹⁰⁸ Ni(II)-ionnal való komplexképződésének vizsgálata során nem tapasztalták csapadék leválását. A NiL összetételű részecske viszonylag széles pH-tartományban uralkodó (6,5-8,6). Ligandumfeleslegnél biszkomplex képződése is valószínűsíthető, amelyben a második ligandum belépése során kettő, de akár három imidazolnitrogén is részt vehet a fémion megkötésében egy szabályos oktaéderes geometriát létrehozva. A pH emelésével NiLH₂ összetételű komplex keletkezik, amely folyamatban két amidnitrogén vagy egy amidnitrogén és egy koordinált vízmolekula deprotonálódása megy végbe.

A humán prion fehérje fragmenseinek és mutánsainak Ni(II)-ionnal való komplexképződési folyamatait is tanulmányozták.¹²⁹⁻¹³⁰ A HuPrP(84-114)H85A és HuPrP(84-114)H96A ligandumok két hisztidint tartalmaznak, az elsőben a 96-os és 111-es, a másikban a 85-ös és 116-os pozícióban. A H85A és H96A jelölés azt jelenti, hogy a számmal jelölt pozíciójú hisztidineket alanin helyettesíti. A HuPrP(84-114)H85A ligandum két ekvivalens Ni(II)-iont képes oldatban tartani, ezzel ellentétben a másik csak egy ekvivalens Ni(II)-ion megkötésére képes. Ez azzal magyarázható, hogy a 85-ös pozícióban lévő hisztidin az oktarepeat tartományon belüli hisztidinekhez tartozik és ennek a horgonycsoportnak a legkisebb az affinitása a Ni(II)-ionok felé. Az egymagvú [3N⁻, N(Im)] koordinációs módú komplexek kialakulása az amidnitrogének egy lépésben történő deprotonálódásával és koordinációjával megy végbe. A prionfragmensekben lévő hisztidinek imidazolnitrogénjeinek Ni(II)-ion szelektivitása is megadható volt az eredmények alapján, amely a következő sorrendben csökken: H96 > H111 > H85. Olyan fragmenseket is vizsgáltak, ahol a három (H85, H96, H111) kötőhelyet modellező szekvenciákat kapsolták össze (Ac-PHAAAGTHSMKHM-NH₂). Arra a következtetésre jutottak, hogy a Ni(II)-ion megkötésének legjobban a GTHS szekvencia kedvez és a PHAA rész Ni(II)-ionkötő affinitása a legkisebb. Ezzel ellentétben a Cu(II)-ion az MKHM szekvenciához kötődik a legnagyobb mértékben. Ez a különbség a két fémion koordinációs geometriájának eltéréséből ered. Amíg a Ni(II)-ion síknégyszetes, addig a Cu(II)-ion síknégyszeteshez hasonló geometriát mutat, de a torzult oktaéderes geometriát kedveli. Így érthető, hogy a Ni(II)-ion kedvezőbben kötődik a rövidebb oldalláncot tartalmazó GTHS szekvenciához, a réz(II)ion előnyben részesíti az axiális koordinációra hajlamos hosszabb oldalláncokat tartalmazó MKHM szekvenciát. A két fémion megoszlása a modellpeptidek kötőhelyei között nem teljesen ugyanolyan, mint a prion peptidfragmenseknél. Ez azt bizonyítja, hogy nem kizárólag a közvetlen kapcsolatot biztosító aminosavszekvenciától függ a fémion-szelektivitás, hanem a távoli oldalláncok is befolyásoló szerephez jutnak.

Összefoglalva megállapítható, hogy a Ni(II)-ion N- és C-terminálison egyaránt védett multihisztidin-tartalmú peptidekkel képzett komplexeire az jellemző, hogy enyhén savas és fiziológiás körülmények között kissé torzult oktaéderes szerkezetű NiL összetételű részecske keletkezik, amelyben a hisztidin imidazolnitrogénjéhez kötődik a fémion makrokelát struktúráját kialakítva. Erre a komplexre jellemző kis intenzitású abszorpciós sávok a látható spektrumban körülbelül 370 és 600 nm-nél jelennek meg és nincs mérhető CD aktivitása sem. A pH növelésével az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja megy végbe, és Ni(II)-hidroxid csapadék nem válik le. Ezzel a folyamattal együtt drasztikus változás következik be az abszorpciós és CD spektrumokban, ami a Ni(II)-komplexek síknégyszetes geometriává történő alakulását jelzi. A NiLH₃ összetételű részecske keletkezése arra enged következtetni, hogy a három amidnitrogén deprotonálódása általában egymást átfedő lépésekben játszódik le. Az [N⁻, N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációs módú síknégyszetes komplex szerkezetére egy 430-440 nm-nél megjelenő intenzív abszorpciós sáv és 420-425 nm között egy negatív, míg 500 nm körül egy pozitív Cotton effektus utal.^{98, 128, 131} Ezek a CD paraméterek összhangban vannak azzal, hogy ha a Ni(II)-ion hisztidint tartalmazó peptidekhez kötődik és 4N-es komplexet képez, akkor a kisebb hullámhosszoknál negatív, míg a nagyobb hullámhosszoknál pozitív CE mérhető az XZH összetételű peptidekre (ahol X a glicin és prolin kivételével bármilyen aminosav lehet). Ugyanakkor a HXH szekvenciát tartalmazó peptideknél ki tudtak mutatni NiLH₂ összetételű komplexeket is, amelyekben [N(Im), N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációs geometria feltételezhető. Ezen komplexek képződését a látható spektrumban 440-470 nm között megjelenő intenzív sáv kíséri. A Ni(II)-ionok imidazol-koordinációjú komplexei kisebb stabilitásúak, mint a Cu(II)-ionokkal képzett ugyanilyen összetételű részecskék. Ez azzal magyarázható, hogy a szabályos oktaéderes geometriájú Ni(II)-ionok kevésbé hajlamosak makrokelát képzésére.¹⁰⁰

2.5. Cu(II)-komplexek redoxi sajátosságai, SOD modell Cu(II)-komplexek

A Cu(II)-ionok elemi rézzé, illetve Cu(I)-ionná alakulását és a Cu(I)-ion elemi rézzé történő redukcióját a következő redoxipotenciál értékek jellemzik vizes közegben¹³²:



A Cu₂Zn-szuperoxid diszmutáz enzim működésekor Cu(II)/Cu(I) redoxireakció valósul meg, mely egyelektron-átmenettel jár, és az oda- és visszaalakulás is megtörténik. Ahhoz, hogy ezt az enzimet modellezni tudjuk, ismernünk kell, mind a rézre, mind a Cu(II)-ligandum rendszerben kialakuló komplexekre jellemző formálpotenciál értékeket. A komplexképződés

megváltoztatja a fenti egyenletekben szereplő redoxipotenciál értékeket. A Cu(II)/Cu(I) rendszer elektrokémiai paramétereit nagymértékben a Cu(II)-komplexek koordinációs módja határozza meg. A Cu(II)-ion komplex vegyületeiben a leggyakoribb koordinációs szám a 4, 5 és 6, de szabályos geometriák csak ritkán fordulnak elő, a legjellemzőbb a tetragonálisan torzult oktaédes szerkezet. A Cu(I)-ion ezzel ellentétben a koordinációs szám értékétől függően tetraédes, síkháromszöges vagy lineáris szerkezetű lehet.¹³³ Ciklikus voltametriás mérés során a Cu(II)-iont a komplexben Cu(I)-ionná redukáljuk, majd azt visszaoxidáljuk Cu(II)-ionná, eközben a komplexek térbeli szerkezete megváltozik. Ennek eredményeképpen többnyire kvázireverzibilis redoxi folyamat megy végbe, a katódos és az anódos csúcsok távolsága nagyobb, mint ami az egyelektronos redoxi folyamatok esetén várható.

Már korábban is tanulmányozták a különböző N-heteroaromás gyűrűt tartalmazó ligandumok Cu(II)-komplexeinek redoxi sajátságait. Vizsgáltak egyszerű ligandumok, mint a piridin és az imidazol, illetve a hisztidin, valamint hisztidint tartalmazó oligopeptidek és bisz(imidazolil)-származékok Cu(II)-ionnal alkotott komplexeit. Az 1. táblázat tartalmazza az egyes rendszerekre jellemző redoxipotenciál értékeket.

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

ligandum	redoxipotenciál érték (V)	vonatkoztatási elektród
piridin; imidazol; hisztidin ¹³⁴	0,240; 0,317; -0,170	NHE
ciklo(GH) ₄ ; ciklo(GHG) ₂ ¹³⁵	0,195; 0,219	NHE
GH, GHG, GHK, GGH ¹³⁶⁻¹³⁷	-0,220-(-0,120)	SCE
Ac-HGGG-NH ₂ ¹²³	-0,299-(-0,270)	NHE
Ac-(PHGGGWGQ) _n -NH ₂ ahol n=1,2,4 ^{123, 125}	-0,530-(-0,299)	NHE
Ac-GGGTH-NH ₂ ¹²⁴	0,040	Ag/AgCl
N-Ac-His; N-Ac-Hm ¹²⁶	0,338; 0,293	NHE
Ac-HXH-NHMe, Ac-HXXH-NH ₂ , Ac-HHGH-NHMe, Ac-HHVGd-NH ₂ , Ac-HXHZH-NH ₂ , Ac-S3H4-NH ₂ ^{a 126}	0,200-0,350	NHE
bisz(imidazolil)-származékok ¹²⁷	0,055-(-0,117)	NHE

^a X, Z lehet G: glicin, V: valin, A: alanin, P: prolin, S: szarkozin. Me a metilsoportot jelöli.

A piridin és imidazol egyszerű ligandumok aromás nitrogéneket tartalmaznak, és komplexképződéskor azon keresztül kapcsolódnak a fémionhoz monodentát módon. Könnyen redukálható a Cu(II)-ion, és pozitív redoxipotenciál jellemzi a folyamatot. A hisztidin esetében negatívabb formálpotenciál értéket mértek, ez arra utal, hogy stabilisabb komplex keletkezik (háromfogú koordináció is megvalósulhat), melyben a fémion az imidazolnitrogéneken kívül az aminocsoporthoz is koordinálódik.¹³⁴

Szintén pozitív redoxipotenciál értékeket mértek hisztidint tartalmazó ciklopeptidek Cu(II)-komplexeinek vizsgálata során. A legpozitívabb redoxipotenciál értéket a $[\text{Cu}\{\text{ciklo}(\text{Gly-His})_4\}]^{2+}$ komplexre kapták, amelyben a fémion az imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik. Az amidnitrogén kötődése a fémionhoz azonban csökkenti ezeket az értékeket.¹³⁵

Nem védett és védett peptidszarmazékok Cu(II)-komplexeit is vizsgálták (1. táblázat), amelyek tartalmaznak legalább egy hisztidint. Számos esetben amidnitrogénes koordinációjú Cu(II)-komplexeiket vizsgálták. A hisztidintartalmú ligandumok esetében az amidnitrogének deprotonálódása következtében kialakuló komplexek fémcentruma nehezebben redukálható, vagyis negatívabb redoxipotenciál értékek mérhetőek.^{123, 136-137} A negatív redoxipotenciál érték azzal magyarázható, hogy a koordinációs szférában helyet foglaló amidnitrogének erősítik az ekvatoriális teret, ami a Cu(I)-ionnak nem kedvez. Egyes ligandumok Cu(II)-komplexeinek vizsgálata során azt tapasztalták, hogy az anódos csúcsok áramerősségének értéke kisebbnek adódott, mint a katódos csúcsoké, ami a képződő Cu(I)-komplexek kémiai reakciójára utal.¹³⁸

Az aminosavak esetén a CuL_2 komplexek redoxipotenciál értékei mind 0 V körüliek, és megállapították, hogy nincs jelentős hatása az oldalláncnak ezekre az értékekre. A legnagyobb hatása az imidazolil-oldalláncnak van, hisztidin esetében a kapott érték $\sim -0,2$ V körüli, amely azt mutatta, hogy stabilisabb lesz a kialakuló komplex a többihez képest.¹³⁴

Több hisztidint tartalmazó ligandumoknál ligandumfelesleg esetén fiziológiás pH-tartományban CuL és CuL_2 komplexek az uralkodóak. A peptidek ezen komplexeinek redukálhatósága hasonló az egyszerű hisztidinszarmazékokhoz, 0,200-0,400 V tartományba esik. A CuL redoxipotenciál értékei függenek a peptidláncban lévő hisztidinek számától és egymáshoz viszonyított helyzetétől is. A koordinálódó imidazolnitrogének számának növekedésével csökken a redoxipotenciál érték. Egyre telítettebbé válik a fémion koordinációs szférája az imidazolnitrogének számának növekedésével, ami stabilisabb szerkezetet eredményez.¹²⁶

Bisz(imidazolil)-szarmazékok Cu(II)-ionnal alkotott komplexeinek a redoxi sajátosságait is meghatároztuk.¹²⁷ Ligandumfelesleg esetén négy imidazol-koordinációjú komplexek alakulnak ki, és CuL_2H_x ($x=0-2$) összetétellel írhatók le. A Cu(II)-His-BIMA 3:2 arányú rendszerben $\text{Cu}_3\text{L}_2\text{H}_4$ összetételű imidazolátohidas komplex lesz az uralkodó fiziológiás pH-tartományban. A fent említett szerkezetek hasonlítanak a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumához. CuL_2H_x ($x=0-2$) komplexek redoxi paramétereinek meghatározására lehetőség volt, de a hárommagvú komplex ciklikus voltammetriával nem volt mérhető. A kapott redoxipotenciál értékekből az állapítható meg, hogy nagyobb méretű oldallánc esetén könnyebb redukálni a központi fémiont. A négy imidazol-koordinációjú

CuL_2 komplexek stabilitási állandóinak logaritmusai és a komplexre jellemző formálpotenciál értékek között lineáris összefüggés mutatkozik.

Összességében megállapítható, hogy a komplexek formálpotenciál értékeinek változása szoros összefüggésben áll a komplex stabilitásával. Minél stabilisabb a komplex, annál nehezebben lehet redukálni azt, ami negatívabb redoxipotenciál értéket eredményez. Minden esetben egyelektron-átmenettel járó, kvázireverzibilis reakció játszódik le. Az anódos és katódos csúcsok közötti távolság nagyobbak adódnak, mint a 0,059 V, ami azzal magyarázható, hogy az elektród felületén lassú elektrontranszfer folyamat megy végbe.¹²⁶

Valamennyi bemutatott Cu(II)-komplexre jellemző a pozitív redoxipotenciál. Ez azért fontos, mert ahhoz hogy egy komplex a szuperoxid gyökiont elbonthassa, a megsemmisítéshez szükséges reakcióra jellemző potenciáltartományba (-0,16 V - +0,89 V) kell, hogy essen a redoxipotenciál értéke.¹³⁹



A Cu,Zn-SOD enzimre jellemző formálpotenciál értékét is megmérték, ami 0,360 V-nak adódott.¹⁴⁰ A Cu(II)-komplexekre kapott redoxipotenciál értékek a SOD szempontjából kedvező tartományban vannak, így ezek a komplexek potenciális SOD modellek.

Korábbi vizsgálatok során számos Cu(II)-komplex SOD aktivitását határozták meg, melyek között voltak funkcionális modellek és az enzim aktív centrumának kötésviszonyait utánzó réz(II)komplexek is.

A SOD modellek aktivitása sok tényezőtől függ. Általánosan az állapítható meg, hogy egy komplex SOD aktivitását az határozza meg, hogy mennyire gyors annak a ligandumnak a cseréje, amely axiálisan kötődik a fémcentrumhoz, és hogy szterikusan mennyire gátolt a szuperoxid gyökion bekötődése a reakciócentrumba.¹⁴¹⁻¹⁴³ Abban az esetben mérhető nagyobb SOD aktivitás, ha a Cu(II)-ion valamelyik koordinációs helyét nitrogén-donoratomot tartalmazó gyűrűs vegyület (pl: imidazol, piridin) foglalja el, a keletkező Cu(II)-komplex torzult geometriát mutat¹⁴⁴, és emellett a fémiont körülvevő koordinációs környezet nem olyan merev.¹⁴⁵⁻¹⁴⁶ A SOD aktivitás azonban csökken, ha erős ligandumtér alakul ki.¹⁴⁷⁻¹⁴⁸

Többfajta ligandum Cu(II)-ionnal alkotott komplexének vizsgálták a SOD aktivitását. Mivel a méréseket foszfát-pufferben hajtják végre, ezért a Cu(II)- PO_4^{3-} rendszer aktivitásának mérésére is szükség volt. Azt állapították meg, hogy a CuHPO_4 önmagában is SOD aktív ($1,06 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$).¹⁴⁵

Az irodalomban található adatok alapján a makrociklusos ligandumok, a ciklo-HisHis¹⁴⁵, dipeptidekhez kapcsolt ciklodextrinek¹⁴⁷⁻¹⁴⁸ Cu(II)-komplexei mutattak nagyobb SOD aktivitást.

BSc szakdolgozati, illetve diákköri munkám során a bisz(imidazolil)-származékok Cu(II)-vel alkotott komplexeire határoztam meg a SOD aktivitás értékeket.¹²⁷ Ligandumfelesleg esetén négy imidazolnitrogéne keresztül kötődik a fémion, és ez a koordinációs módú komplex lesz a meghatározó az oldatban. A Cu(II)-ion koordinációs szférája ezeknél a komplexeknél hasonlít a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumára, de a komplexek szerkezete befolyásolja az aktivitást. Minél merevebb szerkezetű a komplex, a Cu(II)/Cu(I) átalakulás, azaz a redukció annál nehezebben megy végbe, a SOD aktivitás annál kisebb. A vizsgált komplexekben a két hattagú kelát merev szerkezetet eredményez, a mért aktivitás ezekre a komplexekre elhanyagolhatóan kicsinek adódott. A Cu(II)-His-BIMA 3:2 arányú rendszerben a fiziológiás pH-tartományban egy imidazolátohidas $Cu_3L_2H_4$ összetételű komplex van jelen. Ennek az aktivitása jelentősen nagyobb a többi vizsgált komplexhez képest. Ez összhangban van azzal az általános megállapítással, hogy a komplexek közül a többmagvúak, ezek közül az imidazolátohidas komplexek nagyobb aktivitást mutatnak, mint az egymagvúak.

Nem védett, egy hisztidint tartalmazó peptidek vizsgálata során azt állapították meg, hogy ha hisztidint is tartalmaz a szekvencia a glicin mellett, akkor csökken az aktivitás, méghozzá a következő sorrendben: GGG>GGGG>GG>HGG>GHG>GGH>GGHG.¹⁴⁹ Azt is megfigyelték, hogy a fémion körüli ekvatoriális sík torzulásával nő az aktivitás. A prion modellek SOD Cu(II)-komplexei is mutatnak kismértékű SOD-aktivitást.¹⁵⁰

Több hisztidint tartalmazó védett és nem védett peptideket is tanulmányoztak. Azt a következtetést vonták le egyrészt, hogy az N-acetilezett származék Cu(II)-komplexe hatékonyabban bontja a szuperoxid gyökániont. Ezt azzal magyarázták, hogy a kialakuló komplex kisebb stabilitású, valamint a fémion körül van szabad koordinációs hely, ahová a szubsztrátum bekötődhet. Másrészt azt is kimutatták, hogy ha a fémion koordinációja az amidnitrogének részvételével történik, akkor kisebb aktivitás mérhető. Tehát a $CuLH_2$ nem olyan hatékony, mint a makrokelátot tartalmazó CuL . Ez annak tudható be, hogy az ekvatoriális térerősség nagyobb az amidnitrogének részvételével kialakuló komplexben, mint a csak imidazol-koordinációjú részecskében.^{101, 106, 151}

Kutatócsoportunkban is végeztek SOD aktivitás mérést multihisztidin peptidek Cu(II)-komplexeire. A CuL komplexek nagyobb aktivitást mutatnak, mint a $CuLH_1$ komplexek, amelyek összhangban vannak, más kutatócsoportok eredményeivel. A legnagyobb aktivitást a HXH szekvenciájú peptidek esetén mértek, kiugró aktivitást Ac-HisSarHisSarHisSarHis-NH₂ CuL összetételű komplexe mutatott.

Általánosan megállapítható, hogy azok a komplexek ígéretes SOD modellek, amelyeknél a réz(II)ion megkötésében több imidazolnitrogén vesz részt. A SOD

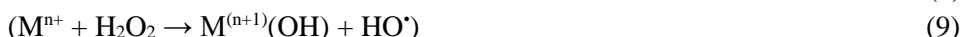
aktivitás csökken, ha a koordinációs szférába amidnitrogének lépnek be, vagy ha a pH csökkenésével megnő a szabad Cu(II)-ionok mennyisége.¹²⁶

2.6. Fehérjék oxidációja

A következő fejezetben azt mutatom be, hogy oxidatív környezetben mi történhet a peptidláncban lévő aminosavakkal és magával a peptiddel/fehérjével. Erre azért van szükség, mert a munkám egy részében arra kerestem a választ, hogy a vizsgált prion modellek hogyan viselkednek Cu(II)/H₂O₂ oxidatív rendszerben.

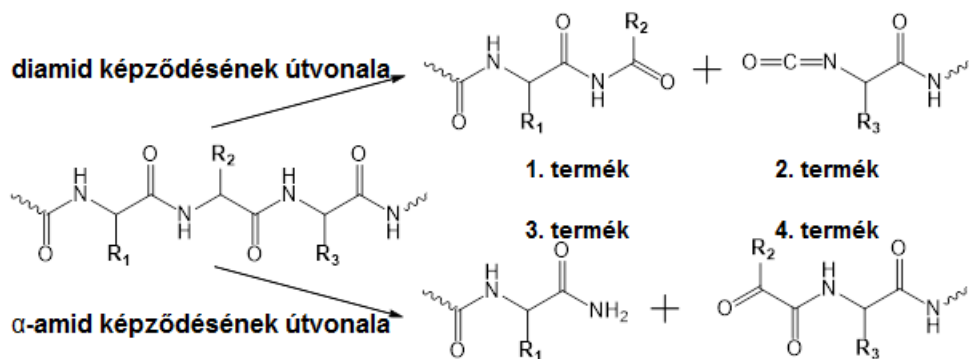
A fehérjék oxidációjáért mind a fémionok mind a szabad gyökök együttesen felelősek, úgynevezett fémion katalizált oxidációban (MCO) vesznek részt, ezzel károsítva a fehérjét. Az oxidált fehérjék felhalmozódnak az öregedés, az oxidatív stressz és más kóros körülmények között, mint például idegrendszeri betegségek (Alzheimer kór vagy a prion betegségek⁴⁰). Az intracelluláris oxidált fehérje mennyiségének egyensúlyát a fehérje oxidáció és lebomlás aránya mutatja meg. Ezt az egyensúlyt számos tényező befolyásolja többek között a ROS képződése és a proteáz aktivitása/koncentrációja. Az oxidáció a reaktív oxigén gyökök (•OH, •OOH, O₂⁻, NO•) túlermelődése miatt következik be a fehérjében és különböző oldalláncaiban.

Az élő szervezetben a legnagyobb mennyiségben a H₂O₂ a forrása a ROS-oknak. A fémion katalizált oxidáció (MCO) során a fémion koordinálódik a ligandumhoz, H₂O₂ jelenlétében redukálódik és közben szabadgyökök keletkeznek, amelyek károsítják a koordinációs szféra közvetlen közelében lévő aminosavoldallánccokat. A hidroxilgyök is ilyen szabadgyök, ami a legfontosabb szerepet játssza a fehérjék károsodásában, Fenton típusú reakcióban keletkezik, amelyet a 8-10. egyenletek mutatnak be.¹⁵²



Ezek a gyökök képesek az aminosavakkal reagálni instabil közttermék keletkezése közben, majd ez alakul tovább aldehiddé, α-keto-karbonsavvá vagy akár szén-dioxidot és ammóniát is veszíthet az aminosav.¹⁵³⁻¹⁵⁴ A ROS képes a fehérje α-CH csoportját oxidálni és azáltal fragmentálódhat, különböző aromás és alifás oldallánccokkal is tud reagálni. Az aromás oldallánccok nitrálása, nitrozilálása, klórozása mehet végbe. A ROS minden fajtájára igen érzékeny a metionin¹⁵⁵ és a cisztein, illetve még a hisztidint¹⁵⁶ is képesek oxidálni a reaktív oxigén származékok.¹⁵⁷ *Az általunk vizsgált ligandumokban oxidációra hajlamos aminosavak (metionin és hisztidin) vannak, amelyek oxidációjára később bővebben is kitérek.*

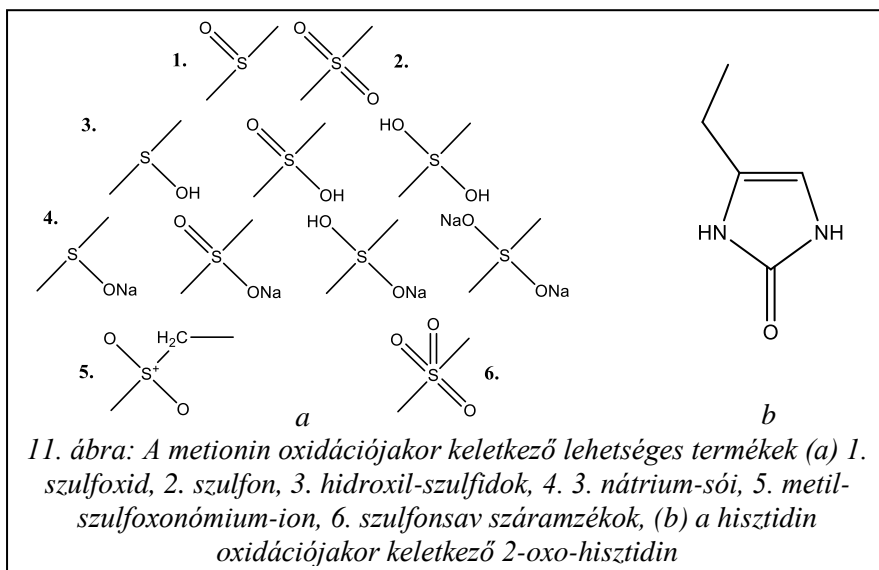
A peptid hasadására két útvonal lehetséges, amelyet a 10. ábra¹⁵⁸ mutat be:



10. ábra: A peptidlánc oxidatív hasadása

A felső út mutatja azt, amikor egy aminosav – jelen esetben az ($R_2 - \alpha\text{-CH}$)– C-terminális felőli kötése hasad. Az alsó azt szemlélteti, amikor az $\alpha\text{-CH}$ N-terminális felőli kötése hasad. A keletkező termékek közül mindig csak az egyik tartalmaz egy oxigén atommal többet, ami az ábrán a 1. és 4. termék elnevezésének felel meg, azaz az oxigénatom az aminosav $\alpha\text{-CH}$ csoportjára kerül. Az 1. termék egy diamid, a 2. termék egy izocianát, a 3. termék egy savamid, míg a 4. termék egy α -keto-acil származék.¹⁵⁸

A metionil-oldallánc fémion katalizált oxidációjakor (MCO) több termék is keletkezhet (11. a ábra), ezek közül a leggyakoribb a metionin-szulfoxid (11. a, 1. ábra) és a metionin-szulfon (11. a, 2. ábra). A metionin oxidációja még fémion távollétében is végbemegy H_2O_2 -dal¹⁵⁹⁻¹⁶⁰, ezt a reakciót a Cu(II) -ion már kis mennyiségben is katalizálja. A metionin oxidációja néhány fehérjében kis



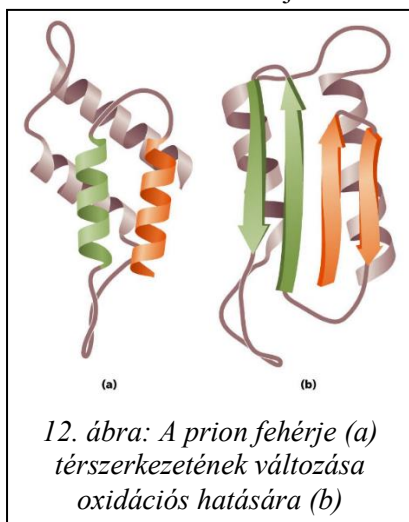
11. ábra: A metionin oxidációjakor keletkező lehetséges termékek (a) 1. szulfoxid, 2. szulfon, 3. hidroxil-szulfidok, 4. 3. nátrium-sói, 5. metil-szulfonoxónium-ion, 6. szulfonsav származékok, (b) a hisztidin oxidációjakor keletkező 2-oxo-hisztidin

változást okoz a biológiai funkciókban, ugyanakkor az oxidált metionin növeli a fehérje hidrofóbicitását és hatással van a fehérje konformációjára.

Az aggregálódott amiloid- β -ban is találtak oxidált metionint, metionin-szulfon formájában, ez a reakció azonban nem visszafordítható.¹⁵⁵ A prion proteinnél viszont azt találták, hogy konformációváltozás következett be a fehérje oxidációja során (12. ábra).¹⁶¹ A szulfoxiddá történő alakulás reverzibilis reakció és védi a láncban lévő többi aminosavat a MCO-tól. A metionin reverzibilis oxidációja mintegy beépített szabadgyökegyensúly fenntartására szolgál annak érdekében, hogy a visszafordíthatatlan oxidáció elkerülhetővé váljon. Ez a reverzibilis folyamat antioxidáns mechanizmusnak tekinthető és számos enzim szabályozásánál is szerepet játszik.

Az élő szervezetben nemcsak a metionin, de a *hisztidin* is képes fémion katalizált oxidációban részt venni

hidrogén-peroxid jelenlétében. A Cu(II)-hisztidin komplex elősegíti a hidrogén-peroxid bomlását és abból hidroxilgyökök képződését, eközben a Cu(II)-ion Cu(I)-ionná redukálódik, a keletkezett szabadgyök károsítja a hisztidint.¹⁶² A protein szekvenciája, szerkezete és a fémion-protein geometriája is befolyásolja a hisztidin oxidációjának mechanizmusát. Körülménytől függően keletkezhet 2-oxo-hisztidin (11. b ábra), aszparagin, aszparaginsav. Több kutatócsoport is kimutatta a hisztidin 2-oxo-hisztidinné történő oxidációját.^{163 164-166} A Cu,Zn-SOD enzim H₂O₂-dal való oxidációja¹⁶⁷ során is az előzőleg említett termék keletkezik, valamint az emberi növekedési hormon (hGH)¹⁶⁸ és az emberi relaxin¹⁶⁹ vizsgálatánál is erre a következtetésre jutottak. Oxidációs vizsgálatoknak vetettek alá olyan fehérjét is, amelyben a Fe(II)-ion hisztidinekhez a Zn(II)-ion ciszteinekhez kötődik. A oxidációs vizsgálatok eredménye azt mutatta, hogy az oxidációra igen érzékeny ciszteinekkal ellentétben a hisztidin oxidációja következett be, ami bizonyítja, hogy az MCO a fémion kötőhelye közvetlen közelében megy végbe.¹⁷⁰ Arról is beszámoltak, hogy egyéb ROS által aktivált szinglett oxigén a bőrszövetekben a hisztidin térhálósodását okozhatja. Ez a fajta térhálósodás és a szálak közötti hisztidin-fémion hidak a legvalószínűbb okai az amiloid- β aggregációjának is.¹⁷¹



3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK ÉS ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

3.1. Felhasznált vegyszerek, vizsgált ligandumok

A titrálások kivitelezésére $\sim 0,2$ mol/dm³, pontosan ismert koncentrációjú argon gáz alatt tárolt KOH-oldatot használtunk. A KOH pontos koncentrációját kálium-hidrogén-ftalát oldattal pH-potenciometriásan határoztuk meg. A mintában az állandó ionerősséget (0,20 mol/dm³) 1 mol/dm³ koncentrációjú KCl-oldat hozzáadásával biztosítottuk. A ligandumok komplexképződésének vizsgálatára pontosan ismert koncentrációjú CuCl₂- és NiCl₂-oldatot használtunk, azok koncentrációjának meghatározása gravimetriásan oxinát formában történt.

A ciklikus voltammetria során a réz(II)iont Cu(NO₃)₂ formájában adtuk a mintához, háttéreelektrolitként KNO₃-oldatot használtunk, melynek koncentrációja a mintában 0,20 mol/dm³ volt.

A fent említett oldatok a Reanal Finomvegyszergyár Zrt. által gyártott, a.l.t. minőségű vegyszerekből készültek.

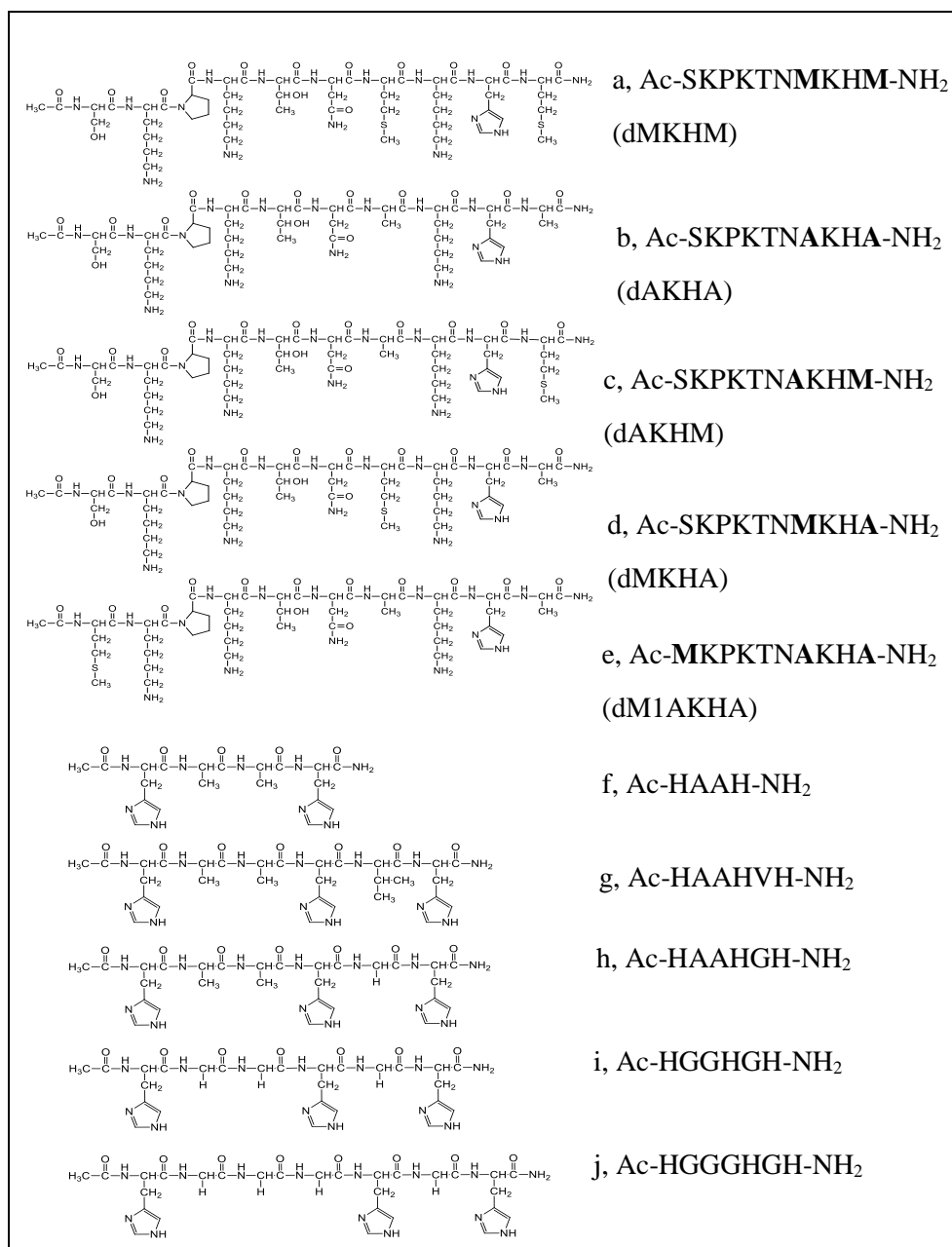
Az oxidációs vizsgálatokhoz H₂O₂-ot használtunk oxidálószerként, és Na₂EDTA-t a reakció leállításához, ezek a reagensek rendre a Molar Chemicals Kft. és a Reanal Finomvegyszergyár Zrt. cégtől származnak.

A SOD aktivitás méréseket NBT, xantin-oxidáz enzim és xantin felhasználásával valósítottuk meg, amik Sigma-Aldrich termékek voltak.

A szintézishez használt vegyszerek, oldószerek mindegyike kereskedelmi forgalomból került beszerzésre és azokat tisztítás nélkül alkalmaztuk. Az aminosavak 9-fluorenil-metoxi-karbonil (Fmoc) védőcsoportot tartalmaznak és azok (Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp(O^{*t*}Bu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH és Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH), valamint a 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium tetrafluoroborát (TBTU) és a Rink Amide AM gyanta a Novabiochem-től (Svájc) származik. Az N-hidroxi-benzotriazol (HOBt), a 2,2'-(etiléndioxi)dietántiol (DODT), az 1-metil-2-pirrolidin (NMP), a 2-metil-bután-2-ol és a triizopropil-szilán (TIS) a Sigma-Aldrich által forgalmazott termékek. Az N,N-diizopropil-etilamin (DIEA), és a trifluoecetsav (TFA) a Merck Kft termékei. A szintézis célra alkalmas N,N-dimetil-formamid (DMF) és az ecetsavanhidrid (Ac₂O) a VWR International, míg a piperidin, a diklórmetán (DCM), a dietil-éter (Et₂O) és a 96%-os ecetsav a Molar Chemicals Kft. terméke.

A HPLC-s tisztaságellenőrzéshez illetve a peptidek tisztításához használt acetonitril (ACN) a VWR International, míg a trifluoecetsav (TFA) a Sigma-Aldrich terméke és mindkét vegyszer HPLC-tisztaságú.

A vizsgált peptideket a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén lévő Liberty 1 típusú peptidszintetizáló készülékkel állítottuk elő. A 13. ábrán látható a peptidek szerkezeti képlete.



13. ábra: A ligandumok szerkezeti képletei

3.2. Szilárdfázisú peptidszintézis

A szilárdfázisú peptidszintézist¹⁷² R. B. Merrifield dolgozta ki, amiért 1984-ben Nobel-díjat kapott. A módszer lényege az, hogy az előállítás szilárd hordozón (gyantán) történik. A gyanta finomszemcsés térhálós polimermátrix, amely szerves oldószerben jól duzzad és olyan funkciós csoportok vannak rajta, amihez kémiai reakcióval kapcsolhatók az aminosavak. Heterogén fázisú a reakció, így ez elméletileg lassúvá teszi az eljárást, ennek ellenére mégis számos előnye miatt hatékony módszer. A nemkívánatos reagensek egyszerű szűréssel eltávolíthatók a reakciótérből, így nem kell a peptidet minden kapcsolás után kicsapni, majd újra feloldani, ezáltal elkerülhető a kitermelés csökkenése. Az így előállított termékek hozama jó, a könnyű feldolgozhatósága és az, hogy automatizálható mind modernebb eljárássá teszik. Az automatizálást a módszer ciklikus ismételhetősége tette lehetővé.¹⁷³ A módszer hátránya, hogy nagy reagensfőlölséget igényel, abban az esetben ha ezt nem használjuk, akkor rövidebb szekvenciájú, hiányos peptidek keletkezhetnek. Ennek kiküszöbölésére a reagensek nagy feleslegben történő alkalmazását, hosszabb reakcióidőt vagy a kapcsolási lépések ismétlését alkalmazhatjuk.

Az alkalmazott technika alapján lépésenkénti szintézisről vagy fragmentszintézisről, míg a reakció kivitelezése szerint beszélhetünk szakaszos és áramló oldatos eljárásról is. A szintetikus eljárás során alkalmazhatunk Fmoc/*t*Bu¹⁷⁴ vagy Boc/Bzl¹⁷⁵ stratégiát. Munkánk során az elsőt használtuk, amelyben a név arra utal, hogy az aminosavszármazékok N-terminális aminocsoportja 9-fluorenil-metoxi-karbonil (Fmoc) csoporttal van védve. A *t*Bu (tercier-butil csoport) vagy az abból származtatható csoportok az aminosavoldallánccok védelmét szolgálják. Erre azért van szükség, hogy elkerüljük a változatos összetételű melléktermékek képződését. Ez abból adódhatna, hogy az egyes aminosavak oldalláncai olyan funkciós csoportokat tartalmaznak, amelyek reakcióba léphetnek az alkalmazott reagensekkel a szintézis egyes szakaszaiban.

A védőcsoportoknak olyannak kell lenniük, hogy a szintézis lépéseiben stabilak maradjanak, de a szintézis végén eltávolításuk könnyen véghezvihető legyen. A peptidek előállításához használt aminosavak védőcsoportjai a következők voltak:

- nincs védőcsoport: alanin (A), glicin (G), metionin (M), prolin (P), valin (V)
- tritol (Trt): aszparagin (N), hisztidin (H)
- terc*-butil (*t*Bu): szerin (S), treonin (T)
- terc*-butil-oxikarbonil (Boc): lizin (K)

Az aminosavak kapcsolása szilárd, oldhatatlan hordozón, azaz gyantán történik, ami finomszemcsés műanyag. A szintézis a C-terminális vég kiépítésével kezdődik és az N-terminális vég felé haladva egyesével történik az aminosavak kapcsolása, tehát a peptid a reakció teljese ideje alatt a gyantához kötött. Az

alkalmazott gyantának mechanikailag és kémiailag ellenállónak kell lennie, nem reagálhat sem az oldószerekkel, sem a reagensekkel, sem a peptidlánccal. A szilárd hordozó szemcsemérete, alakja, homogenitása, duzzadási tulajdonsága és a funkciós csoport kiépítésének lehetősége alapvető jelentőségű a szintézis sikerességének szempontjából. Továbbá olyan funkciós csoportot kell tartalmaznia, ami alkalmas a következő aminosav kapcsolásához, de nem tartalmazhat a szintézis során zavaró funkciós csoportot. A gyanta-peptid kötésnek a reakció végéig állandónak kell maradnia, de a szintézis végén annak könnyen eltávolíthatónak is kell lennie. Az általunk előállított összes peptid C-terminális végen védett, ennek kialakítására a C-terminuson amid végződést biztosító Rink Amide¹⁷⁶ típusú gyantát használtunk.

Munkánk során a peptideket a *Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén* található automatizált mikrohullámú Liberty 1 peptidszintetizáló készülékkel (CEM, Matthews, NC) állítottuk elő. Az N-terminuson acetilezett modellpeptideket Fmoc/*t*Bu technikával szintetizáltuk, ehhez a Rink Amide AM típusú gyantát használtuk, amely 1% divinil-benzollal térhálósított funkcionált polisztirol mátrixból áll. A szintézis során oldószerként *N,N*-dimetil-formamidot (DMF) és az aminosavak aktiválására a TBTU/HOBt/DIPEA technikát alkalmaztunk.

Az általunk használt Rink Amide gyanta Fmoc védőcsoporttal kerül forgalomba, ahhoz hogy aminosavat kapcsolhassunk hozzá első lépésben ezt a csoportot el kell távolítani. A gyanta aminocsoportjának szabaddá tételére a készülék a hasítást $0,1 \text{ mol/dm}^3$ HOBt.H₂O és 20 V/V% piperidin-tartalmú DMF segítségével végzi el, melyhez 30 W teljesítményű mikrohullámú sugárzást alkalmaz 80 °C-on, 180 másodpercen keresztül. Ezután következik a $0,2 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú aminosav négyszeres feleslegben történő hozzáadása a reakcióterbe és a fent említett TBTU/HOBt/DIPEA technikával elősegített aktiválása. Az aktivátor $0,5 \text{ mol/dm}^3$ HOBt és $0,5 \text{ mol/dm}^3$ TBTU tartalmú DMF oldat, az aktivátor bázis 2 mol/dm^3 DIPEA, ami NMP-ben van oldva. Az aminosavak kapcsolása 80 °C-on 30 W teljesítményű mikrohullám segítségével megy végbe 300 másodperc alatt. A Fmoc védőcsoport eltávolítását és a kapcsolást ismételve kapjuk meg az általunk előállítani kívánt szekvenciájú peptidet. A vizsgált peptidek az N-terminálison acetilcsoporttal védettek, amely úgy hozható létre, ha 6 V/V% ecetsavanhidridet és 5 V/V% DIPEA-t tartalmazó DMF oldattal kezeli a gyantát a készülék. Az egyes reakciók után a reagensek feleslegét DMF oldószerekkel történő mosással és azt követő szűréssel távolítja el.

A peptidek gyantáról történő hasítását és ezzel együtt az oldalláncok védőcsoportjainak eltávolítását is manuálisan, a készüléken kívül hasítóleggyel végeztük el szobahőmérsékleten, amelynek időtartama 1-1,5 óra volt. A hasítás előtt a gyantát diklórmetános, 96 %-os ecetsavas, 2-metil-2-butanolos, majd dietil-

éteres mosásnak vetettük alá. Tritilcsoportok jelenlétében, valamint metionintartalmú peptidek esetében a víz mellett etán-1,2-ditiolt (EDT)¹⁷⁷⁻¹⁷⁸ vagy 2,2'-(etiléndioxi)-dietántiolt (DODT) alkalmaznak. A hasítóelegy összetétele a következő volt: 94% TFA, 2,5% TIS, 2,5% H₂O és 1% DODT. Minden nyers peptidet hideg dietil-éteres kicsapással kaptunk meg. A csapadékot centrifugáltuk, majd hideg dietil-éterrel való mosást követően argongázzal szárítottuk. Ezután a csapadékot vízben feloldottuk és liofilizáltuk.

A liofilizált termékek tisztaságát nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) technika segítségével ellenőriztük. A több hisztidint tartalmazó ligandumok vizsgálatára Grace Vydac C18 (250 mm × 4,6 mm, 300 Å, 5 μm), az egy hisztidint tartalmazó peptidekre Europa Protein C18 (250 mm × 4,6 mm, 300 Å, 5 μm), elválasztásukhoz Grace Vydac C18 (250 mm × 10 mm, 300 Å, 5 μm) típusú kolonnát használtunk. Az analitikai HPLC Jasco MD-2010 plus diódasoros detektorral, míg a félpreparatív HPLC Jasco UV-2077 plus UV-látható detektorral van felszerelve. A termék egységességét 222 nm-en való detektálással vizsgáltuk, ami a peptidkötésre jellemző maximális elnyelési hullámhossz. Elválasztáshoz eluensként vizet (A) és acetonitrilt (MeCN, ACN) (B) használtunk, amelyek 0,1 % (v/v) TFA-t tartalmaztak. Áramlási sebességnek 1 és 2 ml/perc-et választottunk. Bár nem minden szintézis volt sikeres (kimaradt aminosav tagok, keverékek képződése, kis hozam, stb.), ezeket megismételtük, így az összes modellpeptidet sikerült tisztán előállítani, amit az ESI-MS analízis a helyes molekulatömegekkel alátámasztott.

3.3. pH-potenciometria

A pH-potenciometria az oldatfázisban lejátszódó komplexképződési folyamatok egyensúlyi vizsgálatára alkalmas módszer. Az alkalmazhatóságának feltétele, hogy a komplexképződés a ligandum protonálódási egyensúlyára hatással legyen, azaz pH-effektussal járjon. Mivel a ligandum gyenge bázisnak tekinthető, ezért a komplexképződés a H⁺-ion és az M^{m+} fémion közötti kompetíciót jelenti, ami a (11) reakcióegyenlettel írható le, a bruttó komplexképzési folyamatot a (12) egyensúlyi reakció egyenlete adja meg:



amelyben, az M: a fémion, L: a deprotonált ligandum, H: a hidrogénion, p, q és r: sztöchiometriai együtthatók, a részecskék töltését az egyszerűbb kezelhetőség miatt nem tüntettem fel. A pH-potenciometriás vizsgálatok célja, hogy a képződő komplexek összetételét és stabilitási állandóit meghatározzuk. A komplex részecskék stabilitási szorzatát a (13) egyenlet mutatja:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_p L_q H_r]}{[M]^p \cdot [L]^q \cdot [H]^r} \quad (13)$$

A fémkomplexek stabilitási szorzatainak kiszámítására alkalmas a PSEQUAD számítógépes program.¹⁷⁹ A programba bemenő adatként meg kell adnunk a térfogat – pH adatpárokat, a komponensek, asszociátumok (a ligandum különböző protonáltsági fokú részecskéi, a különböző $M_p H_q L_r$ fémkomplexek, illetve hidroxidokomplexek) számát, összetételét és az asszociátumok ismert protonálódási állandóit és becsült stabilitási szorzatait. Ezenkívül meg kell adnunk az egyes komponensek kezdeti koncentrációját, a KOH pontos koncentrációját, a vízionszorzatot és az Irving-faktort. Az egyes komponensekre megadható anyagmérleg-egyenletek (14-16) megoldásával megkaphatjuk az ismeretlen stabilitási szorzatok értékeit:

$$\begin{aligned} c_M &= [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{pqr} [M]_i^p [H]_i^q [L]_i^r \\ c_H &= [H] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{pqr} [M]_i^p [H]_i^q [L]_i^r \\ c_L &= [L] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{pqr} [M]_i^p [H]_i^q [L]_i^r \end{aligned} \quad (14-16)$$

A kiindulási értékek felhasználásával a program Newton-Raphson féle iterációval közelíti a keresett stabilitási szorzat értékeket mindaddig, amíg $\Sigma(V_{\text{mért}} - V_{\text{számított}})^2$ számértéke minimumot nem ér el, ahol a V térfogat értékek az ismert koncentrációjú KOH-mérőoldatra vonatkoznak. Az egyes stabilitási szorzatok és az ahhoz tartozó hibák értékét (az utolsó tizedesjegy hibáját zárójelben a lgβ érték után tüntettem fel) a minimum elérése után kapjuk meg. A közelítés pontosságát az illesztési paraméter, azaz a $|V_{\text{mért}} - V_{\text{számított}}|$ átlagértéke fogja megadni. A titrálási görbe egyes pontjaiban kiszámítja a program a különböző részecskék egyensúlyi koncentrációját és a standard deviációt. A számított értékeket tartalmazó fájlban a koncentráció-eloszlási diagramokat is láthatjuk, amelyben az egyes komponensek egyensúlyi koncentrációja van ábrázolva a pH függvényében. Ezt ábrázolhatjuk a MEDUSA¹⁸⁰ nevű programmal is, melyhez a kiindulási komponens-koncentrációk és stabilitási szorzatok megadása szükséges.

Gyakran használunk úgynevezett származtatott állandókat a fémkomplexek protonálódási folyamatainak jellemzése során. Ez a stabilitási állandók megfelelő kombinációit jelenti, amelyek lehetővé teszik a különböző ligandumokkal képzett komplexek összehasonlítását. Az imidazolnitrogének koordinálódásával kialakuló makrokelátot tartalmazó komplexek stabilitásának jellemzésére vezettük be a $\log K(M+N(\text{Im}))$ értéket. Abban az esetben, ha valamennyi oldalláncban

megtalálható imidazolgyűrű deprotonált formában van jelen, és koordinálódik, ezen állandók értéke megegyezik az ML komplex $\log\beta$ értékével. Azonban ha protonált funkciós csoportot tartalmaz, akkor ezt az értéket a megfelelő protonálódási állandó kivonásával kapjuk. Például lizil-oldallánc jelenlétében a (17) egyenletben feltüntetett reakció stabilitási állandóját a (18) egyenlet szemlélteti:



$$\log K(M+N(\text{Im})) = \log\beta(\text{MHL}) - pK(\text{Lys}) \quad (18)$$

Potenciometriás módszerrel határoztuk meg a ligandumok deprotonálódási állandóit, a minták koncentrációit és a komplexek stabilitási állandóit. A pontosan ismert koncentrációjú, karbonátmentes (karbonáttartalom < 0,2%) KOH-oldatot egy számítógép által vezérelt automata MOL-AcS bürettával (amit egy 1,0 cm³ végtérfigatú Hamilton fecskendőből alakítottak ki) adagoltuk. A pH mérésére egy MOLSPIN pH-mérőt használtunk, amihez egy Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektrod csatlakozott. A rendszert vizes oldatban tanulmányoztuk. Minden titrálás előtt az elektródot 0,0500 mol/dm³ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldattal – melynek pH-ja 298 K (25 °C) hőmérsékleten 4,005 – kalibráltuk. Az állandó hőmérsékletet ultratermosztáttal, a levegő kizárását, valamint a kevertetést katalitikusan tisztított argongáz átbuborékoltatásával biztosítottuk. Az oldat állandó ionerősségét (0,20 mol/dm³), megfelelő mennyiségű, 1 mol/dm³ koncentrációjú KCl-oldatnak a titrálandó oldathoz való hozzáadásával biztosítottuk. Ez az ionerősség jó pontossággal megegyezik a KOH titrálóoldat koncentrációjával, ugyanakkor jóval nagyobb, mint a titrálandó oldat fémion és ligandum koncentrációjának összege. Ez biztosítja azt, hogy a titrálás során az oldat ionerőssége gyakorlatilag ne változzon. A vizsgálni kívánt minták összeállítása során 0,2 mol/dm³ koncentrációjú HCl-oldatot is használtunk, melynek pontos koncentrációját, az aktuális paramétereknek megfelelő víziionszorzatot és Irving-faktort a már ismert, pontos koncentrációjú KOH-oldattal történő titrálás alapján adtuk meg. A diffúziós potenciál kiküszöbölésére Irving és munkatársai által javasolt módszert alkalmaztuk.¹⁸¹ A titrálási adatok kiértékelését Gran-féle linearizációval végeztük.

A minták térfogata 3,00 és 4,00 cm³, a ligandumok tervezett kezdeti koncentrációja ~ 3 · 10⁻³ mol/dm³ volt. A titrálás során fellépő térfogatnövekedést a kiértékelésre használt számítógépes program figyelembe vette. A ligandumok protonálódási állandóit és a komponensek (L és H) pontos kiindulási koncentrációját SUPERQUAD programmal¹⁸² határoztuk meg. A fémion-ligandum arányt 1:3 és 2:1 között változtattuk, a komplexek stabilitási állandóit a már korábban említett PSEQUAD program¹⁷⁹ segítségével számítottuk ki.

A pH-potenciometriás mérések információt nyújtanak a képződő komplexek összetételére vonatkozóan. Arra azonban nem ad választ, hogy az adott

sztochiometria milyen donoratomokhoz történő koordinációval valósul meg, vagy milyen a képződött komplexek geometriája. A módszer hiányossága az is, hogy néha egy-egy rendszer több, kémiaailag reális modellel is jól leírható, vagy két részecske képződése azonos pH-effektussal jár. Ilyen esetekben ezzel a technikával nem juthatunk egyértelmű következtetésre. Az előbbieken okán az oldategyensúlyi jellemzéshez más, szerkezeti információkat nyújtó vizsgálatok is szükségesek (pl. UV-látható spektrofotometria, CD, NMR vagy ESR spektroszkópia).

3.4. UV-látható spektrofotometria

A fémkomplexek képződése során a központi ion d-pályái a ligandum elektromos terének hatására felhasadnak, és eltérő energiájúak lesznek. Az így keletkező d-pályák közötti elektronátmenetek, azaz d-d átmenetek okozzák a részecskék jellemző fényelnyelését. A felvett spektrumokból következtetni tudunk a komplexek geometriájára, szerkezetére és a koordinálódó donoratomok számára, minőségére is.

Cu(II)-komplexekkel már régóta foglalkoznak, így sok irodalmi adat áll rendelkezésre a spektrális sajátosságokat illetően, ennek ellenére nem egyszerű általános következtetéseket levonni. A réz(II)komplexekre jellemző tetragonálisan torzult oktaéderes térben az 2E_g alap- és ${}^2T_{2g}$ gerjesztett állapotú energiaszintek gyenge és erősterű ligandumok esetén egyaránt négyfelé hasadnak, bár különbözőképpen. Az abszorpciós spektrumban az ezek közötti háromféle d-d átmenetnek ($d_{xz}(d_{yz}) \rightarrow d_{x^2-y^2}$; $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$; $d_z^2 \rightarrow d_{x^2-y^2}$) kellene megjelennie, de általában a d-d átmenetek egy sávvá olvadnak össze.

Az intenzitásuk és energiájuk a koordinálódó donoratomok számától nagymértékben függ, a λ_{\max} értékeket többek között befolyásolja a komplex pontos geometriája és a donoratomok kémiai minősége is (2. táblázat). Ez utóbbiak hatását Sigel és Martin⁵⁸, valamint Pettit és munkatársai⁶⁰ vizsgálták.

2. táblázat: A réz(II)komplexek spektrális paramétereinek függése a koordinált nitrogénatomok számától

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

Ha a $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -ion ekvatoriálisan elhelyezkedő víz molekuláit valamilyen más donoratomot (pl. N, O) tartalmazó ligandumra cserélik, akkor az abszorpciós maximum a rövidebb hullámhosszak felé tolódik el. Ez az effektus főleg N-donoratomoknál jelentős. Kvantitatív összefüggések megadását több tényező is

befolyásolja, ilyen például a donoratom kémiai természetén kívül még a különböző méretű kelátgyűrűk, illetve makrokelátok kialakulása a komplexben vagy ha a ligandumhoz kapcsolódnak olyan csoportok, amelyek nem vesznek részt a koordinációban. Az abszorpciós maximumok értéke azonban megbecsülhető a következő empirikus összefüggés segítségével:⁵⁸

$$\lambda_{\max} = \frac{10^3}{0,294(\text{C} = \text{O}/\text{H}_2\text{O}) + 0,346(\text{COO}^-) + 0,460(\text{NH}_2) + 0,494(\text{N} =) + 0,434(\text{Im})} \quad (19)$$

Ez az egyenlet figyelmen kívül hagyja azt a tényt, hogy axiális koordináció következtében a λ_{\max} értékek a nagyobb hullámhosszak felé tolódnak el.

A nikkel(II)ion gyengeterű ligandumokkal képzett komplexei 6-os koordinációs számúak, oktaédes geometriájúak és nagy spinszámúak. Ebben az esetben három, a Laporte-szabály szerinti tiltás értelmében kis intenzitású ($\epsilon < 30 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) spinmegengedett d-d átmenet valósulhat meg. Így az abszorpciós spektrumban a látható és közeli infravörös tartomány határán 770-1430 nm között egy és a látható tartományban 500-910 nm és 370-520 nm között két másik elnyelési sáv jelenik meg. Egy negyedik átmenet is létezik, ez azonban csupán vállként jelenik meg valamelyik sávon. A 4-es koordinációs számú, tetraédes Ni(II)-komplexek spektrumában az 500-900 nm hullámhossztartományban már nagyobb intenzitású ($\epsilon_{\max} \sim 10^2\text{-}10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) sávok is megjelennek. A szintén 4-es koordinációs számú, síknégyzetes térbeli szerkezetű, kis spinszámú komplexek erősterű ligandumok (pl. peptidek amidnitrogénje) esetén gyakran képződnek. Ezeknél a komplexeknél a maximális elnyelési hullámhossz 400-550 nm közötti és nagy intenzitással jelenik meg ($\epsilon_{\max} \sim 50\text{-}500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A spektrumban megjelenik egy töltésátviteli eredetű sáv is 430 nm alatt.¹⁸³

A spektrumokat Perkin Elmer Lamda 25 típusú kétsugaras és Hewlett Packard HP 8453 típusú egysugaras, diódasoros fotométereken 1,0 cm úthosszú küvetében vettük fel, különböző fémion-ligandum arányoknál a pH változtatásával, 200-900 nm hullámhossz tartományban. A mintákban lévő ligandum koncentrációja $\sim 3 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, a fémion-ligandum aránya 1:3 és 2:1 között változott. A felvett spektrumok elemzését a gyártó cég által biztosított szoftverrel végeztük, valamint a kapott adatokat MS Excel táblázatkezelő program segítségével ábráztuk.

3.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus a síkban polarizált fény kölcsönhatását jellemzi az optikailag aktív anyaggal. A síkban polarizált fény felbontható két azonos amplitúdójú és fázisú jobbra, illetve balra cirkulárisan polarizált fény összegére. A cirkuláris dikroizmus során a vizsgált optikailag aktív anyag a síkban polarizált fény két komponensét eltérő mértékben nyeli el, azaz a mintán való áthaladás után a komponensek abszorpciója és ezáltal intenzitása eltérő lesz. Ezt a különbséget nevezik Cotton effektusnak. Ez a következő egyenletekkel írható le:

$$\Delta A = A_{\text{bal}} - A_{\text{jobb}} = \log(I_0/I_b) - \log(I_0/I_j) = \Delta \epsilon \cdot c \cdot l \quad (20)$$

ahol A az abszorbanancia, I_0 a belépő fény intenzitása, I_b és I_j az egyes komponensek kilépő intenzitása, $\Delta \epsilon$ a moláris abszorpciós koefficiensek különbsége, c a koncentráció és l a kivetta úthossza. A kétféle fénysugár moláris abszorpciójának a különbségét ($\Delta \epsilon = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$) ábrázolva a hullámhossz függvényében kapjuk meg a cirkuláris dikroizmus (CD) görbét, melyben az abszorpciós sávokhoz képest keskenyebb Gauss görbék jelentkeznek. Az elektrongerjesztési abszorpciós spektrum maximuma helyén illetve ahhoz közel esnek a CD göbe maximumai és minimumai.

Egy abszorpciós maximum megjelenése a látható spektrumban egy fémkomplex esetében például három átmenetet is jelenthet, de ezeket a sávokat burkológörbéként látjuk, így kapunk csak egy sávot a három helyett. Ezzel ellentétben a CD spektrumoknál a különböző átmenetek külön sávként jelennek meg. Értékelhető CD spektrumot abban az esetben kapunk, ha a fémion királis környezetben van. Az optikai aktivitás az átmenetifémion-komplexeknél három forrásból ered: konfigurációs, konformációs és vicinális (szomszédos) hatás. A konfigurációs hatás járul hozzá a legjobban az optikai aktivitáshoz akkor, amikor a ligandum donor- vagy atomcsoportjai nem szimmetrikusan kötődnek a fémionhoz vagy a komplexmolekula aszimmetrikus.⁹²

Különböző di- és tripeptidek tanulmányozása során azt figyelték meg, hogy a komplex CD spektrumában keletkező jelek intenzitása additív, vagyis a nemkoordinálódó oldalláncok hatása összeadódik. Három alaninból álló tripeptid esetében kialakuló komplex CD intenzitása egy adott hullámhosszon megegyezik azzal a háromféle tripeptiddel kialakított komplexek CD intenzitásának összegével, amelyben egy alanin és két glicin található. Ez abból adódik, hogy a glicin (G), mint a legegyszerűbb és ebből következően optikailag inaktív aminosav nem játszik szerepet a Cotton-effektus kialakulásában. Ez az összefüggés más nemkoordinálódó oldalláncre is érvényes.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ Egy U-X-Z tripeptid Cotton effektusa ezen gondolatmenet alapján a következő képlettel adható meg:

$$\Delta \epsilon_{\lambda}^{\text{U-X-Z}} = \Delta \epsilon_{\lambda}^{\text{U-Gly-Gly}} + \Delta \epsilon_{\lambda}^{\text{Gly-X-Gly}} + \Delta \epsilon_{\lambda}^{\text{Gly-Gly-Z}} \quad (21)$$

ahol $\Delta \epsilon_{\lambda}^{\text{U-X-Z}}$ az adott U-X-Z tripeptid fémkomplexének λ hullámhosszon mért Cotton effektusa. Azt is megállapították, hogy ugyanazon csoport esetében, melyek optikailag aktívak, de a láncban más helyen vannak, a Cotton effektus nagysága különböző lesz. Ez azért van, mert a központi fémionhoz (kromofor csoport) kapcsolódó különböző donorcsoportok nem ugyanolyan mértékben továbbítják a királis információt, hatásuk az amidnitrogén > karboxiláttoxigén > aminonitrogén sorrendben csökken. Az effektus intenzitása ezen felül annál nagyobb, minél közelebb van a kiralitáscentrum a fémionhoz.

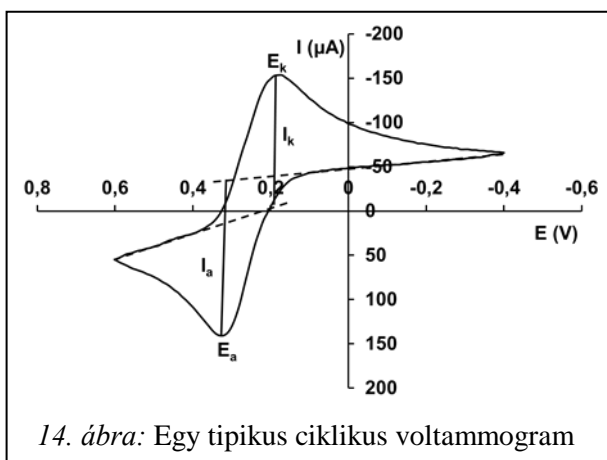
A peptidek Cu(II)- és Ni(II)-komplexeinek vizsgálatára széles körben alkalmazott szerkezetvizsgálati módszer a CD spektroszkópia.¹⁸⁷⁻¹⁸⁸ A *Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén* végeztük a méréseket egy Jasco J-810 típusú készüléken. A spektrumokat 1:3 és 2:1 közötti fémion-ligandum arányoknál, különböző pH-kon vettük fel. A méréshez használt küveták 0,1 cm és 1,0 cm úthosszúságúak voltak, 200-800 nm hullámhossz tartományban rögzítettük a spektrumokat. A kiértékeléshez a gyártó cég által biztosított szoftvert, a spektrumok ábrázolásához a MS Excel táblázatkezelő programot használtuk.

3.6. Ciklikus voltammetria

A ciklikus voltammetria egy széles körben használható, viszonylag egyszerű és olcsó elektroanalitikai technika. A módszer segítségével a különböző kémiai vegyületek, biológiai anyagok vagy elektródák felületének elektrokémiai sajátosságáról nyerhetünk információt (formálpotenciál meghatározás, komplexek látszólagos stabilitási állandójának meghatározása, reakciók mechanizmusának felderítése). Széles potenciáltartományban lehet elektrokémiai folyamatokról gyorsan minőségi és mennyiségi információkhoz jutni.

A ciklikus voltammetria is egy feszültség szabályozással működő módszer, stabil referenciaelektród-rendszert használva az elektródpotenciál értéke a kívánt módon változtatható. Az átfolyó áramot a munka- és az ellenelektród között mérik. A vizsgálandó oldatba merülő megfelelő munkaelektród potenciálját egy kezdő értékről (E_i) lineárisan változtatjuk a fordulópont potenciálnak nevezett ($E_{\lambda 1}$) értékig¹⁸⁹⁻¹⁹¹, ahol a potenciálváltozás előjele megfordul és szintén lineárisan halad a második fordulópont potenciáljig ($E_{\lambda 2}$), amely általában E_i -vel egyenlő. Ebben a pontban a ciklus véget ér, és ha szükséges, megszakítás nélkül újratekintjük. A potenciál változását egy referenciaelektród potenciáljához képest mérjük, mely általában telített kalomel (SCE) vagy Ag/AgCl elektród. A mérés folyamán a cellán átfolyó áramot mérjük és ábrázoljuk azt az alkalmazott feszültség függvényében. Az így kapott görbét ciklikus voltammogramnak nevezzük (14. ábra).

A fentebb látható ciklikus voltammogramból az alábbi információk nyerhetők:



14. ábra: Egy tipikus ciklikus voltammogram

A katódos (E_k) és anódos (E_a) csúcspotenciál számtani közepéből kapjuk meg a féllépcső potenciál ($E_{1/2}$) értékét.

$$E_{1/2} = \frac{E_k + E_a}{2} \quad (22)$$

Amennyiben a kapott $E_{1/2}$ feszültségértéket korrigáljuk a referenciaelektrod potenciáljával, akkor a normál hidrogén elektródra vonatkoztatott redoxipotenciált (E^0) kapjuk meg.

$$E^0 = E_{1/2} + E^0 \quad (23)$$

Az anódos és katódos csúcspotenciálok különbsége adja meg a csúcsszeparáció értékét.

$$\Delta E = E_a - E_k = \frac{0,059}{n} V \quad (24)$$

ahol n az átlépő elektronok száma. Vagyis a csúcsok távolsága függvénye a folyamatban átlépő elektronok számának. Egy egyelektronos folyamatban a távolság 0,059 V. Ki kell emelni azt, hogy a Nernst-egyenlet csak termodinamikailag reverzibilis folyamatokra érvényes. Ha ismerjük az átlépő elektronok számát és a csúcsszeparáció értéke a várttól (Nernst-egyenletből számítottól) eltérő, akkor az valamilyen irreverzibilitásra utal. Ennek nemcsak termodinamikai, hanem kinetikai okai is lehetnek. A csúcspotenciálok mellett információértékű a katódos és az anódos csúcsáram (I_k és I_a) aránya is. Amennyiben egy folyamat reverzibilis, a két csúcsáram aránya egy.

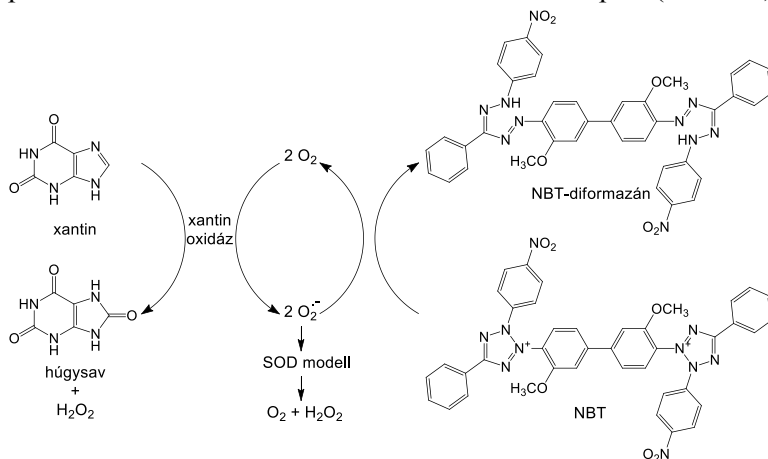
A Cu(II)-komplexek redoxipotenciál értékeit egy Metrohm gyártmányú 746 VA Trace Analyzer készülék segítségével határoztuk meg. A minták méréséhez klasszikus háromelektrodos rendszert használtunk. Referenciaelektrodként Ag/AgCl elektródot (BASI Instr. RE-5B, MF-2079) alkalmaztunk, amelyben a háttéreltrodit 3 mol/dm³ koncentrációjú NaCl-oldat ($E^0_{(Ag/AgCl)} = 0,209$ V). Segédelektrodként egy mikrocellában is alkalmazható platinaelektrodot (ALS Co. Japan), munkaelektrodként 2 mm átmérőjű szén- (CHI104) és platinaelektrodot (CHI102) használtunk.

A mikrocellát a $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ redoxi rendszerrel kalibráltuk platina munkaelektrod segítségével, a mért redoxipotenciál a korábbi irodalmi adattal ($E^0 = 0,458$ V, normál hidrogénelektrodra vonatkoztatva, $I = 0,5$ mol/dm³ KCl)¹⁹² jó egyezésben volt. A méréseket 1,0 cm³ térfogatban 0,2 mol/dm³ KCl ionerősség mellett, a tanszéken tervezett mikrocellában végeztük el. A korábbi tapasztalatok alapján ligandumfelesleg esetén kaptak értékelhető voltammogramot, ennek ismeretében a mintaoldatban a Cu(II)-ligandum arányát 1:8-ra állítottuk. Valamennyi esetben vizes oldatokat vizsgáltunk 25 °C-on, a ligandum koncentrációja 1 · 10⁻³ mol/dm³ volt, az oldatok pH-ját KOH-oldattal és HNO₃-oldattal állítottuk be a kívánt értékre. A minták oxigénmentesítését minden mérés előtt legalább 5 percig történő argongáz átbuborékolásával végeztük. A

kísérletsorozat első lépésében meggyőződünk arról, hogy a mintát tartalmazó ligandum mérése esetén nem történik redoxi folyamat. A ligandumok és Cu(II)-komplexeik ciklikus voltammetriás vizsgálata során 100 mV/s pásztázási sebességet alkalmaztunk. A szabad ligandumokat 140 μ A és a komplexeket 45 μ A határáram mellett mértük grafit elektróddal 800–(–600) mV tartományban. Az értékeléshez szükséges paramétereket CACYVO program segítségével kaptuk meg.

3.7. SOD enzim aktivitás mérése

A Cu,Zn-szuperoxid diszmutáz (Cu,Zn-SOD) enzim a szuperoxid gyökianion diszproporcióját katalizálja ($k \sim 2,0 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$, pH 7,4). Az enzim működését utánzó fémkomplexek aktivitása mérhető közvetlenül és közvetve is.¹⁹³ A közvetlen mérés azonban elég költséges, emiatt ritkán használt eljárás. Valamely Cu(II)-komplex SOD aktivitásának mérésére az egyik legelterjedtebb közvetett módszer a xantin-oxidáz enzim által *in situ* termelt $\text{O}_2^{\cdot -}$ és az NBT közötti reakció nyomon követése. Az aktív fémkomplex csökkenti a szuperoxid gyökianion koncentrációját, ezzel inhibálja a NBT-só redukcióját, ami a keletkező lila színű diformazánra jellemző 560 nm-nél mért abszorbancia csökkenését eredményezi a fémkomplexet nem tartalmazó rendszerben mérhetőhöz képest (15. ábra).



15. ábra: A SOD aktivitás méréséhez használt modellreakció sematikus ábrázolása

A SOD aktivitás mérésére foszfát pufferben (Na_2HPO_4 és NaH_2PO_4 $c = 5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$) oldott, $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú NBT-oldatot használtunk, a xantin koncentrációja $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ volt. A reakciót 560 nm hullámhosszon Perkin Elmer Lamda 25 típusú kétsugaras fotométeren követtük 1,00 cm úthosszú küvettában. A xantin-oxidáz mennyiségét úgy állítottuk be, hogy az abszorbancia változása 560 nm-nél $0,025$ – $0,028 \text{ min}^{-1}$ érték között változzon. Az NBT redukcióját változó koncentrációjú Cu(II)-komplex jelenlétében, illetve annak távollétében is vizsgáltuk, a teljes Cu(II)-ion koncentráció $5,0 \cdot 10^{-8}$ – $2,0 \cdot 10^{-7}$

6 mol/dm^3 között változott. Először egy vak minta abszorbancia változását vettük fel 560 nm-en nyolc perc alatt. A vak minta tartalmazta az NBT-t, a xantint, valamint a xantin-oxidáz enzimet. Ez a $0,025\text{-}0,028 \text{ min}^{-1}$ abszorbanciaváltozás beállításához szükséges. A további mérések során a kiinduló minta tartalmazta a xantint, a xantin-oxidázt, az NBT-t és a ligandumot is – ez a vakpróba. Az abszorbancia változását az idő függvényében négy percig vizsgáltuk, majd hozzáadtuk a megfelelő térfogatú CuCl_2 -oldatot és mértük az abszorbanciaváltozást a következő négy percben. Ezáltal minden mérési pontban a Cu(II) -komplex mellett a vakpróbát is vizsgáltuk.

A SOD aktivitással rendelkező vegyületek aktivitását az IC_{50} értékkel szokás jellemezni. Ez azt a komplexkoncentrációt jelöli, amelynél a diformazán képződése az enzimutánzó vegyület távollétében mért értékhez képest a felére csökken. Gyakorlatilag ez azt jelenti, hogy adott pH-értéknél ábrázoljuk a Cu(II) -komplex koncentráció függvényében az inhibíció (%) értékét, amely során egy telítési görbét kapunk és az 50 %-os inhibícióhoz tartozó komplexkoncentrációt határozzuk meg, amelyet a 25. egyenlet mutat be.

$$\% \text{inhibíció} = \frac{\left(\frac{\Delta A}{t}\right)^{\text{vak}} - \left(\frac{\Delta A}{t}\right)^{\text{komplex}}}{\left(\frac{\Delta A}{t}\right)^{\text{vak}}} \cdot 100 \quad (25)$$

ahol $\frac{\Delta A}{t}$ a fémkomplex hiányában mért abszorbanciaváltozás 560 nm-en, míg $\frac{\Delta A}{t}$ a fémkomplex jelenlétében mért abszorbanciaváltozás 560 nm-en.

A $c_{\text{Cu(II)-komplex}}$ és a kiszámított inhibíció adatokra a Scientist program segítségével telítési görbét illesztettünk az alábbi egyenlet szerint:¹⁹³

$$0,5 = \frac{A \cdot c_{\text{Cu(II)-komplex}}}{B + c_{\text{Cu(II)-komplex}}} \quad (26)$$

ahol A és B paraméterek. Az így kapott SOD aktivitás értékek mellett – más körülményeket használó kutatócsoportok eredményeivel történő jobb összehasonlítása érdekében – relatív aktivitás értékeket tudunk megadni, melyet a 27. egyenlet mutat be:

$$\text{relatív aktivitás} = \frac{\text{IC}_{50}(\text{Cu, Zn - SOD})}{\text{IC}_{50}(\text{komplex})} \cdot 100 \quad (27)$$

3.8. Oxidáció körülményei

Az oxidáció vizsgálatánál 1 cm^3 mintát állítottunk össze úgy, hogy a fémion koncentrációja 1 mmol/dm^3 és a fémion-ligandum aránya 1:1,1 legyen. A vizsgálatokat 7,4-s pH-n $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on hajtottuk végre. A felhasznált H_2O_2 1%-os volt,

ezt háromszoros feleslegben adtuk a Cu(II)-ligandum oldathoz. A reakció leállításához Na₂EDTA oldatot használtunk négyszeres feleslegben. A dAKHA ligandum esetében az egyes oxidált termékeket frakciószedést követően tudtuk azonosítani. Az oxidációhoz használt ligandum mennyisége 20 mg volt és a keletkező termékek gyűjtését követően a keletkezett oldatokról az oldószert rotációs vákuumbepárlóval távolítottuk el.

A reakció előrehaladásának és lejátszódásának követésére nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) technikát alkalmaztunk. Az analitikai HPLC Jasco MD-2010 plus diódasoros detektorral, míg a félpreparatív HPLC Jasco UV-2077 plus UV-látható detektorral van felszerelve. A reakció követésére használt analitikai kolonna paraméterei a következők: Teknokroma Europa Protein (250 mm × 4,6 mm, 300 Å, 5 µm). A félpreparatív kolonnát a dAKHA ligandumnál frakciószedésre és a ligandumok tisztítására használtuk, ennek a paraméterei a következők: Grace Vydac Protein and Peptide C18 218TP510 (250 mm × 10 mm, 300 Å, 5 µm). Elválasztáshoz eluensként (A) vizet és (B) acetonitrilt (ACN) használtunk, amelyek 0,1 % (v/v) TFA-t tartalmaztak. Áramlási sebességnek 1 és 2 ml/perc-et választottunk. A megírt módszereket ligandumtól függően változtattuk és gradiens elúciót használtunk. A dAKHA esetében 0-3 percig az ACN 0% volt, majd 3-9 percig lineárisan változott 5%-ra, ezt az összetételt 24 percig tartottuk, majd 6 perc alatt lineárisan csökkent az aránya 0%-ra. A többi ligandum esetén a módszer ugyanez volt, de dAKHM, dMKHA, dM1AKHA peptideknél az ACN mennyiségét 8%-ra míg a dMKHM-nél 12%-ra növeltük.

3.9. Tömegspektrometria (ESI-TOF-MS)

Az ESI-MS módszert széles körben alkalmazzák peptidek és proteinek, valamint fémkomplexeik vizsgálatára.¹⁹⁴⁻¹⁹⁵ Emellett tandem MS segítségével ligandum és/vagy komplex fragmentálódását, hasadását vizsgálva szerkezeti információ is nyerhető. A peptidek Cu(II)/H₂O₂ rendszerrel történő oxidációja során keletkező termékeinek azonosítására megfelelő módszerként szolgál a tömegspektrometria.

A minta komponenseinek gerjesztésére (ionizálásra) elektropray-ionizációs (ESI) módszer használható, amely során a vizsgált (oxidált) peptidek fragmentációja elkerülhető, így ezzel a tömegük elsődlegesen meghatározható. Ennek a lényege az, hogy az oldatot egy nagyfeszültséget tartalmazó kapillárison keresztül beporlasztják az ionforrásba, amelynek következtében a minta részecskéi töltést vesznek fel. A szárítógáz segítségével a töltéssel rendelkező részecskék oldószermolekuláit távolítják el, így gázfázisba kerülnek az ionok. A keletkező ionok a nagyvákuum alatt lévő TOF (time of flight, repülési idő) analizátorba jutva nagyfeszültség hatására tömeg/töltés (m/z) értékük alapján különböző időben kerülnek a detektorba. Tandem MS vizsgálat során az oxidált termék prekursor

ionként történő kiválasztását követően annak fragmentációjával megadható a pontos összetétele is. Mi elsődlegesen arra voltunk kíváncsiak, hogy az oxidációs során a peptid szekvenciájában található aminosavak közül melyiken jelenik meg az oxigén.

A keletkezett termékek azonosítására LC-ESI-MS és MS/MS technikát alkalmaztunk. A méréseket a *Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén* található MicroTOF-Q típusú Qq-TOF MS készülékkel (Bruker Daltonik, Bréma, Németország) és ESI ionforrás mellett pozitív módban végezte *Dr. Nagy Lajos*. A mintabevitel sebessége 3 μ l/perc volt, amelyet egy fecskendőpumpával (Cole-Parmer Ins. Co., Vernon Hills, IL, USA) kiviteleztek. A spray feszültsége 4 kV-ra lett állítva, a szárító gáz (N_2) hőmérséklete 200 °C volt, áramlási sebessége 4 l/perc (8 l/perc LC-MS). A nitrogén ütközési gázként is szolgált az MS/MS vizsgálatoknál. A nyomás az ütközési cellában $1,2 \cdot 10^{-3}$ mbar volt. A prekursor ionok az MS/MS-nél 5 m/z izolációs szélességben lettek kiválasztva. Külső kalibrálóként ESI körülmények között a nátrium-trifluoracetát oldatból keletkező klaszterionjai szolgáltak.

4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

4.1. A humán prion fehérje fragmensének és mutánsainak komplexképző sajátosságai

4.1.1. A humán prion fehérje fragmensének és mutánsainak sav-bázis sajátosságai

A kutatómunka során a humán prion fehérje egy fragmensének és négy mutánsának oldategyensúlyi vizsgálatát végeztük el. A természetes fragmens szekvenciája a következő: Ac-SKPCTNMKHM-NH₂, amely a fehérjében a 103-112-ig terjedő aminosavakat jelenti; a továbbiakban rövidítve fogom használni, jelölése: dMKHM. Korábbi vizsgálatok során megállapították, hogy a 111-s helyen lévő hisztidin kulcsfontosságú szerepet tölt be a Cu(II)-ion megkötése szempontjából, továbbá a 109-s pozícióban lévő metionin is – gyenge kölcsönhatással – részt vesz a fémion koordinációjában.⁸⁹ A mutánsokban a metioninokat cseréltük le alaninra vagy csak az egyiket vagy mindkettőt. Erre azért volt szükség, hogy megállapítsuk azt, hogy a metionin távollétében változnak-e egyáltalán a koordinációs viszonyok a kialakuló komplexekben és ha igen, akkor hogyan. A ligandumok sav-bázis és komplexképző sajátosságainak ismerete a fémionkatalizált oxidációjuk vizsgálatánál is fontos. Ezek a védett peptidek a következők (zárójelben feltüntetem a rövid jelölésüket): Ac-SKPCTNAKHA-NH₂ (dAKHA), Ac-SKPCTNAKHM-NH₂ (dAKHM), Ac-SKPCTNMKHA-NH₂ (dMKHA), Ac-MKPKTNAKHA-NH₂ (dMIAKHA), szerkezetük a 3. fejezetben a 35. oldalon található. A továbbiakban a rövidített jelölést fogom használni.

3. táblázat: A humán prion fehérje fragmensének és mutánsainak deprotonálódási állandói (I = 0,2 mol/dm³, T = 298 K)

	dAKHA	dAKHM	dMKHA	dMKHM	dMIAKHA	Ac-MKHM-NH ₂ ³⁴	Ac-KTNMKHMAG-NH ₂ ³⁴
HL	10,97 (2)	10,76 (1)	11,05 (2)	10,92 (2)	10,75 (4)	10,28	10,54
H ₂ L	21,34 (1)	21,12 (1)	21,39 (1)	21,26 (1)	21,14 (3)	16,50	20,45
H ₃ L	31,14 (2)	30,85 (1)	31,16 (1)	31,01 (2)	30,76 (4)	-	26,69
H ₄ L	37,42 (2)	37,00 (1)	37,39 (2)	37,16 (2)	36,96 (5)	-	-
pK ₁	6,28	6,15	6,23	6,15	6,2	6,22	6,24
pK ₂	9,8	9,73	9,77	9,75	9,62	10,28	9,91
pK ₃	10,37	10,36	10,34	10,34	10,39	-	10,54
pK ₄	10,97	10,76	11,05	10,92	10,75	-	-

A ligandumok deprotonálódási állandói a 3. táblázatban láthatóak, ahol az értékek a hisztidin imidazolil-oldalláncához és a három lizin aminocsoportjához rendelhetők. A hisztidin deprotonálódási állandója jó egyezést mutat a már korábban meghatározott hasonló fragmensek^{34, 78} pK értékeivel. A lizinek deprotonálódása egymással átfedő lépésekben játszódik le.

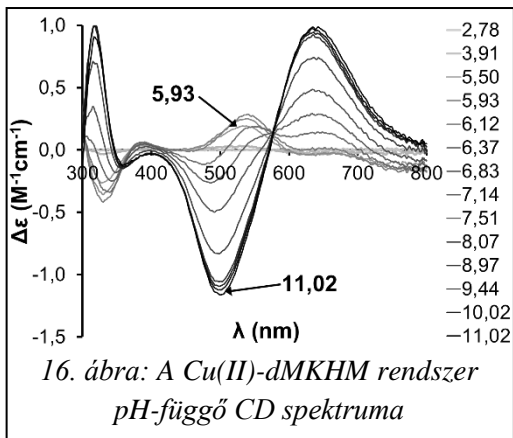
4.1.2. A humán prion fehérje fragmensének és mutánsainak Cu(II)-komplexei

A 4. táblázatban a ligandumok Cu(II)-ionnal alkotott komplexeinek stabilitási állandói láthatóak. Minden esetben védett peptideket vizsgáltunk, amelyben nincs sem szabad amino- sem szabad karboxilcsoport. Ezekben a Cu(II)-ion koordinációjára egy alkalmas horgonycsoport van, a hisztidin imidazolnitrogénje és csak egymagvú komplexek keletkeznek.

4. táblázat: A ligandumok Cu(II)-komplexeinek stabilitási állandói
(I = 0,2 mol/dm³, T = 298 K)

	dAKHA	dAKHM	dMKHA	dMKHM	dM1AKHA	Ac-MKHM-NH ₂ ³⁴	Ac-KTNMKHMAG-NH ₂ ³⁴
CuLH ₃	34,67 (2)	34,53 (4)	35,01 (2)	34,84 (2)	34,73 (4)	-	-
CuLH ₂	-	-	-	-	-	-	23,54
CuLH	22,56 (1)	22,69 (2)	23,21 (1)	23,28 (2)	22,46 (2)	13,98	-
CuL	15,03 (2)	15,06 (3)	15,73 (2)	15,82 (2)	14,69 (3)	-	12,39
CuLH ₋₁	5,29 (2)	5,31 (3)	5,94 (2)	6,08 (3)	4,99 (4)	2,70	4,56
CuLH ₋₂	-5,16 (2)	-5,36 (4)	-4,53 (2)	-4,43 (3)	-5,56 (4)	-6,26	-5,45
CuLH ₋₃	-15,99 (2)	-15,94 (3)	-15,40 (2)	-15,14 (2)	-16,13 (4)	-16,32	-16,11
pK ₁₂ (N ⁻)	6,06	5,92	5,90	5,78	6,14	5,64	5,58
pK ₃ (N ⁻)	7,53	7,63	7,48	7,46	7,77	8,96	7,83
lgK(Cu+N(Im))	3,53	3,68	3,85	3,83	3,97	3,70	3,09

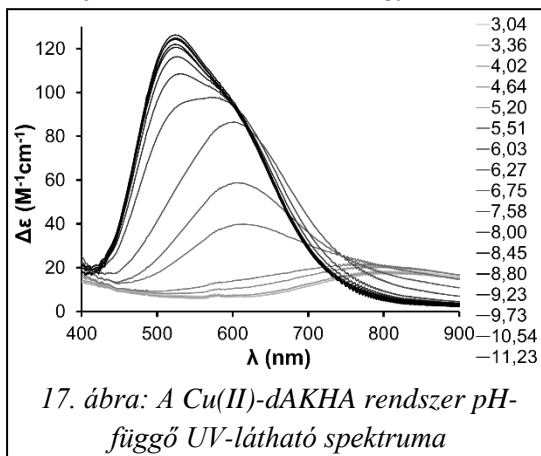
A CuLH₃ összetételű részecskében a hisztidin egyfogú koordinációja valósul meg az imidazolnitrogén donoratomon keresztül és a három lizin protonált formában van jelen. Az imidazol-koordinációjú komplex oktaédes geometriáját támasztja alá az, hogy nincs CD aktivitás egyik rendszernél sem kb. pH 5,5-ig, ezt szemlélteti a dMKHM Cu(II)-komplexeire vonatkozó pH-függő CD spektrumsorozat (16. ábra).



Az általunk vizsgált ligandumok 1 N(Im) koordinációra jellemző $\lg K(\text{Cu}+\text{L})$ értéke jó egyezésben van a már korábban vizsgált Ac-MKHM-NH₂ peptid egységű, ugyanilyen koordinációs módú komplex származtatott állandójának értékével (4. táblázat).³⁴

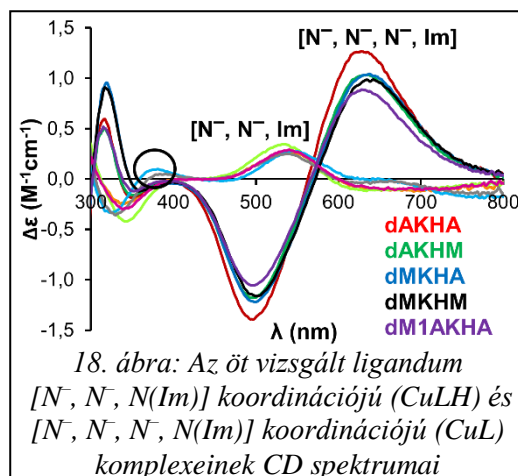
A kialakuló CuLH₃ nem olyan nagy stabilitású, hogy meg tudja akadályozni az amidnitrogének deprotonálódását, így az már pH > 5 fölött megkezdődik. Olyannyira nem képes megakadályozni, hogy a rendszerben az [N⁻, N(Im)] koordinációs módú komplexet nem is tudtuk kimutatni. Így a következő két amidnitrogén deprotonálódása kooperatív módon megy végbe és [N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációs módú CuLH összetételű komplex keletkezik. Ez az eredmény összhangban van az Ac-KTNMKHMAG-NH₂ ligandum vizsgálata során tapasztalt komplexképződési folyamatokkal (4. táblázat pK₁₂(N⁻) értékei).³⁴ Ezzel ellentétben a HuPrP(84–114)H96A ligandum – amely szekvenciájában két hisztidin és négy lizin van – Cu(II)-komplexeinél az amidnitrogének deprotonálódása lépcsőzetesen megy végbe.

A peptidnitrogének deprotonálódását támasztja alá az is, hogy a látható spektrumban (17. ábra) az abszorpciós maximum a kisebb hullámhosszak felé tolódik el és intenzitása megnövekszik. A CD spektrumokban az UV tartományban (250–350 nm között) intenzív pozitív Cotton effektus jelenik meg, ami az N⁻ → Cu²⁺ töltésátviteli sávokra jellemző átmenet.



A dMKHA és dMKHM peptideknél a 109-es pozícióban metionin van, e két ligandum CuLH komplexénél a metionin tioéterkénatomjának kismértékű kölcsönhatását tapasztaltuk. A látható spektrumokban megfigyelhető intenzitásnövekedésből és vörös irányú eltolódásból következtethetünk az axiális irányú koordinációra, és a CD

spektrumokban 380 nm körül jelentkező kis intenzitású pozitív Cotton effektus – amelyet a 18. ábrán fekete karikával jelöltem – utal a nagyon kismértékű kölcsönhatásra. Korábbi metionin tartalmú ligandumok Cu(II)-ionnal történő vizsgálata során is arra az eredményre jutottak, hogy a metionin tioéterkénatomja és a Cu(II)-ion között gyenge kölcsönhatás van jelen, ha a

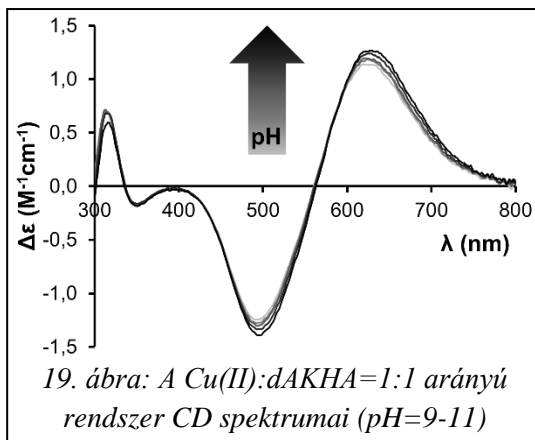


18. ábra: Az öt vizsgált ligandum $[N^-, N^-, N(Im)]$ koordinációjú (CuLH) és $[N^-, N^-, N^-, N(Im)]$ koordinációjú (CuL) komplexeinek CD spektrumai

keletkező komplexben a tioéterkénatom a koordinálódáshoz kedvező pozícióba kerül. Ez a hatás a korábban vizsgált tetrapeptideknél jelentősebb, azaz a kéndonoratom koordinációban betöltött kis szerepe a ligandumok méretével értelmezhető, a hosszú peptidlánc flexibilitása révén nehezíti a donoratomok fémionokhoz való kötődését.

A pH emelésével bekövetkezik a harmadik amidnitrogén deprotonálódása is, CuL összetételű komplex keletkezik. Az abszorpciós spektrumokban 530 nm körüli maximum jelenik meg, ami a 4 N kötődésre utal.¹⁸⁸ Ezzel párhuzamosan a CD spektrumokból (ahol jellemző volt) eltűnik a $S \rightarrow Cu^{2+}$ CT sáv. A kéndonoratomot kiszorítja a koordinációs szférából a harmadik amidnitrogén és erősebb kölcsönhatás alakul ki ezáltal. A korábban vizsgált Ac-MKHM-NH₂ ligandum CuLH₂ komplexével összehasonlítva az általunk vizsgált ligandumok Cu(II)-ionnal képzett CuL komplexeit az állapítható meg, hogy kisebb pH-n következik be a harmadik amidnitrogén deprotonálódása. Ez azzal magyarázható, hogy a dekapeptid peptidkötésben jelen lévő amidcsoportjához képest a tetrapeptidben a bázikusabb karakterű acetamidocsoport deprotonálódása játszódik le.

A CuLH_x (ahol $x=1-3$), azokat a komplexet jelenti, amelyben $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$ koordináció van jelen, és ezeknél már a lizil-oldalláncok is deprotonáltak, de nem vesznek részt a koordinációban. Ha összehasonlítjuk a szabad ligandum lizin aminocsoportjainak pK értékeit, a komplexképződés során, a stabilitási



19. ábra: A $\text{Cu(II):dAKHA}=1:1$ arányú rendszer CD spektrumai ($\text{pH}=9-11$)

állandókból számított $\text{pK}(\text{Cu-Lys})$ értékekkel (5. táblázat), akkor látható, hogy kis különbséggel, de gyakorlatilag ugyanazokat az értékeket kapjuk vissza. Továbbá a CD spektrumokban $\text{pH} > 9$ fölött nem változik a görbék lefutása, ezt a $\text{Cu(II):dAKHA}=1:1$ arányú rendszer CD spektrumai ($\text{pH} 9-11$) jól szemléltetik (19. ábra). Ez arra bizonyíték, hogy a lizil-oldallánc valóban nem vesz részt a

koordinációban.

5. táblázat: A szabad ($\text{pK}(\text{Lys})$) és a komplexben kötött ($\text{pK}(\text{Cu-Lys})$) ligandum lizil-oldalláncaira vonatkozó deprotonálódási állandók értékei

	dAKHA	dAKHM	dMKHA	dMKHM	dM1AKHA
$\text{pK}_2(\text{Lys})$	9,80	9,73	9,77	9,75	9,62
$\text{pK}_{34}(\text{Lys})$	10,67	10,56	10,70	10,63	10,57
$\text{pK}_2(\text{Cu-Lys})$	9,74	9,75	9,79	9,74	9,70
$\text{pK}_{34}(\text{Cu-Lys})$	10,64	10,63	10,67	10,61	10,56

Összehasonlítva a vizsgált ligandumok Cu(II) -komplexeinek összetételét és stabilitását, az állapítható meg, hogy ha a metionint alaninra cseréltük, az a komplexek stabilitásában nagymértékű változást nem okozott. Nagyon hasonló stabilitási állandó értékeket kaptunk az ugyanolyan koordinációs módú komplexeknél, és ugyanazok az összetételű részecskék keletkeztek minden egyes peptidnél.

4.1.3. A humán prion fehérje fragmensének és mutánsainak Ni(II) -komplexei

Az egy hisztidint tartalmazó ligandumok nikkell(II)ionokkal hasonló összetételű komplexeket képeznek, mint réz(II)ionnal. Ezekben a peptidekben a Ni(II) -ion számára is legfontosabb kötőhelyként az imidazolgyűrű szolgál. A

komplekképződés során csak egymagvú komplexek keletkeznek, amelyek stabilitási állandói a 6. táblázatban láthatók.

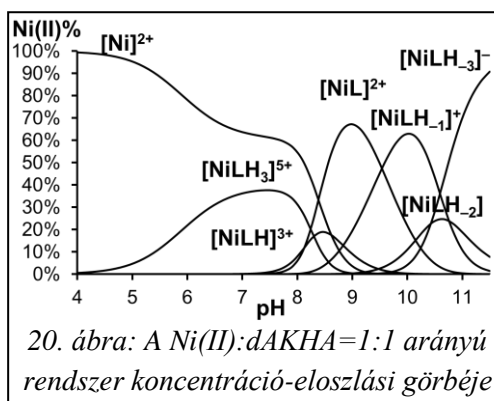
6. táblázat: A ligandumok Ni(II)-komplexeinek stabilitási állandói
(I = 0,2 mol/dm³, T = 298 K)

	Ac-SKPKN AKHA-NH ₂	Ac-SKPKN AKHM-NH ₂	Ac-SKPKN MKHA-NH ₂	Ac-SKPKN MKHM-NH ₂	Ac- MKPKN AKHA-NH ₂	Ac-MKHM- NH ₂ ¹⁹⁶	HuPrP(84- 114)H96A ¹²⁹
NiLH ₄	-	-	-	-	-	-	42,76
NiLH ₃	33,79 (8)	33,25 (15)	33,88 (6)	33,55 (6)	33,57 (8)	-	34,53
NiLH ₂	-	-	-	-	-	-	26,08
NiLH	17,19 (7)	16,83 (11)	17,53 (5)	17,40 (5)	17,04 (6)	13,09	18,46
NiL	9,06 (3)	8,79 (4)	9,40 (3)	9,21 (2)	8,65 (3)	5,08	9,07
NiLH ₋₁	-0,48 (4)	-0,78 (5)	-0,05 (3)	-0,23 (3)	-0,76 (4)	-	-0,89
NiLH ₋₂	-11,24 (4)	-11,61 (6)	-10,75 (4)	-11,00 (3)	-11,52 (4)	-	-11,37
NiLH ₋₃	-21,67 (3)	-21,93 (5)	-21,27 (3)	-21,32 (3)	-21,79 (4)	-	-21,93
pK(N ⁻)átlag	8,24	8,15	8,16	8,11	8,31	8,01	8,1
lgK(Ni+N(Im))	2,65	2,40	2,72	2,54	2,81	-	2,44

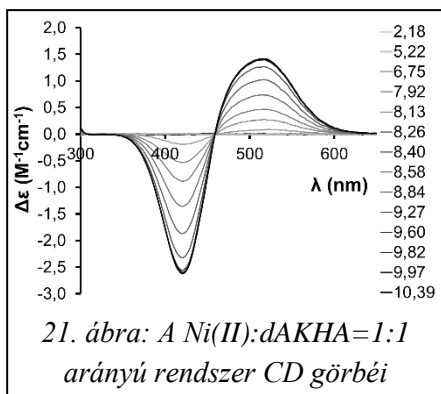
A dAKHA ligandumra jellemző Ni(II)-ion koncentráció-eloszlási görbe (20. ábra) jól szemlélteti, hogy a komplekképződés pH > 5 fölött kezdődik. Savas pH-tartományban NiLH₃ sztöchiometriájú komplex keletkezik. Ebben a részecskében a hisztidin imidazolnitrogénje egyfogó horgonydonorként viselkedik és a lizin ε-aminocsoportjai ilyen körülmények között még protonáltak. A Ni(II) + H₃L ⇌ NiLH₃ folyamatra számolt egyensúlyi állandót [logK(Ni+N(Im))] a 6. táblázat utolsó sorában tüntettem fel. Ezek a lgK-értékek nem nagyobbak annál, mint amit az egy imidazolil-oldalláncot tartalmazó monodentát koordinációra közöltek (logK = 2,48).^{34, 89} A mért nagyon

kis intenzitású abszorpciós és CD spektrum alátámasztja azt, hogy ezek a komplexek oktaéderes geometriájúak. Összehasonlítva az ugyanilyen összetételű Cu(II)-komplexek stabilitási állandóival (4. táblázat) az állapítható meg, hogy kisebb stabilitású komplexek keletkeznek Ni(II)-ionnal, ami az Irving-Williams sornak megfelel. A

pH emelésével egy extra lúgfogyasztó folyamat kezdődik el és ezzel egyidejűleg



az oldat sárgulni kezd, hasonlóan más Ni(II)-peptidkomplexekhez. Ez arra utal, hogy az imidazolnitrogénnel kelátképző helyzetben lévő peptidkötés amidnitrogénje deprotonálódik és koordinálódik a fémionhoz síknégyzetes szerkezetű diamágneses Ni(II)-komplexet eredményezve. Erre bizonyítékként szolgál az abszorpciós spektrumban 430 nm-nél megjelenő intenzív elnyelési sáv, amelynek a λ_{\max} értéke a pH-val nem változik, csak az intenzitása növekszik. Ez azt mutatja, hogy pH > 8 fölött az amidnitrogének deprotonálódása gyakorlatilag egy lépésben megy végbe és [N⁻, N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációs módú komplex keletkezik, amelynek a mennyisége növekszik a pH változásával. Összeségében az állapítható meg, hogy mind az öt ligandum Ni(II)-ionnal való kölcsönhatásakor két fő részecske keletkezik. Egyik az imidazolnitrogén monodentát koordinációjával létrejövő oktaédes geometriájú komplex, a másik az imidazolnitrogén melletti amidnitrogének részvételével kialakuló síknégyzetes komplex. pH > 9,5 fölött szintén az utóbbi komplex van jelen, azzal a különbséggel, hogy azokban a komplexekben – hasonlóan a Cu(II)-komplexekhez – már a lilizil-oldalláncok is deprotonáltak, de azok nem vesznek részt a koordinációban. Erre bizonyítékként szolgál az abszorpciós spektrumon kívül a CD spektrum is (21. ábra), ami jól



szemlélteti, hogy pH > 9 fölött a spektrumok lefutásában és intenzitásában nincs változás. A korábban vizsgált prion fehérje modellpeptidek^{129, 196} Ni(II)-komplexeihez hasonló összetételű és szerkezetű komplexek alakulnak ki az általunk vizsgált ligandumokkal is. A különbség abban nyilvánul meg, hogy a tetrapeptidekkel ellentétben a hosszabb fragmensek képesek oldatban tartani a Ni(II)-ionokat lúgos pH-tartományban is,

ugyanakkor a lánc hosszának növelésével nem változik meg nagymértékben a komplexek stabilitása (6. táblázat).

4.2. Több hisztidint tartalmazó ligandumok komplexképző sajátosságai

4.2.1. A Cu,Zn-SOD enzimet modellező peptidek sav-bázis sajátosságai

Korábbi kutatási eredmények azt mutatják, hogy azokkal a terminálisan védett multihisztidin peptidekkel képződnek kitüntetett stabilitású komplexek, amelyek a hisztidineket alternáló pozícióban tartalmazzák.¹⁰³ A kutatómunka során egyrészt arra kerestük a választ, hogy ha növeljük a távolságot a hisztidinek között, az milyen irányba változtatja meg a képződő komplexek stabilitását. Másrészt célunk volt olyan szekvenciájú peptidek szintézise és vizsgálata, amelyek modellezik a Cu,Zn-SOD enzim réz(II)kötőhelyét, és SOD-aktivitással

rendelkeznek. Azaz képesek lehetnek a szuperoxid gyökönion elbontására, ezáltal a szervezetben termelt káros reaktív oxigén származék csökkentésére. Az alábbi védett multihisztidin peptideket állítottuk elő: Ac-HAAH-NH₂, Ac-HAAHVH-NH₂, Ac-HAAHGH-NH₂, Ac-HGGHGH-NH₂, Ac-HGGGHGH-NH₂ és sav-bázis, illetve komplexképző sajátságait vizsgáltuk pH-potenciometriásan. Ezeknél a ligandumoknál az oldalláncban lévő imidazolnitrogénekre jellemző deprotonálódási állandó adható meg. Így a tetrapeptidnél kettő, míg a hexa- és heptapeptideknél három deprotonálódási állandó számítható ki. A titrálási adatokból számított képződési és deprotonálódási állandókat a 7. táblázat foglalja össze, kiegészítve néhány irodalmi adattal.

7. táblázat: A ligandumok képződési (lgβ) és deprotonálódási (pK) állandói (I = 0,2 mol/dm³, T = 298 K)

	HL	H ₂ L	H ₃ L	pK ₁	pK ₂	pK ₃
Ac-HAAH-NH ₂	6,74 (1)	12,74 (1)	-	6,00 (1)	6,74 (1)	-
Ac-HGGH-NH ₂ ¹⁹⁷	6,84	12,88	-	6,04	6,84	-
Ac-HVVH-NH ₂ ⁹⁸	6,73	12,74	-	6,01	6,73	-
Ac-HAAHVH-NH ₂	6,81 (1)	13,12 (1)	18,81 (1)	5,69 (1)	6,31 (1)	6,811 (1)
Ac-HAAHGH-NH ₂	7,00 (1)	13,36 (1)	19,16 (1)	5,80 (1)	6,36 (1)	7,00 (1)
Ac-HGGHGH-NH ₂	7,03 (2)	13,37 (2)	19,18 (3)	5,81 (3)	6,34 (2)	7,03 (2)
Ac-HGGGHGH-NH ₂	7,01 (1)	13,46 (1)	19,21 (1)	5,75 (1)	6,45 (1)	7,01 (1)
Ac-HGHVH-NH ₂ ¹⁰³	6,93	13,26	18,98	5,72	6,33	6,93
Ac-HAHVH-NH ₂ ¹⁰³	6,83	13,07	18,74	5,67	6,24	6,83
Ac-HVHGH-NH ₂ ¹⁰³	6,92	13,23	18,95	5,72	6,31	6,92

Az imidazolcsoportok deprotonálódása pH 4-7 közötti tartományban egymással átfedő lépésekben játszódik le. Ezt a számított pK értékek közötti kis különbségek is jól tükrözik, melyek egy meghatározott statisztikai érték (0,6) körül vannak. Ebből az a következtetés vonható le, hogy a hisztidinek közötti aminosav oldalláncok nem befolyásolják a deprotonálódási folyamatokat. Az imidazolra jellemző pK = 7,04¹⁹⁸, ehhez képest a meghatározott deprotonálódási állandók kisebbek. Ez egyrészt azzal magyarázható, hogy az egymáshoz viszonylag közel lévő hisztidinek között kölcsönhatás alakul ki, másrészt az imidazolcsoportok mellett elektronszívó amidcsoportok vannak jelen. Ezek a hatások csökkentik az imidazolcsoportok pK-ját. Azt, hogy a meghatározott pK-értékek mely

hisztidinekhez rendelhetők, nem állapítható meg, azaz az imidazolnitrogének nem különböztethetők meg egymástól.

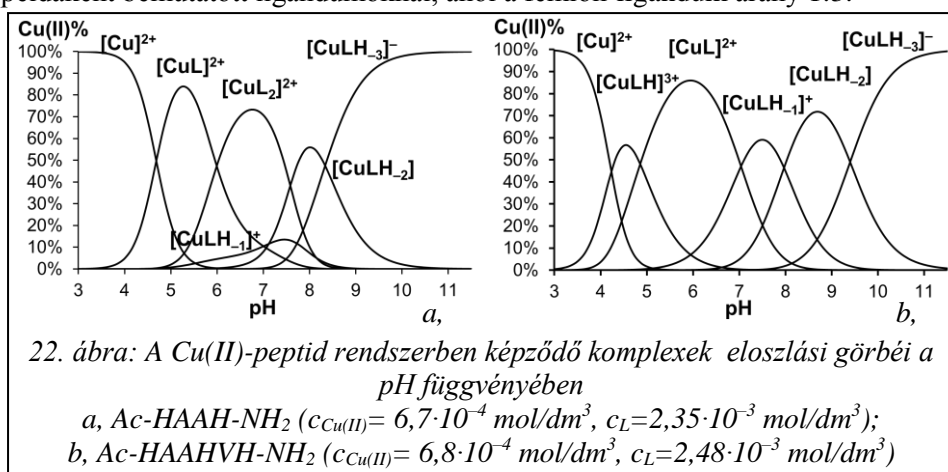
4.2.2. A Cu,Zn-SOD enzimet modellező peptidek Cu(II)-komplexei

Az Ac-HAAH-NH₂ ligandum esetében 1:3, és 1:1 fémion-ligandum aránynál, a három hisztidint tartalmazó ligandumoknál a fent említett arányokon kívül fémfelesleget tartalmazó rendszerben is végeztünk oldategyensúlyi vizsgálatokat. A kapott titrálási adatokból határoztuk meg a Cu(II)-komplexek stabilitási állandóit, melyek értékeit a 8. táblázat tartalmazza, kiegészítve néhány irodalmi adattal is.

8. táblázat: A Cu(II)-peptid rendszerekben képződő komplexek stabilitási állandói (I = 0,2 mol/dm³, T = 298 K)

	Ac-HAAH-NH ₂	Ac-HGGH-NH ₂ ¹⁹⁷	Ac-HVVH-NH ₂ ⁹⁸	Ac-HAAHVH-NH ₂	Ac-HAAHGH-NH ₂	Ac-HGGHGH-NH ₂	Ac-HGGHGH-NH ₂	Ac-HGHVH-NH ₂ ¹⁰³	Ac-HAAHVH-NH ₂ ¹⁰³	Ac-HVVHGH-NH ₂ ¹⁰³
CuLH	-	-	-	13,03 (4)	13,02 (6)	13,05 (3)	12,80 (3)	13,1	13,08	-
CuL	6,08 (2)	5,97	5,79	8,17 (3)	8,55 (3)	8,21 (2)	7,38 (4)	8,07	8,08	7,78
CuLH-1	-0,93 (5)	-	-1,05	1,13 (7)	1,5 (1)	1,81 (5)	1,35 (4)	1,24	1,27	1,13
CuLH-2	-8,05 (3)	-7,88	-9,21	-6,84 (7)	-5,90 (7)	-5,63 (6)	-6,13 (7)	-6,03	-5,85	-6,25
CuLH-3	-16,39 (4)	-16,1	-17,6	-16,24 (9)	-14,95 (8)	-14,74 (9)	-15,60 (9)	-16,47	-15,81	-16,39
Cu ₂ LH-2	-	-	-	-	-	-	-	-1,37	-1,08	-
Cu ₂ LH-4	-	-	-	-16,39 (7)	-	-15,07 (4)	-16,07 (4)	-14,05	-13,63	-14,46
Cu ₂ LH-5	-	-	-	-25,1 (2)	-23,35 (9)	-23,6 (1)	-25,51 (9)	-24,82	-23,82	-24,14
Cu ₂ LH-6	-	-	-	-	-	-	-36,50 (9)	-35,55	-34,24	-35,78
CuL ₂	10,03 (9)	9,79	9,52	-	-	-	-	-	-	-
pK ₁ (N ⁻)	7,01	6,93	6,84	7,04	7,02	6,4	6,03	6,83	6,81	6,65
pK ₂ (N ⁻)	7,12		8,16	7,97	7,43	7,44	7,48	7,27	7,12	7,38
pK ₃ (N ⁻)	8,34	8,22	8,39	9,4	9,05	9,11	9,47	10,44	9,96	10,14
pK (CuLH/ CuL)	-	-	-	4,86	4,47	4,84	5,42	5,03	5,0	-
pK (Cu ₂ LH-4 /Cu ₂ LH-5)	-	-	-	8,71	-	8,08	9,44	10,73	10,42	9,68

A két hisztidint tartalmazó peptidnél csak egymagvú komplexek vannak jelen az oldatban, míg kettőnél több hisztidint tartalmazó rendszerekben többmagvú komplexek is keletkeznek. Savas pH-tartományban az összes imidazolcsoport deprotonálódása és koordinálódása végbemegy. Ebben a tartományban CuL összetételű komplex képződik, amelyben imidazol-koordináció valósul meg és az feltételezhető, hogy mindegyik imidazolnitrogén részt vesz a fémion megkötésében. A CuL komplex nagy stabilitású, így gyengén savas közegben ez a szerkezet válik uralkodóvá az oldatban. A kisebb tagszámú peptidek esetében ligandumfeleslegnél CuL₂ komplex is megjelenik és semleges pH-n az lesz a meghatározó szerkezet. Ezeket szemléltetik az eloszlási görbék (22. ábra) a példaként bemutatott ligandumoknál, ahol a fémion-ligandum arány 1:3.



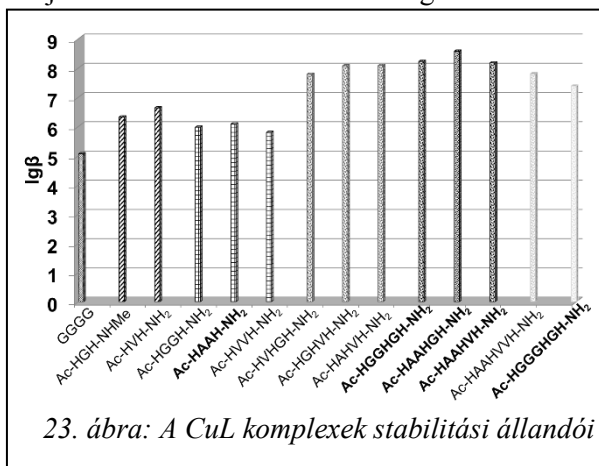
Az imidazol-koordinációjú CuL komplex visszaszorítja az amidnitrogének deprotonálódását, de nem tudja megakadályozni azt, így 6,5-7 körüli pH-tartományban végbemegy az első amidnitrogén deprotonálódása. A deprotonálódás hatására megjelenik a vizsgált rendszerekben a CuL komplex mellett a CuLH₁ összetételű részecske is, melyet az eloszlások (22. ábra) is jól mutatnak. A deprotonálódás a peptid C-terminális végétől indul meg, a hisztidin imidazolgyűrűje horgonycsoportként viselkedik.

Az Ac-HAAH-NH₂ ligandum esetében az első és a második amidnitrogén deprotonálódása egy lépésben játszódik le, ez hasonlít a korábban meghatározott Ac-HGGH-NH₂ adataihoz, de eltérés mutatkozik az Ac-HVVH-NH₂ peptidhez képest (8. táblázat).

A vizsgált három hisztidint tartalmazó ligandumoknál az amidnitrogének deprotonálódása egymást követő lépésekben játszódik le. A hexa- és heptapeptidekben lévő láncvégi és láncközi hisztidinek is horgonycsoportként viselkedhetnek, ezáltal izomer szerkezetek alakulhatnak ki az oldatban. A második amidnitrogén deprotonálódása pH ~ 7,5 körül zajlik mindegyik ligandumnál, ami

jó egyezésben van a hisztidineket alternáló pozícióban tartalmazó ligandumok pK értékeivel. Ezen ismeretek alapján első közelítésben [N(Im), N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációs mód valószínűsíthető a CuLH₂ összetételű komplexekben a C-terminális végen található hisztidin koordinációjával. A harmadik amidnitrogén deprotonálódása az első kettőhöz képest nagyobb pH-n megy végbe. A glicin tartalmazó peptidek második és harmadik amidnitrogénjének lépcsője között egy kicsivel nagyobb eltérés mutatkozik, mint az Ac-HAAHVH-NH₂ ligandumnál. Ezek az értékek is azt sejtetik minden előzetes spektroszkópiás vizsgálat nélkül, hogy a kialakuló CuLH₂ összetételű részecskék szerkezetében némi eltérés mutatkozhat, illetve koordinációs izomerek is képződhetnek. A kialakuló CuLH₃ összetételű komplexben [N⁻, N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációs mód van jelen, a fémion koordinációs szférája az ekvatoriális síkban telített, így a másik imidazol csak axiális koordinációval kötődhetne a Cu(II)-ionhoz. A titrálási adatokból nem lehet megállapítani, hogy melyik izomer keletkezik. Ahhoz, hogy megadjuk melyik imidazzal van kölcsönhatásban a fémion, spektrális vizsgálatokra van szükség. A hat- és héttagú ligandumoknál lehetőség van kétmagvú komplexek képződésére is. Ha négy amidnitrogén deprotonálódik, akkor Cu₂LH₄ összetételű komplex, míg öt amidnitrogén részvételével Cu₂LH₅ összetétellel jellemezhető komplex alakul ki, illetve az Ac-HGGGHGH-NH₂ ligandummal Cu₂LH₆ összetételű részecske is kialakul pH > 11 felett. A két fémion körüli koordinációs környezetre itt is a spektrális adatokból következtettünk.

A 2, 3, 4 imidazol-koordinációjú CuL komplexek kiugróan nagy stabilitását már korábbi peptideknél is megfigyelték.^{98, 101, 102-103, 106, 197} A 23. ábra az egyes ligandumok CuL komplexeire jellemző stabilitási állandó logaritmus értékét mutatja be. A diagram jól szemlélteti azt, hogy ezeknek a komplexeknek a stabilitásában trend mutatkozik. A CuL összetételű részecskék stabilitása függ a koordinálódó hisztidinek számától, egymáshoz viszonyított helyzetétől és a közöttük lévő aminosavak típusától. A hisztidinek

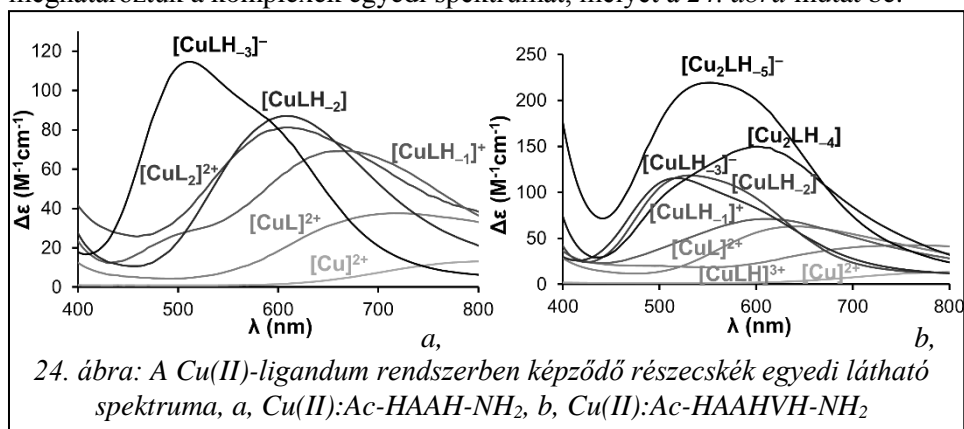


23. ábra: A CuL komplexek stabilitási állandói

számának növekedésével a stabilitási állandó is nő. Ezt mutatja a két és három imidazol-koordinációjú CuL komplexek stabilitási állandója közötti két nagyságrend különbség is, illetve bizonyíték arra is, hogy valóban részt vesz a fémion megkötésében a harmadik imidazolnitrogén. Az is megállapítható, hogy

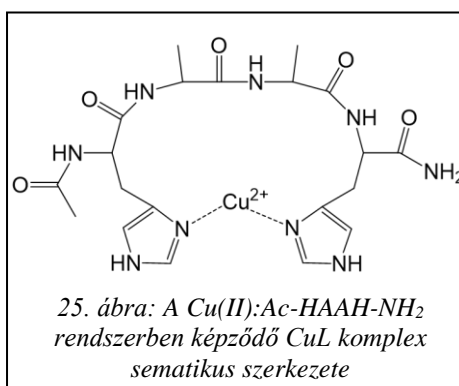
kis tagszámú peptidek esetében a HXH a kedvező szekvencia a HXXH-val ellentétben, mert a kialakuló makrokelát nagyobb mértékben stabilizálja a képződő komplexet. A hisztidinek közötti aminosavak térkitöltése is befolyásolja keletkező komplexek stabilitását. Az Ac-HGGH-NH₂-vel és Ac-HAAH-NH₂-vel képzett CuL komplexek stabilitása nagyon hasonló, viszont a nagyobb térkitöltésű csoportot tartalmazó Ac-HVVH-NH₂ CuL komplexe kisebb stabilitású. Ugyanakkor az Ac-HXXHHZH-NH₂ szekvenciájú peptidláncnál a kialakuló komplex kicsivel nagyobb stabilitású, mint amelyik alternáló pozícióban tartalmazza a hisztidint és a két hisztidint egymás mellett tartalmazó ligandum (Ac-HHGH-NH₂) CuL komplexe ezektől is kisebb stabilitást mutat. A két hisztidin között tovább növelve az aminosavak számát, csökken a komplex stabilitása. Az imidazol-koordinációjú CuL komplexek stabilitására így az alábbi sorrendet állapítottuk meg: Ac-HXXH-NH₂ < Ac-HXH-NH₂ < Ac-HXXHZZH-NH₂ < Ac-HXH-NH₂ < Ac-HHGH-NH₂ < Ac-HGGGHGH-NH₂ < Ac-HXHZH-NH₂ < Ac-HXXHZH-NH₂.

A ligandumok Cu(II)-ionnal alkotott komplexeinek szerkezetét spektrális adatokkal igyekeztünk alátámasztani. Az abszorpciós spektrumok adataiból meghatároztuk a komplexek egyedi spektrumát, melyet a 24. ábra mutat be.



A 9. táblázat a Cu(II)-Ac-HAAH-NH₂ rendszerben képződő részecskékhez tartozó

λ_{\max} értékeket tartalmazza, kiegészítve az empirikus képlettel (19. egyenlet) számolt adatokkal. Az általunk meghatározott abszorpciós maximum értékek összhangban vannak a képlet⁵⁸ alapján számított λ_{\max} adatokkal. Ezek alapján megállapítható, hogy a CuL komplexben két imidazolnitrogénnel (25. ábra), a CuL₂ részecskében négy imidazolnitrogénnel keresztül



koordinálódik a fémion. A CuLH₋₁ komplexben egy imidazolnitrogén és egy amidnitrogén, míg a CuLH₋₂ összetétellel jellemezhető részecskénél egy imidazolnitrogén és két amidnitrogén vesz részt a fémion megkötésében. A szabadon maradt imidazolgyűrű kötődését nem mutattuk ki. A CuLH₋₃ komplex [3 N⁻, N(Im)] koordinációs móddal jellemezhető.

9. táblázat: A Cu(II)-komplexek UV-látható spektroszkópiás adatai (λ_{\max} (nm), $\Delta\epsilon$ (M⁻¹cm⁻¹)) és az empirikus képlet alapján számolt λ_{\max} (nm) értékek

	Ac-HAAH-NH ₂			
	mért		számított	
	λ_{\max} ($\Delta\epsilon$)	koordinációs mód	λ_{\max}	koordinációs mód
CuL	720 (37,5)	[2 N(Im), 2 H ₂ O]	687	[2 N(Im), 2 H ₂ O]
CuLH ₋₁	665 (69)	[N ⁻ , N(Im), 2 H ₂ O]	604	[2 N(Im), N ⁻ , H ₂ O]
			660	[N(Im), N ⁻ , 2 H ₂ O]
CuLH ₋₂	610 (87)	[2 N ⁻ , N(Im), H ₂ O]	539	[2 N(Im), 2 N ⁻]
			583	[N(Im), 2 N ⁻ , H ₂ O]
CuLH ₋₃	510 (115)	[3 N ⁻ , N(Im)]	522	[N(Im), 3 N ⁻]
CuL ₂	610 (81)	[4 N(Im)]	576	[4 N(Im)]

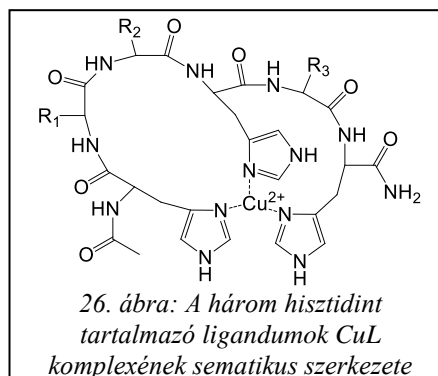
A 10. táblázatban az általam vizsgált peptidek és két összehasonlításként feltüntetett peptid Cu(II)-komplexeinek abszorpciós maximuma látható.

10. táblázat: Cu(II)-komplexek λ_{\max} (nm), $\Delta\epsilon$ (M⁻¹cm⁻¹) értékei

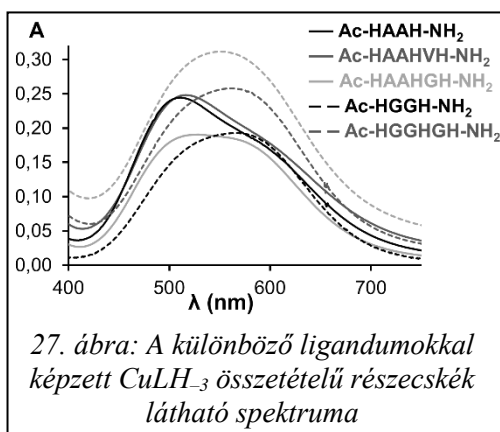
	Ac-HAAH-NH ₂	Ac-HGGH-NH ₂ ¹⁹⁷	Ac-HAAHVH-NH ₂	Ac-HAAHGH-NH ₂	Ac-HGGHGH-NH ₂	Ac-HGGGHG-H-NH ₂	Ac-HAAHVH-NH ₂ ¹⁰³
	λ_{\max} ($\Delta\epsilon$)						
CuLH	-	-	760 (42)	-	-	-	725 (45)
CuL	720 (37,5)	695 (45)	640 (63)	626 (71)	637 (75)	652 (50)	655 (69)
CuLH ₋₁	665 (69)	-	615 (71)	-	-	605 (81)	610 (95)
CuLH ₋₂	610 (87)	600 (85)	530 (118)	565 (117)	566 (152)	567 (119)	550 (131)
CuLH ₋₃	510 (115)	565 (114)	515 (115)	524 (116), 561 váll	562 (164) széles	551 (156) széles	530 (121)
CuL ₂	610 (81)	625 (71)	-	-	-	-	-
Cu ₂ LH ₋₄	-	-	600 (150)	-	595 (93)	592 (104)	577 (115)
Cu ₂ LH ₋₅	-	-	545 (219)	563 (132)	568 (132)	558 (117)	-
Cu ₂ LH ₋₆	-	-	-	-	-	545 (126)	534 (133)

A Cu(II)-Ac-HGGH-NH₂ rendszerben kialakuló [3 N⁻, N(Im)] koordinációjú komplexben a kötésben részt nem vevő hisztidin imidazolnitrogénjének axiális kölcsönhatása feltételezhető. Ez a kölcsönhatás az Ac-HAAH-NH₂ CuLH₋₃ komplexénél nem valósul meg, ezért van nagyobb különbség a két komplex λ_{\max} értéke között (10. táblázat), és ez szintén alátámasztja a korábban meghatározott koordinációs módot.

Az Ac-HXXXHZH-NH₂ peptidokkal képződő CuL komplexben (26. ábra) három imidazolnitrogéne keresztül koordinálódik a fémion. Erre a koordinációs módra jellemző, az empirikus képletből számított abszorpciós maximum értéke, 627 nm, mely jó egyezést mutat az általunk meghatározott értékekkel (10. táblázat).



A CuLH₋₁ komplexek spektrális paramétereit két ligandumnál tudtuk meghatározni, mert ezeknél alakul ki viszonylag nagyobb mennyiségben ez a komplex (10. táblázat). A kapott λ_{\max} értékeket összehasonlítva az empirikus egyenletből számított adatokkal az állapítható meg, hogy [N(Im), N⁻, N(Im)] koordinációs mód van jelen ezekben a részecskékben. A glicintartalmú ligandumok CuLH₋₂ összetételű komplexeinél nagyobb eltérés mutatkozik a mért és az [N(Im), N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációs módra számított λ_{\max} értékek között. Ez arra utal, hogy ezekben a komplexekben az ekvatoriális síkban két imidazolnitrogén és két amidnitrogén köti a fémiont és feltételezhető az N-terminális végen található harmadik hisztidin imidazolnitrogénjének axiális irányú koordinációja. Összességében a spektrális adatok azt támasztják alá, hogy a



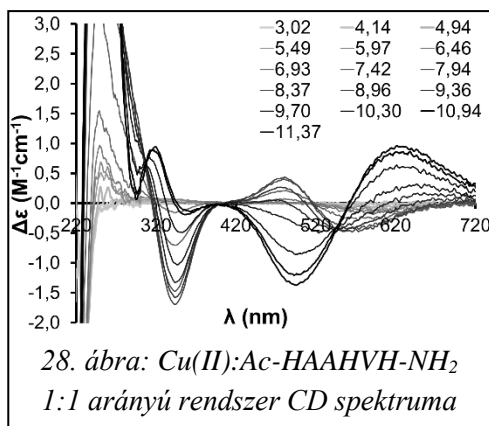
CuLH₋₁ és CuLH₋₂ összetételű komplexekben két imidazolnitrogén vesz részt a koordinációban az egy és két amidnitrogén részvétele mellett, ami hasonló a korábban meghatározott Cu(II)-Ac-HAHVH-NH₂ rendszerben képződő komplexek geometriájához. Az Ac-HAAHVH-NH₂ peptid CuLH₋₃ komplexe abszorpciós spektrumának lefutása nagyon hasonló az Ac-HAAH-NH₂

ligandum ugyanilyen összetételű komplexének spektrumához (27. ábra), ami azt sejteti, hogy a közbenső hisztidin a fő fémionkötőhely ebben a részecskében. A

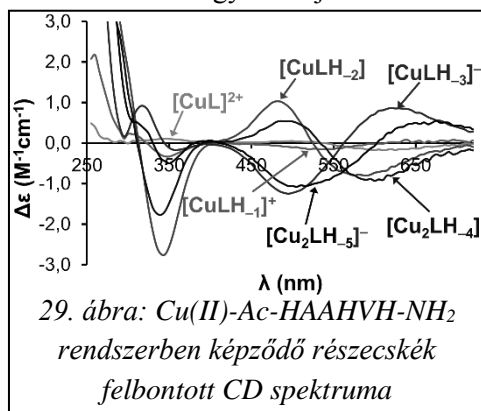
vizsgált glicintartalmú ligandumok ugyanezen komplexére vonatkozó abszorpciós spektrumban (27. ábra) széles elnyelési sáv detektálható ~560 nm-nél, ami azt mutatja, hogy ekvimoláris oldatban az amidnitrogének deprotonálódásával és koordinációjával kialakuló komplex képződésével párhuzamosan koordinációs izomerek jelenhetnek meg a rendszerben a C-terminális végen lévő hisztidin, illetve a közbenső hisztidin részvételével. Annak eldöntésére, hogy mely izomer a meghatározó az oldatban az UV-látható spektroszkópia nem ad elegendő információt, ezért szükség volt CD spektroszkópiás mérésekre is.

A három hisztidint tartalmazó ligandumok két ekvivalens fémion megkötésére is képesek. A Cu_2LH_4 összetételű komplexben a λ_{max} értéke alapján mindkét Cu(II)-ion esetében $[2\text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$ koordinációs mód valószínűsíthető. A Cu_2LH_5 részecskében vegyes koordinációs mód van jelen: $[2\text{N}^-, \text{N}(\text{Im})] + [3\text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$. A Cu_2LH_6 komplexben mindkét réz(II)ion három amidnitrogénhez és egy imidazolnitrogénhez kötődik.

Ebben a fejezetben tárgyalt ligandumok Cu(II)-komplexeinek pH-függő CD spektrumsorozatát 1:1, 1:3 fémion-ligandum arányoknál rögzítettük. Ezenkívül a hexa- és heptapeptidek fémionfelesleget tartalmazó oldatait is vizsgáltuk. Ezt szemlélteti a 28. ábra, ahol az Ac-HAAHVH-NH₂ ekvimoláris oldatában különböző pH-kon felvett spektrumok láthatóak a hullámhossz függvényében. A 28. ábra tükrözi, hogy savas tartományban nincs aktivitás. A pH emelésével a koordinációs szférában megnő az amidnitrogének száma és ezzel együtt a jelintenzitás is növekszik. pH > 9 fölött kb. 500 nm-nél a Cotton effektus előjelet vált, azaz negatív lesz. A CD spektrumok adataiból PSEQUAD programmal kiszámítottuk az egyes részecskék egyedi CD spektrumait, melyet a 29. ábra szemléltet a Cu(II)-Ac-HAAHVH-NH₂ rendszerre. Leolvasható róla, hogy az imidazolkoordinációjú komplexeknek nincs CD aktivitása. A CuLH_1 összetételű



28. ábra: Cu(II):Ac-HAAHVH-NH₂ 1:1 arányú rendszer CD spektruma



29. ábra: Cu(II)-Ac-HAAHVH-NH₂ rendszerben képződő részecskék felbontott CD spektruma

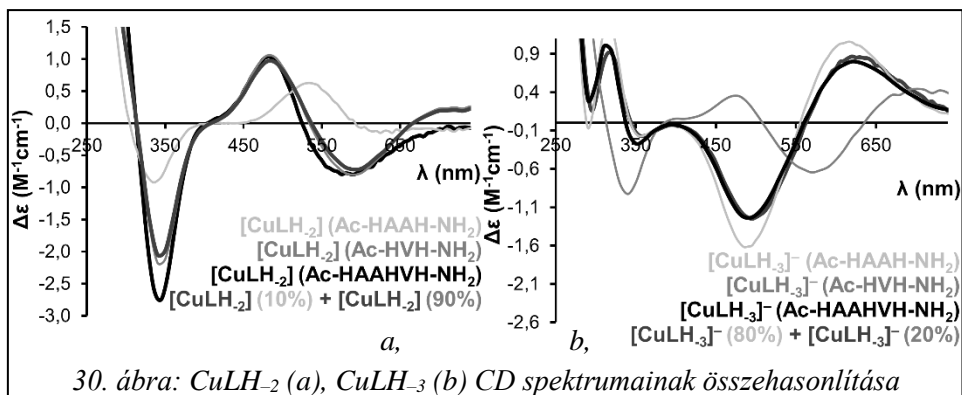
részecskében a királis információ közvetítésére még egy amidnitrogén túl kevés, így annak a Cotton-effektusa kicsi.

Az Ac-HAAH-NH₂ peptid CuLH₂ és CuLH₃ komplexének CD spektroszkópiás adatai jó egyezésben vannak a dAKHA ligandum ugyanilyen szerkezetű részecskéinek adataival 11. táblázat. Ez azt támasztja alá, hogy ezekben a komplexekben az N-terminális végen található hisztidin nem vesz részt a koordinációban, és axiálisan sem kötődik a fémionhoz.

11. táblázat: Az [N⁻, N⁻, N(Im)] és [N⁻, N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációs módú komplexek CD spektroszkópiás adatai (λ_{max} (nm), Δε (M⁻¹cm⁻¹))

	Ac-HAAH-NH ₂	dAKHA
[N ⁻ , N ⁻ , N(Im)]	335 (-0,921)	340 (-0,242)
	535 (+0,628)	537 (+0,272)
	625 (-0,150)	677 (-0,114)
[N ⁻ , N ⁻ , N ⁻ , N(Im)]	315 (+1,327)	315 (+0,612)
	355 (-0,174)	350 (-0,196)
	490 (-1,613)	494 (-1,138)
	615 (+1,055)	627 (+1,035)

A kisebb tagszámú peptidek CuLH₂ részecskéinek CD spektrumát megfelelő arányban összegezve megbecsülhető az, hogy a három hisztidint tartalmazó ligandumok ugyanilyen összetételű komplexekben a közbenső és a C-terminális végen lévő hisztidin milyen arányban vesz részt a fémion megkötésében. Ezzel a módszerrel a CuLH₃ komplexre vonatkozó izomerarány is számítható. Az Ac-HAAH-NH₂ és az Ac-HVH-NH₂ ligandumokkal képzett Cu(II)-komplexek CD spektrumait különböző arányban összegezve (30. a, b ábra) megállapítható az Ac-HAAHVH-NH₂ peptid CuLH₂ és CuLH₃ komplexekben mely izomer a domináns. A 30. a ábrán a két kisebb tagszámú peptid CuLH₂ komplexére jellemző CD spektrum, valamint ezek 90 : 10 % arányban való összegzése látható, és ez jól egyezik az Ac-HAAHVH-NH₂ CuLH₂ egyedi spektrumával. A CuLH₂ komplex esetében döntően [N(Im), N⁻, N⁻, N(Im)] koordináció valósul meg a C-

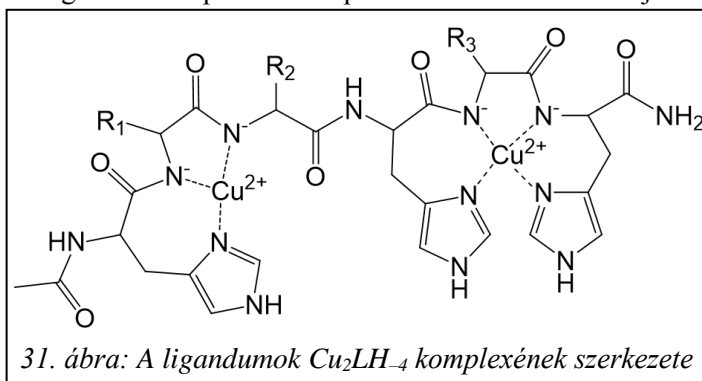


terminális végen lévő hisztidin imidazolnitrogénjének részvételével. A 30. b ábrán a két kisebb tagszámú peptid CuLH_3 komplexére jellemző CD spektrum, valamint ezek 80 : 20 % arányban való összegzése látható, és ez jól egyezik az Ac-HAAHVH-NH₂ CuLH_3 egyedi spektrumával. Az [N⁻, N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációs módú CuLH_3 összetételű komplexben a közbenső hisztidin imidazolnitrogénje köti a fémiont. A glicintartalmú peptidok CuLH_2 komplexében a C-terminális végen található hisztidin a horgonydonor és a koordinációs mód [N(Im), N⁻, N⁻, N(Im)], ami kiegészül az N-terminális hisztidin axiális koordinációjával. Az [N(Im), N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációs módra szolgál bizonyítékként, hogy a glicintartalmú ligandumok és az Ac-HGH-NHMe CuLH_2 komplexének CD spektruma nagyon hasonló lefutású. Az Ac-HVGDH-NH₂ ligandum ugyanilyen összetételű komplexénél kimutatták az N-terminális hisztidin axiális koordinációját. Ezt a CD spektrumban ~560 nm-nél vállként megjelenő pozitív Cotton effektusú csúcs mutatja. Ez az általunk vizsgált ligandumoknál is megjelenik. A 12. táblázat tartalmazza a vizsgált ligandumok amidnitrogénes koordinációjú komplexeinek CD spektrumok segítségével megbecsült izomerarányát.

12. táblázat: A Cu(II)-komplexek izomeraránya

Ligandum	Komplex	Izomerarány %	Használt ligandumok
Ac-HAAHVH-NH ₂	CuLH_2	10 : 90	Ac-HAAH-NH ₂ : Ac-HVH-NH ₂
	CuLH_3	80 : 20	
Ac-HAAHGH-NH ₂	CuLH_2	100	Ac-HGH-NHMe
	CuLH_3	60 : 40	Ac-HAAH-NH ₂ : Ac-HGH-NHMe
Ac-HGGHGH-NH ₂	CuLH_2	100	Ac-HGH-NHMe
	CuLH_3	45 : 55	Ac-HGGH-NH ₂ : Ac-HGH-NHMe
Ac-HGGGHH-NH ₂	CuLH_2	100	Ac-HGH-NHMe
	CuLH_3	28 : 72	Ac-GTHS-NH ₂ : Ac-HGH-NHMe

A kétmagvú komplexek szerkezete is bizonyítható a kisebb tagszámú ligandumok megfelelő komplexei CD spektrumának kombinációjával. A vizsgált

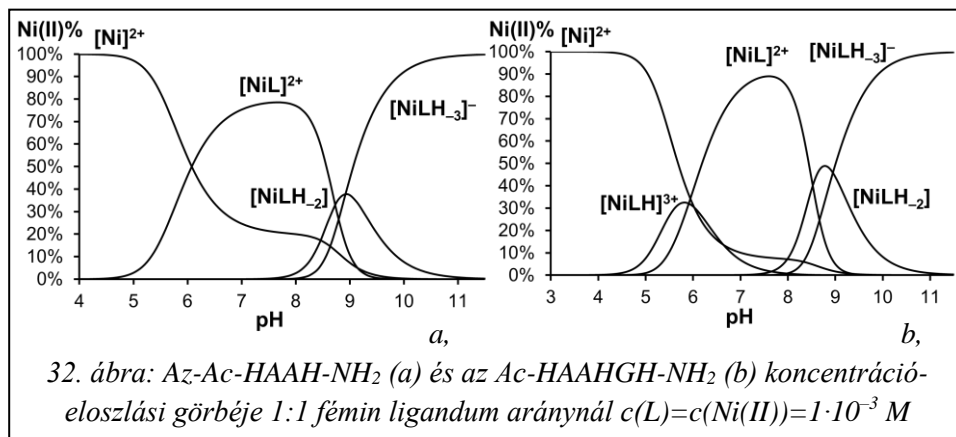


ligandumok Cu_2LH_4 összetételű komplexében a CD spektrumok elemzése alapján $[\text{N}(\text{Im}), \text{N}^-, \text{N}^-] + [\text{N}(\text{Im}), \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$ vegyes koordinációs mód van jelen (31. ábra), ahol mind a három hisztidin imidazolnitrogénje részt vesz a fémion megkötésében. A Cu_2LH_5 részecskében vegyes koordinációs mód van jelen $[3 \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})] + [2 \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$. Az Ac-HGGHGH-NH₂ ligandumnál kialakuló Cu_2LH_6 összetételű komplexben $[\text{N}(\text{Im}), 3 \text{N}^-] + [3 \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$ koordinációs mód feltételezhető.

4.2.3. A Cu,Zn-SOD enzimet modellező peptidok Ni(II)-komplexei

A két és három hisztidint tartalmazó ligandumok Ni(II)-ionnal való komplexképződési folyamatait tanulmányoztuk pH-potenciometriás és spektroszkópiás módszerek segítségével. A mérések során a fémion-ligandum arányát 1:3 és 2:1 között állítottuk be.

A 32. koncentráció-eloszlási görbe jól szemlélteti, hogy a két és három hisztidintartalmú ligandumoknál a komplexképződés egyaránt pH > 5 felett kezdődik el. A Cu(II)-ionok mellett a Ni(II)-ion számára is a hisztidin imidazolnitrogénje viselkedik horgonydonorként. Ebben a pH-tartományban a fent említett csoportok deprotonálódnak és koordinálódnak a nikkell(II)ionhoz NiL összetételű kettős, illetve három imidazol-koordinációjú, makrokelát szerkezetű részecskét képezve. Ezek a komplexek uralkodóak gyengén savas közegben, de nem elég nagy stabilitásúak ahhoz, hogy megakadályozzák az amidnitrogének deprotonálódását, így az a pH emelésével bekövetkezik. Ahhoz viszont elég nagy stabilitást mutatnak, hogy a fémion hidrolízisét elkerüljük ligandumfelesleg



tartalmazó és ekvimoláris oldatokban. Az Ac-HXHZH-NH₂ peptidokkal ellentétben a vizsgált pH-tartományban nem képződik kétmagvú komplex. Az oldategyensúlyi vizsgálatok során meghatározott Ni(II)-komplexekre vonatkozó stabilitási állandó értékeit tartalmazza a 13. táblázat, kiegészítve néhány irodalmi adattal. A két és három hisztidint tartalmazó peptidokkal képzett NiL komplexek

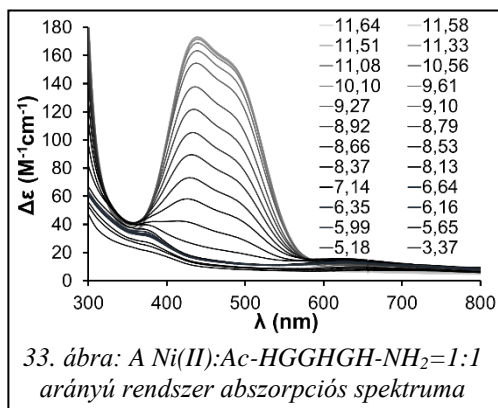
stabilitása nagyobb, mint az egy hisztidint tartalmazókra jellemző érték (6. táblázat). Ez azt mutatja, hogy ezekben a részecskékben a komplexképződés során az összes imidazolcsoport deprotonálódik és koordinálódik a fémionhoz. Összehasonlítva a vizsgált több hisztidint tartalmazó peptidek ML komplexeinek stabilitását az mondható el, hogy a Ni(II)-komplexek ezúttal is kisebb stabilitásúak, mint a Cu(II)-komplexek, ami megfelel az Irving-Williams sornak. A három hisztidint tartalmazó ligandumok közül az alternáló pozícióban hisztidint tartalmazó ligandumokkal képződik a legnagyobb stabilitású NiL komplex. A hisztidinek távolságát növelve csökken a stabilitási állandó értéke. Az is megállapítható, hogy nemcsak a hisztidinek közötti aminosavak számától, hanem a típusától is függ a képződő komplex stabilitása. Minél nagyobb térkitöltésű csoportot tartalmaz a hisztidinek közötti aminosav, annál kisebb stabilitású ez a komplex.

13. táblázat: A Ni(II)-peptid rendszerekben képződő komplexek stabilitási állandói ($I = 0,2 \text{ mol/dm}^3$, $T = 298 \text{ K}$)

	Ac-HAAH-NH ₂	Ac-HGGH-NH ₂ ⁹⁷	Ac-HVVH-NH ₂ ⁹⁸	Ac-HAAHVH-NH ₂	Ac-HAAHGH-NH ₂	Ac-HGGHGH-NH ₂	Ac-HGGHGH-NH ₂	Ac-HVHGH-NH ₂ ¹⁰⁵
NiLH	-	-	-	10,55 (4)	10,70 (7)	10,76 (4)	10,66 (4)	10,83
NiLH	3,90 (2)	3,70	3,67	4,58 (3)	4,79 (4)	4,79 (2)	4,65 (2)	4,8
NiLH ₋₁	-	-	-	-	-	-	-	-
NiLH ₋₂	-13,56 (3)	-	-	-12,90 (4)	-12,26 (5)	-12,43 (3)	-12,79 (3)	-12,59
NiLH ₋₃	-22,48 (2)	-21,81	-23,62	-22,61 (5)	-21,21 (6)	-21,37 (3)	-21,46 (2)	-22,04
Ni ₂ LH ₋₂	-	-	-	-	-	-	-	-8,91
Ni ₂ LH ₋₄	-	-	-	-	-	-	-	-25,73
Ni ₂ LH ₋₅	-	-	-	-	-	-	-	-35,64
pK ₁₂ (N ⁻)	8,83	8,5	9,1	8,74	-	-	-	8,70
pK ₃ (N ⁻)	-	-	-	9,71	-	-	-	9,45
pK _{átlag} (N ⁻)	-	-	-	-	8,74	8,78	8,70	6,03

Az Ac-HAAHVH-NH₂ ligandumnál az első két amidnitrogén deprotonálódása egy lépésben játszódik le (13. táblázat utolsó előtti két sora) és NiLH₋₂ összetételű részecske képződik. A harmadik amidnitrogén deprotonálódása és koordinálódása az előző lépéstől elkülönülten zajlik. Ez arra utal, hogy a NiLH₋₂ komplexben egy stabilizáló tényező van jelen, ami elősegíti az első két amidnitrogén egy lépésben történő deprotonálódását, és akadályozza a harmadik amidnitrogén deprotonálódását. Ezek alapján feltételezhető, hogy [N(Im), N⁻, N⁻, N(Im)] donorszetteren keresztül történik a fémion megkötése. Az

Ac-HXHZH-NH₂ ligandumok vizsgálata során is erre a következtetésre jutottak.¹⁰⁵ A két hisztidint tartalmazó peptidnél és a glicint tartalmazóknál az előzővel ellentétben a két amidnitrogén és egy imidazolnitrogén koordinációjával kialakuló komplex kis mennyiségben jelenik meg és a harmadik amidnitrogén deprotonálódása, kötődése ezzel a folyamattal átfedésben megy végbe és NiLH₋₃ összetételű komplex keletkezik (13. táblázat utolsó sora). Meglepő módon a glicint tartalmazó ligandumoknál nem feltételezhető az előbb említett második imidazolnitrogén stabilizáló hatása. Ez eredhet abból, hogy a glicin kis térkitöltése miatt a molekula flexibilisebb, ami által nehezíti a második imidazolnitrogén koordinációját a Ni(II)-ionhoz. A három hisztidint tartalmazó ligandumok amidnitrogénes koordinációjú komplexeinél lehetőség adódik izomer szerkezetek kialakulására a közbenső vagy a C-terminális hisztidin részvételével. Ahhoz, hogy megállapítsuk a keletkező komplexek szerkezetét spektrofotometriás és CD spektroszkópiás vizsgálatokat is végeztünk.

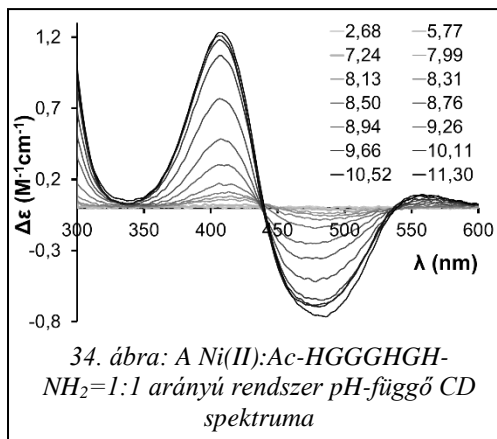


A 33. ábrán az Ac-HGGHGH-NH₂ Ni(II)-ionnal képzett komplexek abszorpciós spektrumát tüntettem fel példaként. Elemezve a spektrumsorozatot látható, hogy pH 8-ig 370 és 600 nm körül kis intenzitású elnyelési sávok jelennek meg, ami az oktaédes geometriára jellemző átmeneteket tükrözi. Savas, enyhén lúgos közegben a csak imidazol-

koordinációjú NiL komplex uralkodó az oldatban és az említett kis intenzitású átmenetek ezen komplexek oktaédes geometriájára utalnak. A pH emelésével extra lúgfogyasztó folyamatok mennek végbe, ami az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját jelenti. Ezzel párhuzamosan a spektrumban egy intenzívebb elnyelési sáv jelenik meg 440 nm-nél, ami a komplexek síknégyszetes voltára utal. A három hisztidint tartalmazó ligandumoknál a fent említett sáv 480 nm körül lévő vállal egészül ki. Korábbi vizsgálatok során megállapították, hogy a több hisztidint tartalmazó ligandumoknál ez a megjelenő váll izomer szerkezetek jelenlétére utal.¹⁰⁵ Ezek alapján az általunk vizsgált ligandumok NiLH₋₂ és NiLH₋₃ összetételű részecskéinél is feltételezhető

koordinációs izomer jelenléte. A feltételezett koordinációs módok és szerkezetek alátámasztására CD spektroszkópiás vizsgálatokat is végeztünk, amelyből az izomerek arányára is tudunk következtetni.

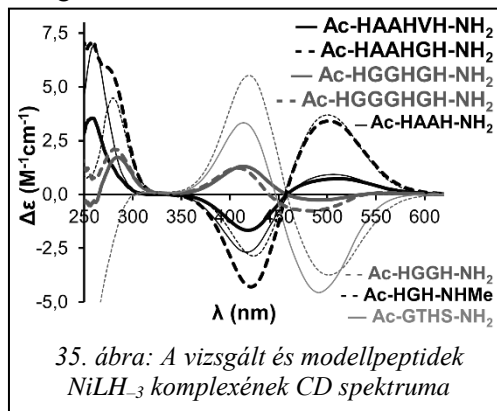
A Ni(II):Ac-HGGGHGH-NH₂=1:1 arányú rendszer pH-függő CD spektrumáról (34. ábra) leolvasható, hogy pH 8-ig nincs CD aktivitás, ami megerősíti azt a feltételezést, hogy a NiL komplexek



34. ábra: A Ni(II):Ac-HGGGHGH-NH₂=1:1 arányú rendszer pH-függő CD spektruma

oktaéderez geometriával rendelkeznek. Majd pH > 8 felett az amidnitrogének belépnek a koordinációs szférába, ezt mutatja, hogy ~410 nm és ~485 nm-nél két ellentétes előjelű Cotton effektus jelenik meg, és a pH további emelésével növekszik az intenzitása. pH > 10 felett a CD görbék intenzitásában sincs változás, ebben a pH-tartományban a NiLH₃ összetételű részecske dominál. Az Ac-HGGGHGH-NH₂ ligandum Ni(II)-komplexeire jellemző CD görbék hasonló lefutásúak az előbb tárgyalt liganduméval. Az Ac-HAAHVH-NH₂ és Ac-HAAHGH-NH₂ Ni(II)-komplexeire jellemző Cotton effektus előjele pontosan ellentétes az előzőkkel, amelyet a 35. ábra mutat be. Az ellentétes lefutás a GXH szekvenciát tartalmazó ligandumok NiLH₃ komplexének CD spektrumában – a Cu(II)-komplexekhez hasonlóan – a glicin CD inaktivitásából ered.

Összességében elmondható, hogy ezek a CD paraméterek összhangban vannak azzal a megállapítással, hogy amennyiben nikkell(II)ionnal 4N-es koordinációjú komplex alakul ki [N⁻, N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációs móddal, abban az esetben kisebb hullámhosszaknál negatív, míg nagyobb hullámhosszaknál pozitív Cotton effektus jelenik meg a spektrumban az XZH szekvenciát

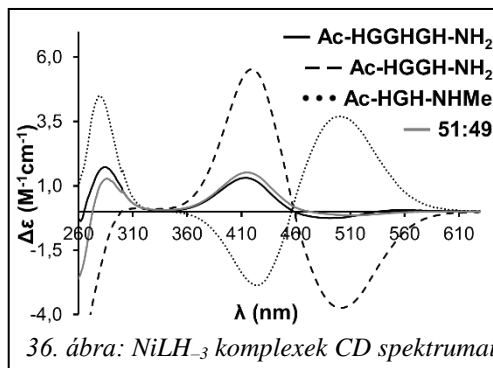


35. ábra: A vizsgált és modellpeptidek NiLH₃ komplexének CD spektruma

tartalmazó peptideknél (ahol X glicin és prolin kivételével bármilyen aminosav lehet). Korábban vizsgált hisztidintartalmú ligandumoknál is erre a következtetésre jutottak.^{98, 128} A 35. ábra ezen túlmenően jól szemlélteti a koordinációs izomerek jelenlétét a csak glicint tartalmazó peptidek esetén. Ezen az ábrán feltüntettem a kisebb tagszámú peptidek NiLH₃ komplexének CD spektrumát is, amelyet a koordinációs izomerek arányának megállapítására

használtam fel. A modell-ligandumok NiLH_3 komplexe CD spektrumának megfelelő arányú összegzésével lehetőség adódott a csak glicint tartalmazó ligandumok ugyanilyen összetételű koordinációs izomerei arányának számítására.

Pédaként mutatom be a 36. ábrán az Ac-HGGHGH-NH_2 és az Ac-HGGH-NH_2 és Ac-HGH-NHMe ligandumok NiLH_3 komplexének 51:49 arányú összegzésével kapott CD spektrumát, vagyis a kétféle koordinációs izomer közel egyenlő arányban van jelen. A megfelelő CD spektrumok hasonló összegzéséből kapott eredmények alapján az állapítható meg, hogy az Ac-HAAHVH-NH_2 ligandumnál a nikkell(II)ion a HAAH részhez koordinálódik, a közbenső hisztidin



36. ábra: NiLH_3 komplexek CD spektrumai

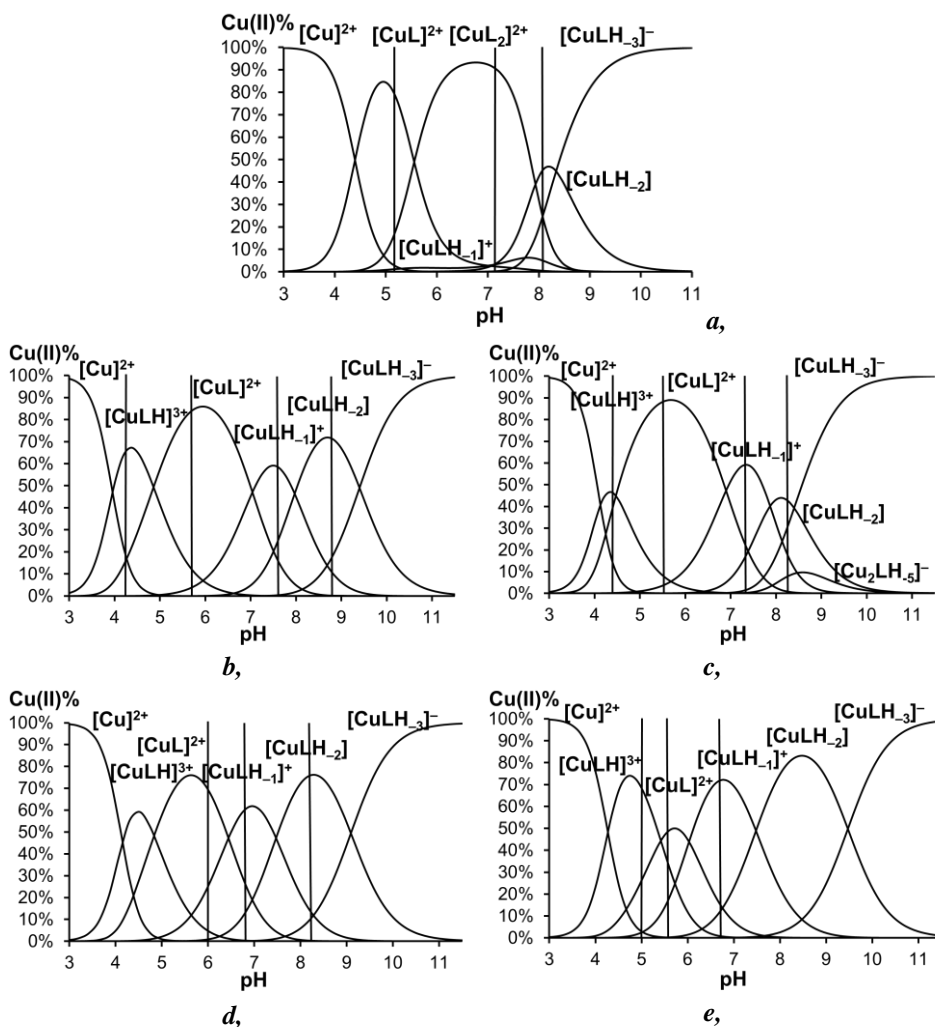
a horgonydonor. Az Ac-HAAHGH-NH_2 -nél a fémion teljes mennyisége a HGH részhez kötődik és a C-terminális végen található hisztidin a horgonycsoport. A csak glicint tartalmazó peptideknél a közbenső és C-terminális hisztidin ~50:50%-ban vesz részt a Ni(II) -ion megkötésében. Ezzel egy trendet is meg tudunk állapítani az oldalláncok fémionmegkötésének befolyásoló hatásáról. Abban az esetben ha a hisztidinek mellett csak glicint tartalmaz a ligandum, akkor mindkét kötőhely kedvező a fémion megkötése szempontjából, nincs preferencia egyik felé sem. Minél nagyobb térkitöltésű csoportot tartalmaz a ligandum az adott horgonycsoportként viselkedő hisztidin előtt a szekvenciában, annál kisebb a valószínűsége a fémion kötődésének ahhoz a kötőhelyhez. Az oldallánc változtatásával szabályozhatóvá válik a Ni(II) -ion kedvezményezettsége az egyes kötőhelyek felé a peptidekben.

4.3. A Cu,Zn-SOD enzimet modellező peptidek Cu(II) -komplexeinek redoxi sajátságai

Az oldategyensúlyi és spektroszkópiás vizsgálatokból a multihisztidin peptidek Cu(II) -komplexeinek stabilitását és szerkezetét adtuk meg, aminek eredménye azt mutatta, hogy az oldatban kialakuló komplexek a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumának megfelelő szerkezeti modelljei lehetnek. Ennek ismeretében meghatároztuk a több hisztidint tartalmazó ligandumok Cu(II) -komplexeinek redoxi paramétereit. A ciklikus voltammogramról leolvasott paramétereiből számított redoxipotenciál értékek információt adhatnak ezen Cu(II) -komplexe várható SOD aktivitásáról.

Korábban a kutatócsoportunkban már tanulmányoztak hisztidintartalmú ligandumok Cu(II) -ionnal alkotott komplexeinek redoxi sajátságait.¹²⁶ Ennek

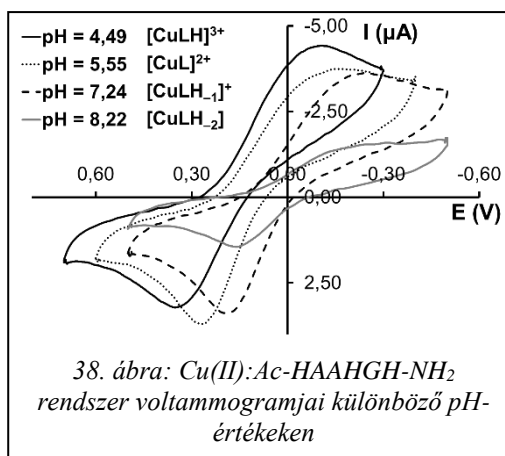
során módszert fejlesztettek ki a kistérfogatú cellában történő mérésre, és meghatározták az optimális körülményeket (fémion-ligandum arány, minta térfogat). Így a vizsgálataink során a korábbi eredmények alapján kialakított technikát alkalmaztuk. A redoxipotenciálok meghatározása előtt a szabad ligandumokat is vizsgáltuk a választott feszültségtartományban. Minden esetben azt tapasztaltuk, hogy nem kapunk sem anódos sem katódos csúcsot, ami arra utal, hogy ezek a peptidok nem redukálódnak és nem oxidálódnak a választott feszültségtartományban. A komplexek mérése előtt, először az eloszlási ábrákat (37. ábra) készítettük el, Cu(II)-ligandum 1:8 arányra, hogy megnézzük mely pH-kon érdemes a mérést végezni. Ligandumfelesleget azért kell alkalmazni, hogy értékelhető voltammogramokat kapjunk.



37. ábra: Cu(II):ligandum=1:8 rendszerben (a, Ac-HAAH-NH₂, b, Ac-HAAHVH-NH₂, c, Ac-HAAHGH-NH₂, d, Ac-HGGHGH-NH₂, e, Ac-HGGGGHGH-NH₂) képződő komplexek eloszlási görbéi a pH függvényében (c_{Cu(II)} = 1·10⁻³ mol/dm³, c_L = 8·10⁻³ mol/dm³)

Az eloszlási ábrákon bejelöltem azokat a pH-kat, amelyen a mérések készültek. Olyan pH-értékeket igyekeztünk beállítani, hogy egy adott komplex legyen túlnyomó többségben jelen az oldatban. pH 5-8 közötti tartományban tanulmányoztuk a vizes oldatokban képződő Cu(II)-komplexeket. Korábban a hisztidintartalmú ligandumok vizsgálata során a CuL, illetve CuL₂ összetételű komplexek vizsgálatára helyezték a hangsúlyt, mivel ezek szerkezete hasonlít a legjobban a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumára. Mi kiterjesztettük a vizsgálatainkat a koordinációs szférában az imidazolnitrogén mellett amidnitrogént is tartalmazó komplexekre is. Kíváncsiak voltunk arra, hogy meghatározható-e azoknak a komplexeknek a redoxi paraméterei, és ha igen, akkor azok milyen feszültségtartományba esnek. A 38. ábrán Cu(II):Ac-HAAHGH-NH₂=1:8 arányú oldatának különböző pH-értéken felvett CV görbéi láthatóak. A 38. ábra egyrészt jól szemlélteti azt, hogy a képződő CuLH₁ és CuLH₂ összetételű részecskék voltammogramjait is tudtuk rögzíteni, másrészt hogy deprotonálódás hatására, vagyis az amidnitrogének számának növekedésével a redoxipotenciál értéke csökken. A különböző Cu(II)-ligandum rendszerekben mért ciklikus voltammogramokat a CACYVO programmal kiértékelve

a 14. táblázatban lévő eredményekhez jutottunk. A kapott formálpotenciál értékek (14. táblázatban a kiemelt oszlop) a két és három imidazol-koordinációjú komplexekben eltérést mutatnak, ahol három imidazolnitrogén van a koordinációs szférában – három hisztidint tartalmazó ligandumnál –, ott kisebb értéket mértünk. Ez összhangban van azzal, hogy [2 N(Im)] koordinációs módú komplex stabilitási állandója kisebb, mint a [3 N(Im)] koordinációjú CuL komplexé. A mérési eredményekből az is megállapítható, hogy a két csúcs közötti különbség nagyobb, mint a 0,059 V elméleti érték. A Cu(II)-komplexekre általában az elméletitől eltérő, nagyobb érték a jellemző, az irodalomban elfogadott érték 180 mV körülnek tekinthető. A nagy csúcsávolságok oka lehet az, hogy az elektród felületén lassú elektrontranszfer folyamat játszódik le. Egy nagyobb komplexmolekula diffúziója az elektród felületéhez valószínűleg sokkal lassabb, mint egy kisebb részecskéé, illetve a réz(II)ion koordinációjakor létrejövő komplexnek a geometriáját a redukció folyamata során nehezebb megváltoztatni. A geometriaváltás nehézsége abból adódik, hogy a Cu(II)-komplexek általában tetragonálisan torzult oktaéderes elrendeződésűek, míg a Cu(I)-komplexek torzult



a 14. táblázatban lévő eredményekhez jutottunk. A kapott formálpotenciál értékek (14. táblázatban a kiemelt oszlop) a két és három imidazol-koordinációjú komplexekben eltérést mutatnak, ahol három imidazolnitrogén van a koordinációs szférában – három hisztidint tartalmazó ligandumnál –, ott kisebb értéket mértünk. Ez összhangban van azzal, hogy [2 N(Im)] koordinációs módú komplex stabilitási állandója kisebb, mint a [3 N(Im)] koordinációjú CuL komplexé. A mérési eredményekből az is megállapítható, hogy a két csúcs közötti különbség nagyobb, mint a 0,059 V elméleti érték. A Cu(II)-komplexekre általában az elméletitől eltérő, nagyobb érték a jellemző, az irodalomban elfogadott érték 180 mV körülnek tekinthető. A nagy csúcsávolságok oka lehet az, hogy az elektród felületén lassú elektrontranszfer folyamat játszódik le. Egy nagyobb komplexmolekula diffúziója az elektród felületéhez valószínűleg sokkal lassabb, mint egy kisebb részecskéé, illetve a réz(II)ion koordinációjakor létrejövő komplexnek a geometriáját a redukció folyamata során nehezebb megváltoztatni. A geometriaváltás nehézsége abból adódik, hogy a Cu(II)-komplexek általában tetragonálisan torzult oktaéderes elrendeződésűek, míg a Cu(I)-komplexek torzult

tetraéder, lineáris vagy síkháromszöges szerkezetűek lehetnek. A katódos és az anódos csúcsáramok aránya közel van az egyhez. A ΔE és az I_a/I_k paraméterek arra utalnak, hogy egyelektron-átmenettel járó, kvázireverzibilis folyamat játszódik le és $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)}$ átalakulás valósul meg. Az általunk kapott redoxipotenciál értékek jó egyezésben vannak a korábban vizsgált rendszerekben létrejövő komplexek Cu(II)/Cu(I) elektronátmeneteire jellemző értékekkel.¹³⁴⁻¹³⁶

14. táblázat: A Cu(II) : ligandum 1:8 arányú rendszerekben képződő Cu(II) -komplexek redoxi paraméterei

Ligandum	Komplex	pH	I_k (μA)	I_a (μA)	ΔE (V)	I_a/I_k	$E_{1/2}$ (V)	E° (V)
Ac-HAAH-NH ₂	CuL	5,16	-3,00	2,78	0,210	0,93	0,185	0,395
	CuL ₂	7,14	-2,97	2,59	0,245	0,87	0,113	0,323
	CuLH ₋₂	8,12	-1,62	1,98	0,325	1,22	0,039	0,249
Ac-HAAHVH-NH ₂	CuLH	4,24	-1,12	1,01	0,323	0,90	0,126	0,336
	CuL	5,69	-1,21	1,66	0,503	1,37	0,033	0,243
	CuLH ₋₁	7,61	-1,65	1,69	0,459	1,02	-0,051	0,160
	CuLH ₋₂	8,72	-1,17	1,07	0,491	0,91	-0,093	0,118
Ac-HAAHGH-NH ₂	CuLH	4,49	-4,41	3,16	0,437	0,72	0,119	0,329
	CuL	5,55	-3,74	3,69	0,414	0,99	0,054	0,264
	CuLH ₋₁	7,24	-3,62	3,38	0,428	0,93	-0,031	0,179
	CuLH ₋₂	8,22	-1,53	1,44	0,386	0,94	-0,042	0,168
Ac-HGGHGH-NH ₂	CuL	6,00	-2,85	2,79	0,268	0,98	0,075	0,285
	CuLH ₋₁	6,80	-2,79	2,64	0,268	0,95	0,025	0,235
	CuLH ₋₂	8,14	-1,56	1,67	0,278	1,07	-0,020	0,190
Ac-HGGHGH-NH ₂	CuLH	5,00	-3,25	3,38	0,274	1,04	0,154	0,364
	CuL	5,60	-3,36	3,19	0,269	0,95	0,116	0,326
	CuLH ₋₁	6,80	-3,27	2,56	0,339	0,78	0,041	0,251

A 15. táblázat az általunk mért és a korábban meghatározott CuL komplexek formálpotenciál értékeit tartalmazza, kiegészítve a komplexek stabilitási állandóival. Megállapítható, hogy a CuL komplexek stabilitási állandójának növekedésével a redoxipotenciál értéke csökken. Az általunk vizsgált rendszerekben képződő imidazol-koordinációjú komplexek beleillenek a korábban a CuL komplexek formálpotenciál értékeire meghatározott trendbe. Ezekre a rendszerekre is igaz az, hogy minél stabilisabb a keletkező komplex, annál nehezebben lehet azt redukálni, és a formálpotenciál érték annál kisebb. Ezt a feltételezést megerősítik a BIMA származékokra kapott elektrokémiai paraméterek is. Ezen ligandumok esetén kialakuló [4 N(Im)] koordinációjú komplexek stabilitása jóval nagyobb, mint egy négy hisztidint tartalmazó peptid CuL komplexének stabilitása. Ezzel párhuzamosan a BIMA származékok redoxipotenciál értékei is sokkal kisebbek (0 V körüliek), ami a merevebb szerkezetnek köszönhető. SOD modell szempontjából a CuL komplexek a meghatározóak, mert ezek szerkezete hasonlít a Cu,Zn-SOD enzim aktív

centrumához. ~250-350 mV tartományban van a formálpotenciál értékük és viszonylag könnyen redukálhatók. Ezek alapján jó SOD modellek lehetnek, mert az $O_2^{\cdot-}$ elbontásához szükséges potenciáltartományba esnek az értékek. Ugyanakkor az amidnitrogének koordinációjával kialakuló $CuLH_{-1}$, $CuLH_{-2}$ komplexek formálpotenciál értékei is pozitív tartományban vannak, ez abból adódhat, hogy ezekben is torzult geometria feltételezhető, aminek következtében a szuperoxid gyökönion bekötődése könnyebbé válik. Ez a pozitív redoxipotenciál érték figyelemre méltó, mert általában a $Cu(II)$ -peptid rendszerekben képződő, amidnitrogének koordinációjával kialakuló komplexekre jóval kisebb (negatív) redoxipotenciál értékek jellemzők.¹²⁶ Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy a komplexek valóban jó SOD modellek-e, nem elegendő a redoxipotenciál értékét ismerni, meg kell mérni a SOD aktivitást is. Így a következő célunk a $Cu(II)$ -ligandum rendszerekben képződő komplexek SOD aktivitásának meghatározása volt.

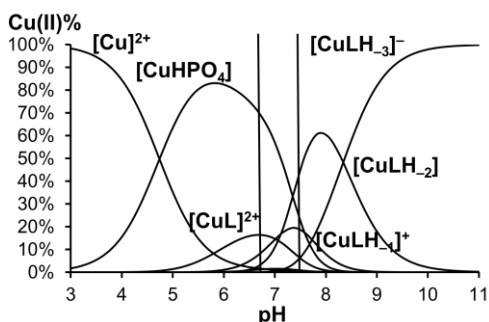
15. táblázat: A CuL komplexek $lg\beta$ és E° értékei

Ligandum	$lg\beta$	E° (V)
Ac-HVVH-NH ₂ ¹²⁶	5,79	0,389
Ac-HGGH-NH ₂ ¹²⁶	5,97	0,39
Ac-HAAH-NH₂	6,08	0,397
Ac-HHVGD-NH ₂ ¹²⁶	6,24	0,346
Ac-HGH-NHMe ¹²⁶	6,32	0,351
ciklo(GluGluHm) ¹³⁴	6,49	0,199
ciklo(AspAspHm) ¹³⁴	6,65	0,229
Ac-HHGH-NHMe ¹²⁶	7,22	0,313
Ac-HGGGHGH-NH₂	7,38	0,326
Ac-HVHGH-NH ₂ ¹²⁶	7,78	0,311
Ac-HAHPH-NH ₂ ¹²⁶	8,01	0,244
Ac-HAHVH-NH ₂ ¹²⁶	8,08	0,295
Ac-S2H3-NH ₂ ¹²⁶	8,14	0,293
Ac-HAAHVH-NH₂	8,17	0,265
Ac-HGGHGH-NH₂	8,22	0,276
Ac-HVHAH-NH ₂ ¹²⁶	8,42	0,253
Ac-HAAHGH-NH₂	8,57	0,276
Ac-S3H4-NH ₂ ¹²⁶	9,29	0,194

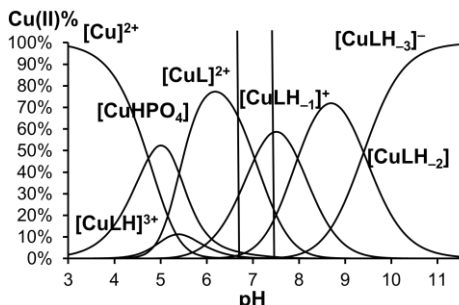
4.4. A Cu,Zn -SOD enzimet modellező peptidok $Cu(II)$ -komplexeinek SOD aktivitása

Az öt- és hattagú peptidok $Cu(II)$ -komplexeinek SOD aktivitását határoztuk meg, 6,8- és 7,4-es pH-n. A vizsgált ligandumok az Ac-HAAHVH-NH₂, Ac-HAAHGH-NH₂, Ac-HGGHGH-NH₂, Ac-HGGGHGH-NH₂. Minden esetben 1:10 fémion-ligandum aránynál végeztük a mérést.

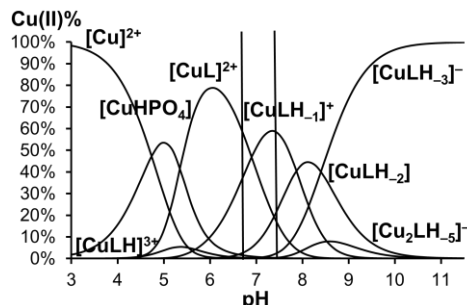
A SOD aktivitás mérését H_2PO_4^- - HPO_4^{2-} pufferben hajtottuk végre, amelyben a teljes foszfátion koncentráció jelentősen nagyobb a liganduménál, így a vizsgált oldatban nemcsak a peptidok Cu(II) -komplexeivel, hanem a CuHPO_4 komplexszel is számolni kell, és ennek következtében a komplexképződés nagyobb pH-kon következik be. A 39. ábrán látható a vizsgált ligandumok Cu(II) -ionnal alkotott komplexeinek eloszlása, amelyben a fémion-ligandum aránya 1:10, a rendszer foszfátiont ($c = 0,05 \text{ mol/dm}^3$) is tartalmaz és a réz(II)-ion koncentráció $\sim 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$, ami megegyezik a SOD aktivitás mérésénél alkalmazott koncentrációval.



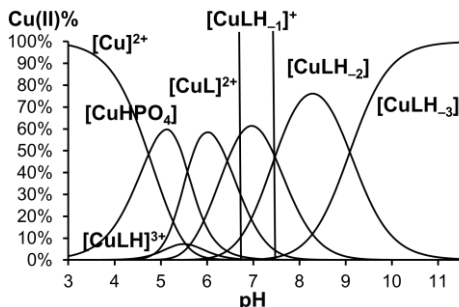
a, Ac-HAAH-NH₂



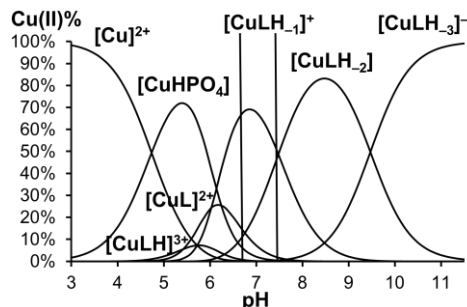
b, Ac-HAAHVH-NH₂



c, Ac-HAAHGH-NH₂



d, Ac-HGGHGH-NH₂

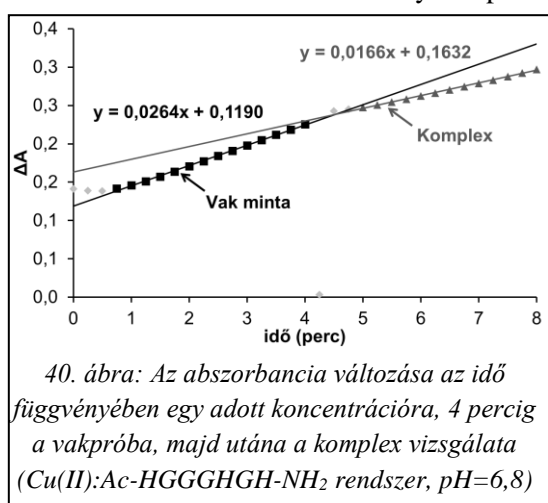


e, Ac-HGGHGH-NH₂

39. ábra: $\text{Cu(II)}:\text{ligandum}=1:10$ arányú rendszerekben képződő komplexek eloszlási görbéi a pH függvényében ($c_{\text{Cu(II)}} = 3 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$, $c_L = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$, $c_{\text{foszfát-ion}} = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$)

Az Ac-HAAH-NH₂ ligandum esetén a foszfát-ion nagy mennyisége miatt a CuHPO₄ részecske a meghatározó az oldatban, a Cu(II)-peptidkomplexek 6,8-s és 7,4-s pH-n is nagyon kis százalékban vannak jelen, ezért a SOD aktivitás mérését erre a rendszerre nem végeztük el. Az Ac-HXXHZH-NH₂ ligandumoknál pH ~ 6 körül a CuL jelentős mennyiségben van jelen az oldatban, pH > 6 felett a CuLH₋₁, CuLH₋₂ mennyisége egyre jelentősebb. pH 6,8-nál a CuL mellett a CuLH₋₁ míg pH 7,4-nél már a CuLH₋₂ is megjelenik, de a redoxipotenciálok alapján érdemes volt megmérni ezen a pH-n is a SOD aktivitást. Az Ac-HGGGHGH-NH₂ Cu(II)-ionnal alkotott CuL komplexének kisebb stabilitása miatt a komplex pH ~ 6 körül is kis mennyiségben van jelen, így 6,8-s pH-n a CuLH₋₁ és 7,4-s pH-n a CuLH₋₁, CuLH₋₂ komplexek SOD aktivitása mérhető. Így ezeknek a részecskének az aktivitását határoztuk meg az irodalomban is használt két pH-n.

A SOD-aktivitás mérése során az abszorbanciaváltozást nyolc perces időintervallumban vizsgáltuk, a teljes protokoll leírása a 3. Kísérleti körülmények és alkalmazott módszerek fejezet 7. pontjában található. Az első négy percben a vak minta abszorbanciaváltozását mutatja a 40. ábrán a fekete négyzetekre fektetett egyenes. Ugyanezen az ábrán a következő négy perchez rendelhető a komplex abszorbanciaváltozása, ami a szürke háromszögekre fektetett egyenes, és látható, hogy eltér a vak minta meredekségétől. Az egyes egyenesek



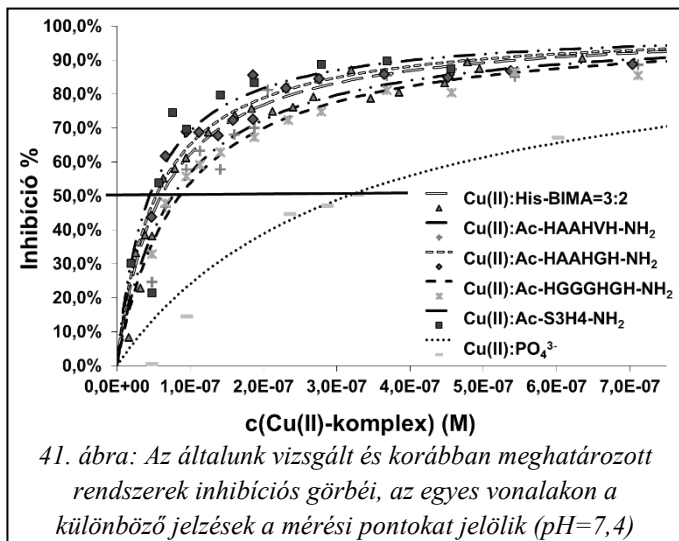
40. ábra: Az abszorbancia változása az idő függvényében egy adott koncentrációra, 4 percig a vakpróba, majd utána a komplex vizsgálata (Cu(II):Ac-HGGGHGH-NH₂ rendszer, pH=6,8)

meredeksége rendre $\frac{\Delta A_{\text{vak}}}{t}$, $\frac{\Delta A_{\text{komplex}}}{t}$. Ezeket az értékeket behelyettesítve az inhibíciós egyenletbe (25. egyenlet), kiszámítható az egyes Cu(II)-komplex koncentrációkhoz tartozó inhibíció.

Ezeket az értéket a Cu(II)-komplexek koncentrációjának függvényében ábrázolva a 41. ábrán látható inhibíciós görbékhez jutunk. A telítési görbék jól szemléltetik az eltérő inhibíciós értékeket a Cu(II)-His-BIMA 3:2 arányú, a Cu(II)-HPO₄²⁻ és a Cu(II)-peptid 1:10 arányú rendszerekben kialakuló komplexek között. Az általunk vizsgált Cu(II)-komplexek IC₅₀ értéke hasonló az imidazolátohidias komplex SOD aktivitásához és a CuHPO₄ komplextől jóval nagyobb aktivitást mutatnak.

Más kutatócsoportokban vizsgált Cu(II)-komplexek IC₅₀ értékét nehéz összehasonlítani a saját mérési eredményeinkkel, mert ugyanarra a rendszerre

kapott különböző módszerekkel meghatározott SOD-aktivitás adatok eltérőek lehetnek. Ha a Cu,Zn-SOD enzimet vesszük példaként, abban az esetben is az irodalmi IC₅₀ értékek 0,001-0,4 μM tartományban mozognak mérési körülménytől



41. ábra: Az általunk vizsgált és korábban meghatározott rendszerek inhibíciós görbéi, az egyes vonalakon a különböző jelzések a mérési pontokat jelölik (pH=7,4)

függően.^{101, 147, 151, 193, 199-201} Ezért a jobb összehasonlíthatóság érdekében relatív aktivitás értékeket számoltunk a 27. egyenlet segítségével.

Az általunk meghatározott inhibíció és relatív aktivitás értékeket kiemelve a 16. a, b táblázatban tüntettem fel, és ezek mellett szerepel néhány irodalmi adat is.

16. a táblázat: Az általunk vizsgált Cu(II)-komplexek SOD aktivitása, néhány irodalmi adattal kiegészítve (pH 6,8)

Komplex	IC ₅₀ (μM)	Relatív aktivitás (%)	Részecskék	Koordinációs mód
Cu,Zn-SOD ¹²⁷	0,0028	100	-	-
Cu(II)-HPO₄²⁻ ¹²⁷	0,30	0,92	-	-
Cu(II)-Ac-HAAHVH-NH₂	0,10	2,76	CuL	3 N(Im)
Cu(II)-Ac-HAAHGH-NH₂	0,072	3,91		
Cu(II)-Ac-HGGHGH-NH₂	0,31	0,89	CuLH ₋₁	2 N(Im), N ⁻
Cu(II)-Ac-HGGGHGH-NH₂	0,071	3,95		
Cu(II)-Ac-HGGH-NH ₂ ¹⁹⁷	0,27	1,11	CuL	2 N(Im)
Cu(II)-Ac-HVVH-NH ₂ ¹⁹⁷	0,20	1,50	CuL	2 N(Im)
Cu(II)-Ac-S1H2-NH ₂ ¹⁹⁷	0,21	1,43	CuL CuLH ₋₁	2 N(Im) 2 N(Im), N ⁻
Cu(II)-Ac-HHGH-NH ₂ ¹⁹⁷	0,17	1,76	CuL CuLH ₋₁	3 N(Im) 2 N(Im), N ⁻
Cu(II)-Ac-HAHPH-NH ₂ ¹⁹⁷	0,12	2,50	CuL CuLH ₋₁	3 N(Im) N(Im), N ⁻
Cu(II)-Ac-S2H3-NH ₂ ¹⁹⁷	0,24	1,25	CuL CuLH ₋₁	3 N(Im)
Cu(II)-Ac-S3H4-NH ₂ ¹⁹⁷	0,11	2,73	CuL	4 N(Im)
Cu(II)-β-Ala-BIMA ¹²⁷	0,12	2,39	CuL ₂	4 N(Im)
Cu(II)-Gly-BIMA ¹²⁷	0,27	1,04	Cu ₂ L ₂ H ₋₂ ; CuL ₂	2N(Im), N ⁻ , NH ₂ 3N(Im), N ⁻ , NH ₂
Cu(II)-Ac-HHGH-OH ¹⁰⁶	0,13	3,46	CuL	3N(Im)

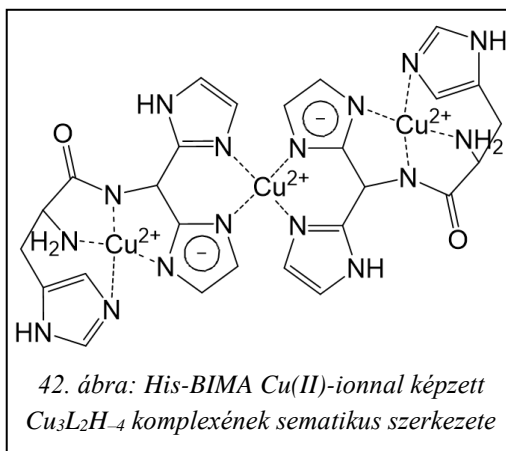
16. b táblázat: Az általunk vizsgált Cu(II)-komplexek SOD aktivitása, néhány irodalmi adattal kiegészítve (pH 7,4)

Komplex	IC ₅₀ (μ M)	Relatív aktivitás (%)	Részecskék	Koordinációs mód
Cu,Zn-SOD ¹²⁷	0,0044	100	-	-
Cu(II)-HPO₄²⁻ ¹²⁷	0,34	1,30	-	-
Cu(II)-Ac-HAAHVH-NH₂	0,077	5,69	CuL CuLH ₋₁ CuLH ₋₂	3 N(Im) 2N(Im), N ⁻ 2 N(Im), 2N ⁻
Cu(II)-Ac-HAAHGH-NH₂	0,048	9,16		
Cu(II)-Ac-HGGGHGH-NH₂	0,082	5,34		
Cu(II)-His-BIMA (3:2) ¹²⁷	0,070	6,27	Cu ₃ L ₂ H ₋₄	4N(Im) + imidazolátóhid- hid
Cu(II)-His-BIMA ¹²⁷	0,64	0,69	Cu ₂ L ₂ H ₋₂ , CuL ₂ , CuL ₂ H ₋₁	2N(Im), N ⁻ , NH ₂
Cu(II)-Gly-BIMA ¹²⁷	4,2	0,10	CuLH; Cu ₂ L ₂ H ₋₂	2N(Im) 2N(Im), N ⁻ , NH ₂
Cu(II)-Ac-S3H4-NH ₂ ¹⁹⁷	0,046	9,56	CuL	4N(Im)
Cu(II)-Ac-HPHH-NH ₂ 1-1 ¹⁰⁸	0,26	3,23	CuLH ₋₁	N ⁻ , 2N(Im)
Cu(II)-Ac-HGGH-NH ₂ ¹⁹⁷	0,38	1,16	CuLH ₋₂ ; CuLH ₋₃	2N(Im), 2N ⁻ N(Im), 3N ⁻
Cu(II)-Ac-HVVH-NH ₂ ¹⁹⁷	0,63	0,70	CuL	2 N(Im)
Cu(II)-Ac-S2H3-NH ₂ ¹⁹⁷	0,15	2,93	CuL ₂ H	3 N(Im)
Cu(II)-Ac-HVH-NH ₂ ⁹⁸	0,16	0,70	CuLH ₋₂	2N(Im), 2N ⁻
Cu(II)-HVH 1-1 ⁹⁸	0,20	0,60	CuLH ₋₁ ; CuLH ₋₂	2N(Im), N ⁻ , NH ₂

Az imidazol-koordinációjú CuL komplex – mely potenciális SOD modell – mellett kis mennyiségben megjelenik a CuLH₋₁ összetételű komplex is pH 6,8 értéken, így az aktivitáshoz ez is hozzájárul. A különbség az egyes ligandumoknál a komplexek koncentrációjában mutatkozik meg. Az Ac-HAAHVH-NH₂, Ac-HAAHGH-NH₂ ligandumoknál nagyobb mennyiségben van jelen a CuL, mint a CuLH₋₁. Az Ac-HGGGHGH-NH₂-nél ez az arány megfordul és a CuLH₋₁ részecske lesz a domináns. Az aktivitás értékek közül ebben a rendszerben mutatkozik nagyobb aktivitás a többihez képest. Az Ac-HGGGHGH-NH₂ Cu(II)-komplexeire kapott relatív aktivitás a másik három peptidhez képest kisebb. Összességében az megállapítható, hogy azoknál a ligandumoknál, ahol számottevő mennyiségben van jelen az egy amidnitrogénes koordinációjú komplex a CuL mellett, abban az esetben nagyobb aktivitás mérhető. Meg kell azonban jegyezni, hogy hasonló aktivitást mutatnak az irodalomban leírtakkal, kiugró értéket egyik esetben sem határoztunk meg. 7,4-s pH-n a CuL, CuLH₋₁ mellett a CuLH₋₂ is megjelenik, így az aktivitás ezekhez a részecskékhez rendelhető. Az eredmények azt mutatják, hogy a három hisztidint tartalmazó ligandumok egy és két

amidnitrogén koordinációs módú részecskéinek jelenléte nemhogy csökkentené, hanem növeli a SOD-aktivitás értékét. Erre magyarázatként szolgálhat az, hogy ezekben a komplexekben feltételezhető az N-terminális végen található hisztidin imidazolnitrogénjének axiális koordinációja, azaz a kialakuló részecskék torzult szerkezetűek, így ezekhez is képes

kötődni a szuperoxid gyökánion. pH 7,4-en az Ac-S3H4-NH₂ kiugróan nagy aktivitását azzal magyarázták, hogy a réz(II)ion négy imidazolnitrogénen keresztül kötődik a komplexben. Ez a koordinációs mód kedvező, mert a gyengébb ekvatoriális térnek köszönhetően a fémcentrum jobban hozzáférhetővé válik a szuperoxid gyökánion számára.¹⁰¹ A His-



BIMA Cu(II)-ionnal képzett Cu₃L₂H₋₄ komplexe szintén a korábbi eredményektől eltérően nagyobb aktivitást mutat. Ebben a részecskében imidazolátóhid van jelen (42. ábra), ami a természetes enzimben is megtalálható. Ez az eredmény azt támasztja alá, hogy valóban van összefüggés a komplex szerkezete és enzimutánozó aktivitása között. 7,4-s pH-n az általunk vizsgált hat- és héttagú peptidok Cu(II)-komplexei más peptidok IC₅₀ értékénél jelentősebb aktivitást mutatnak, viszont hasonló aktivitást mutatnak a Cu(II)-His-BIMA 3:2 arányú rendszerben keletkező imidazolátóhidas komplex és a korábban meghatározott Cu(II)-Ac-S3H4-NH₂ rendszerben képződő CuL IC₅₀ értékével (16. b táblázat).

Összességében megállapítható, hogy pH 6,8-nál a Cu(II)-komplexek nem mutatnak kiugró aktivitást. Ezzel ellentétben pH 7,4-nél, ahol a keletkező komplexekben az amidnitrogén is részt vesz a koordinációban jelentősebb SOD aktivitást kaptunk. Ez összhangban van azzal a tapasztalattal, hogy a komplexekre jellemző redoxipotenciál értékek a pozitív tartományba esnek. Feltételezhető, hogy az amidnitrogének részvételével kialakuló komplexekben a láncközi imidazolnitrogén koordinációja a komplex geometriájának torzulását eredményezi, és az N-terminális hisztidin imidazolnitrogénjének axiális irányú koordinációja csökkenti a komplex merev szerkezetét. Ezzel növeli a Cu(II)-komplexek redukálhatóságát (megfelelő környezetet kialakítva a Cu(I)-ionok számára), illetve a O₂⁻ kötődésének lehetőségét a fémcentrumhoz.

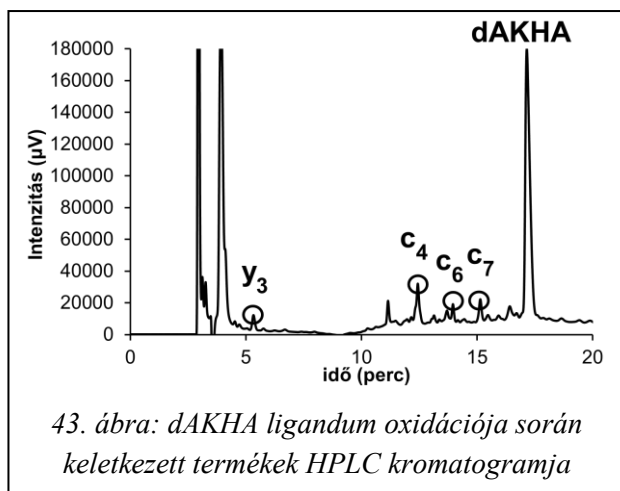
Ezek az eredmények is azt mutatják, hogy olyan Cu(II)-komplexek lehetnek alkalmasak a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumának modellezésére, amelyek torzult geometriával és kevésbé merev szerkezettel rendelkeznek. A komplexben az imidazolátóhid jelenléte is növeli az aktivitás értékét. Továbbá a komplexek

redoxipotenciál értékeinek pozitív tartományban kell lenniük. A ligandumokat tekintve azok lehetnek potenciális SOD-modellek, amelyek hosszabb láncú peptidek és több hisztidint különböző pozícióban tartalmaznak, illetve szekvenciájukban hidrogénkötés kialakítására alkalmas oldalláncok vannak.

4.5. A humán prion fehérje fragmensének és mutánsainak oxidációs vizsgálata

A munka folytatásaként azt néztük meg, hogy Cu(II)/H₂O₂ hozzáadásával mi történik az egy hisztidint tartalmazó ligandumokkal. A választott peptidekben oxidációra hajlamos aminosavak vannak, ilyen a hisztidin és a metionin. A vizsgálat célja az volt, hogy modellezzük az élő szervezetben lejátszódó oxidációs folyamatokat. A továbbiakban szeretném ismertetni az öt ligandummal végzett oxidációs kísérletek eredményét.

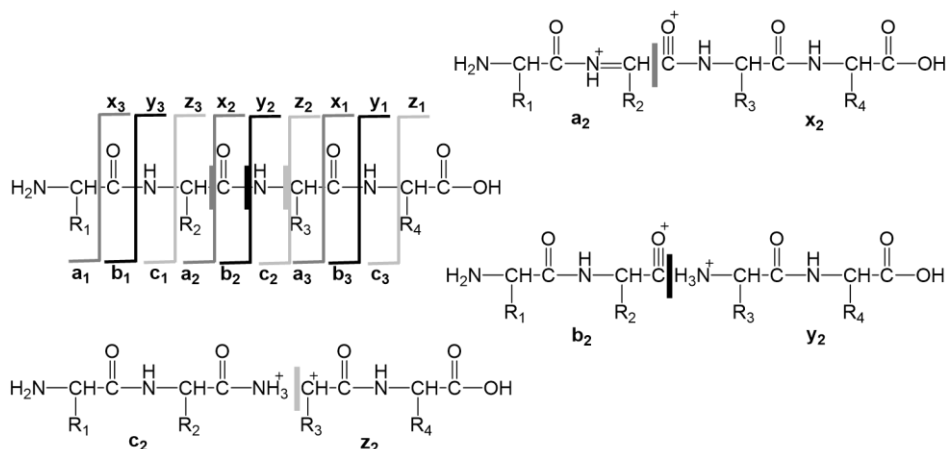
Az első vizsgált emberi prion mutáns a dAKHA (13. ábra) volt. Az oxidáció során több termék is keletkezett, amit a 43. ábra szemléltet. A kromatogramon a



hoididőnél jelentkező két nagy intenzitású csúcs a Na₂EDTA-hoz rendelhető, kb. 17 perc retenciós időnél megjelenik a ligandum, a kettő közötti időintervallumban látható kisebb intenzitású csúcsok az oxidált termékek. Ezeket próbáltuk LC-MS-sel azonosítani, de túl kicsi volt a jelek

intenzitása. Így a vizsgálatokat megismételtük nagyobb mennyiségű ligandummal, ahol a termékeket elválasztottuk félpreparatív HPLC-n, így az egyes csúcsoknál gyűjtött frakciókat vizsgáltuk külön-külön MS és tandem MS segítségével. Az MS az oxidáció során keletkező termék pontos tömegét adja meg, míg az előbb említett részecskének a fragmentációs spektrumából annak összetételére/aminosav szekvenciájára kapunk választ.

Az öt gyűjtött frakcióból négy fragmenst sikerült azonosítani. Az oxidáció során a peptidlánc hasadása következett be, ahol az azonosított fragmensek a következők: Y₃, C₄, C₆, C₇. Ezek a jelölések a peptidek fragmentálódása során keletkező termékeket jelentik, amit a 44. ábra mutat be egy tetrapeptid példáján keresztül.

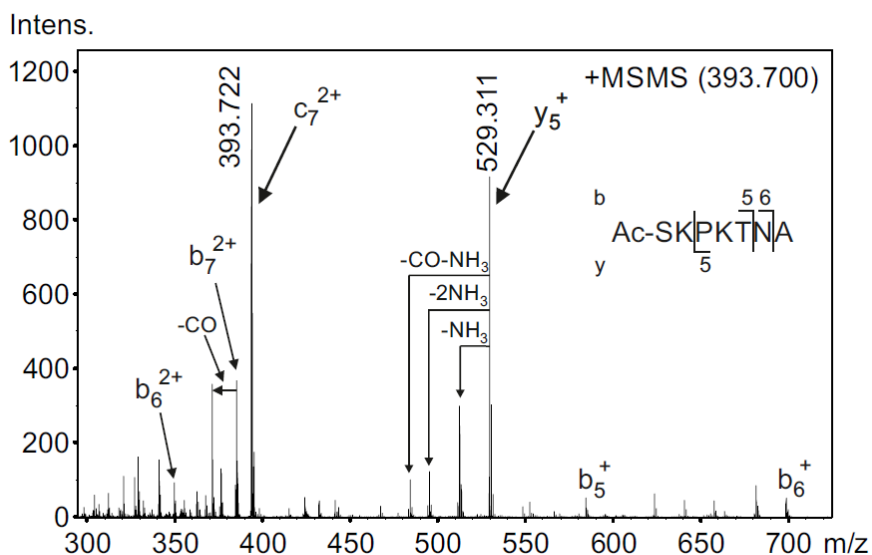


44. ábra: A peptidok fragmentálódása során keletkező termékek és azok jelölése

Az általunk vizsgált peptid az α -amidálási útvonalon hasad és a lánc oxidációja a következő aminosavak között megy végbe: a Lys4 és Thr5, Asn6 és Ala7 illetve Ala7 és Lys8.

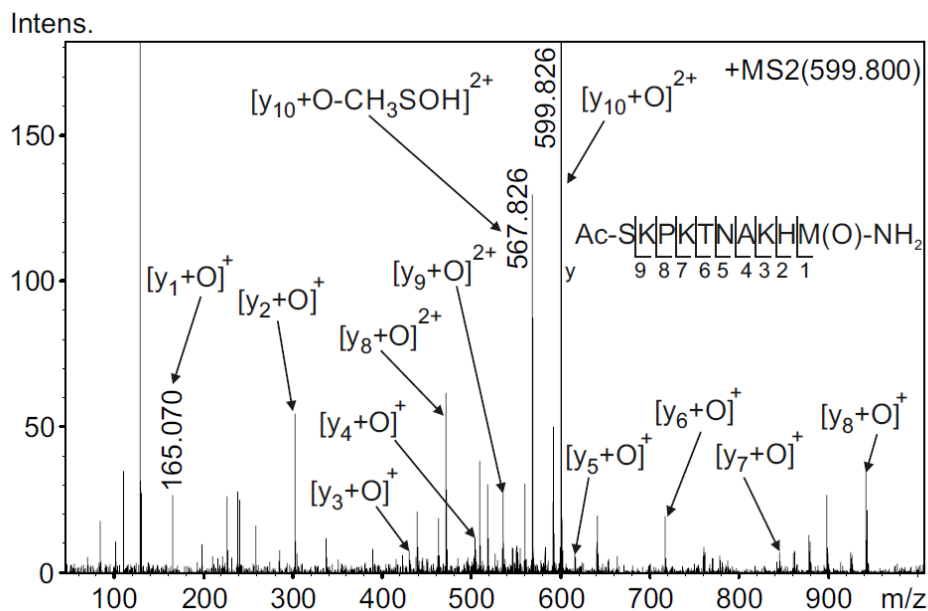
A 45. ábrán a C_7^{2+} ion MS/MS spektruma látható, ami konkrét bizonyíték arra, hogy ez a termék keletkezik. A C_7^{2+} ion 393,722 m/z értéknél (számított: 393,727 m/z) jelenik meg kétszeres pozitív töltéssel, amely a kétszeresen protonált formához rendelhető. Mindegyik ligandumnál, minden azonosított ion töltése az MS körülmények során protonálódott fragmensekből ered. Az értékelés során több iont is sikerült azonosítani, amelyek azt bizonyítják, hogy az oxidáció során a C_7^{2+} ion keletkezett. A vizsgált termék MS körülmények között veszít egy ammónia molekulát, majd ezután folyamatosan hasadnak le róla az aminosavak a C-terminális vég felől. Találtunk egy olyan részecskét is, ahol az N terminális vég felől az Ac-SK lehasad és ez egy 529,311 m/z értékű (számított: 529,309 m/z) egyszeres töltésű molekulaiont eredményez, Y_5^+ ion keletkezik.

Az megállapítható, hogy ezen ligandum vizsgálata során a hisztidin oxidációja nem következett be, ehelyett a peptidlánc hasadt el több helyen, ezáltal több termék keletkezett, amelyeket MS és MS/MS segítségével tudtunk azonosítani.

45. ábra: A C_7^{2+} ion fragmentációja

A következő két vizsgált mutáns a dMKHA és dAKHM volt, ezen ligandumok oxidációját együtt fogom ismertetni. Az oxidáció körülményeit itt sem változtattuk meg. A HPLC-vel történő vizsgálat során arra a következtetésre jutottunk, hogy csak egyetlen termék keletkezett. HPLC-vel a termékek számát tudjuk megadni, de arról nem ad információt, hogy melyik aminosav oxidációja megy végbe. A termék összetételének megállapítására szintén MS/MS vizsgálatokat végeztünk, erre példaként mutatom be a dAKHM+O MS/MS spektrumát, ami a 46. ábrán látható. Az 599,826 m/z értékű (számított: 599,822) kétszeres töltéssel rendelkező csúcs jelenti az $[y_{10}+O]^{2+}$ részecskét. Ennek az ionnak a fragmentációja az N-terminális vég felől kezdődik és az aminosavak fokozatosan hasadnak le a molekuláról, és a talált y fragmensek mindegyikén jelen van az oxigénatom. Az utolsó fragmens, $[y_1+O]^+$ – ami 165,070 m/z értéknél detektált (számított: 165,069 m/z) – bizonyítja azt, hogy a metioninhez kapcsolódik az oxigén, mert az $[y_1+O]^+$ gyakorlatilag az oxidált metionin. Továbbá találtunk olyan tömegvesztést is, ahol CH_3SOH összegképletű, 63,998 Da tömegű egység hasadt le az oxigéntartalmú részecskéről, pl. az 567,826 m/z értéknél megjelenő részecske az $[y_{10}+O-CH_3SOH]^{2+}$ összetétellel jellemezhető és a számított m/z érték (567,823) jó egyezésben van a mért adattal.

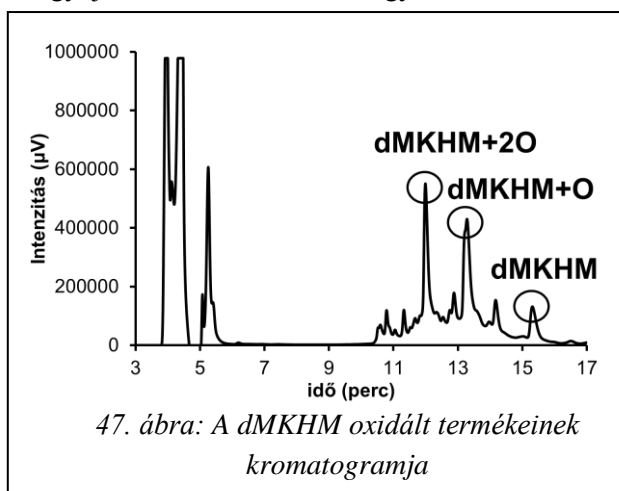
A dMKHA és dAKHM ligandumok moláris tömege megegyezik, egyedül a metioninok helyzetében van különbség. Ebből eredendően az oxidáció során keletkező egy oxigént tartalmazó termék tömege is ugyanannyi mindkét peptidnél. A dMKHA ligandum oxidációja során az $[y_{10}+O]^{2+}$ ion 599,824 m/z értéknél jelenik meg, ami a számított 599,822 m/z értékkel jó egyezésben van. Ezen ion fragmentációjának vizsgálata során azt állapítottuk meg, hogy a metionin oxidációja következett be. Az oxigénatomot tartalmazó fragmensek mellett a már említett 64 Da tömegű egység hasadása is kimutatható volt, ami az általunk meghatározott és más kutatócsoportok eredményei alapján is a metionin oxidációjára utal.²⁰² Továbbá olyan fragmenseket nem találtunk, amely a hisztidin oxidációját támasztaná alá. Azonosítottuk a 226,135 m/z értéknél megjelenő $[y_2]^+$ fragmenst (számított: 226,130), ami a hisztidint és alanint tartalmazza, hozzá kapcsolódó oxigénatomot ellenben nem.



46. ábra: dAKHM+O MS/MS spektruma

Az irodalomban leírtak alapján a fémion katalizált oxidáció oldallánc-specifikus folyamat és a fémion kötődési helyéhez közeli aminosavak oxidálódnak. Ennek megfelelően a koordinációs szféra közvetlen közelében lévő két metionin oxidálódott a vizsgált peptidekben.

A prion fehérje fragmense a dMKHM, ennek oxidációja során több termék is keletkezett, amit félpreparatív HPLC-vel választottunk el egymástól. Ezeket az összegyűjtött frakciókat MS-sel igyekeztünk azonosítani. A 47. ábrán láthatóak

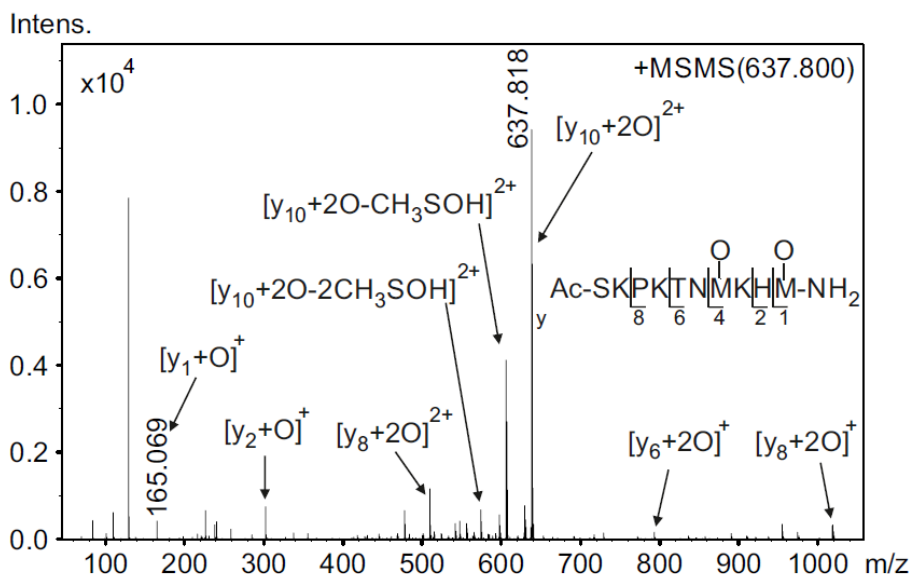


azok a csúcsok, amiket azonosítani tudtunk. Az oxidáció körülményeit mindegyik ligandumnál úgy állítottuk be, hogy ne menjen végbe teljesen az oxidáció, és a HPLC vizsgálat során a peptid csúcsát is lássuk. A 15 perces retenciós időnél jelenik meg a ligandum, a 12 perces retenciós időnél eluálódott az

oszlopról az a termék, ahol a peptiden két oxigén van jelen, 13 percnél az egy oxigéntartalmú származékot látjuk a kromatogramon. A tömegspektrometriás analízis után, MS/MS méréseket is végeztünk, annak érdekében, hogy megállapítsuk melyik aminosav oxidálódott a peptidben. A két oxigént tartalmazó részecske tandem MS spektrumából (48. ábra) arra a következtetésre jutottunk, hogy mindkét metioninból metionin-szulfoxid keletkezett.

A 637,818 m/z értékű csúcs (számított: 637,821 m/z) kétszeres töltéssel bír, ami abból ered, hogy MS körülmények között kétszeresen protonálódik a termék. Ezt az iont az $[Y_{10}+2O]^{2+}$ -ként neveztük el és két oxigénatommal többet tartalmaz, mint a ligandum. A fragmentáció során a két oxigéntartalmú ionból az aminosavak lehasadása az N-terminális vég felől kezdődik. A kiértékelés során a páros számú Y fragmenseket tudtuk azonosítani, az $[Y_4+O]^+$ ionig két oxigénatom van a részecskén, a szekvencia $[\text{MetLysHisMet-NH}_2+2O]^+$. Az y_2^+ ionon viszont már csak egy oxigénatom van, ez $[\text{HisMet-NH}_2+O]^+$ összetételnek felel meg. Korábban meghatározott eredmények azt mutatják, hogy a hisztidin is képes az oxidációra, nemcsak a metionin, így potenciálisan a metioninon vagy a hisztidinen lehetne az oxigénatom. Ennek egyik bizonyítéka, hogy csak a metionin oxidálódik a 165,069 m/z (számított: 165,069 m/z) értéknél megjelenő egyszeres pozitív töltésű csúcs, ami az oxidált metioninnak felel meg. Olyan fragmenst nem találtunk, ami csak a metionin tömegével egyezne meg, illetve nem találtunk olyan részecskét sem, ami a 2-oxo-hisztidin tömegének felelne meg, sem olyat ahol a molekuláról ilyen összetételű fragmens hasadna le. Az MS/MS spektrumból jól látszik, hogy a két

metionin-tartalmú ligandumnál csak metionin-szulfoxidok képződnek, a hisztidin nem oxidálódik és metionin-szulfon (11. ábra) sem alakul ki.



48. ábra: dMKHM+2O MS/MS spektruma

Az egy oxigéntartalmú származéknál azt állapítottuk meg, hogy a *Met109* és a **Met112** (a fragmenseket is ezekkel a jelölésekkel különböztetjük meg) is oxidálódik és mindkét metionin ugyanolyan mértékben oxidálódik. Az MS alapján egyértelműen egy oxigénatom van a termékben, ezt mutatja a 629,820 m/z értéknél megjelenő csúcs (számított: 629,824) és hasonlóan a korábbi vizsgálatokhoz ez a kétszeresen protonált formából ered. Itt is megjelenik olyan ion, ami egy CH₃SOH lehasadására vezethető vissza. Ez a 63,998 Da tömegű veszteség az oxidált metioninból származik. Ezt más kutatócsoport is tapasztalta, amikor metionintartalmú ligandumok oxidációjakor keletkező termékeket vizsgáltak MS körülmények között.²⁰² Találtunk olyan ionokat, ahol egyértelműen a *Met109* oxidálódott és vannak olyan csúcsok is, ahol a **Met112** oxidálódott. Ezekből példaként említenénk 2-2 iont. A *Met109* oxidációját egyértelműen alátámasztja a következő két ion: $[b_9+O]^{2+}$, 555,788 (számított: 555,790) m/z értékű csúcs, kétszeresen protonált pozitív töltésű részecske. Ez az ion tartalmaz egy oxigénatomot, de a C terminális végén lévő metionin már nincs jelen a molekulában, így ez azt mutatja, hogy a *Met109*-en van az oxigénatom. Ha az N-terminális vég felől lehasad nyolc aminosav, akkor kapjuk meg az y_2^+ egyszeres pozitív töltésű iont, ami 286,130 m/z értékű (számított: 286,134) és ez olyan részecske, ahol jelen van a **Met112**, de nincs rajta oxigénatom, ez is arra utal, hogy a *Met109* is oxidálódik. A következő két részecske azt demonstrálja, hogy az

oxigénatom a **Met112**-n van jelen. Az egyik ilyen ion, amely csak egy metionint tartalmaz (**Met112**) az $[y_2+O]^+$, az ehhez tartozó m/z érték 302,127 (számított: 302,129). A másik ion a 165,069 m/z -nél megjelenő (számított: 165,069) $[y_1+O]^+$, ez az ion azt is magába foglalja, hogy a hisztidinen ebben az esetben sem jelenik meg az oxigénatom.

A prion protein fragmensének és mutánsainak oxidációja során arra a következtetésre jutottunk, hogy ha a peptidben csak hisztidin van jelen, akkor a peptidlánc hasadása megy végbe, de a hisztidin oxidációja nem következik be. Ha van metionin is a szekvenciában, akkor annak az oxidációja játszódik le. Ezek a metioninok a fémion közvetlen közelében vannak és a vártnak megfelelően viselkednek.

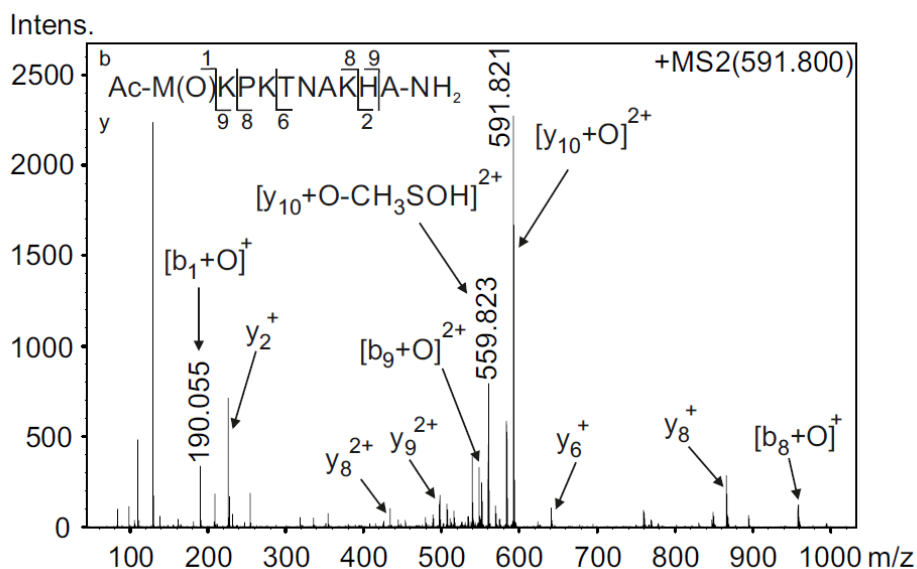
Ezen eredmények után azt is vizsgáltuk, hogy ha csak hidrogén-peroxiddal végezzük a vizsgálatot, akkor végbe megy-e egyáltalán az oxidáció. A csak hisztidintartalmú peptidnél nem történt változás hidrogén-peroxid hozzáadása után. A metionintartalmú ligandumokkal azonban más volt a helyzet. Ott végbement az oxidáció és ugyanazok a termékek keletkeztek, mint amikor Cu(II)-ion is jelen volt a rendszerben. A különbség csupán annyi volt, hogy réz(II)ion hiányában lassabban játszódtak le az oxidációs folyamatok. Ezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy esetünkben a Cu(II)-ionnak katalizáló szerepe van a reakció során.

Ezen eredmények ismeretében a következő kérdés az volt, hogy mi történik akkor, ha az oxidációra érzékeny metionint a koordinációs szférától távolabb helyezük el. Így egy újabb tíztagú ligandumot szintetizáltunk, amiben a metionin a lánc elején helyezkedik el, ennek a szekvenciája a következő: Ac-MKPKTNAKHA-NH₂ (dM1AKHA). A peptidet oxidálva az állapítható meg, hogy ebben az esetben is bekövetkezik a metionin oxidációja (49. ábra).

Az 591,821 m/z értéknél (számított: 591,824 m/z) megjelenő kétszeres pozitív töltésű csúcs hoz rendelhető az $[y_{10}+O]^{2+}$ részecske. Az MS/MS spektrumban több olyan csúcsot is találtunk, ami azt bizonyítja, hogy az oxigénatom valóban a metioninon van. Az oxigéntartalmú termék fragmentációja során ebben az esetben is CH₃SOH veszteséget találtunk, ez az oxidált metioninból ered. Olyan részecske keletkezett MS körülmények között, ahol még a ligandum fragmentációja nem ment végbe, de a fent említett összetételű részecske lehasadt a molekulából, ezt mi $[y_{10}+O-CH_3SOH]^{2+}$ -val jelöltünk, a spektrumban 559,823 m/z értéknél látható (számított: 559,825 m/z). A $[b_1+O]^+$ részecske is bizonyíték arra, hogy a metionin oxidálódott, mert az gyakorlatilag az N-acetilezett oxidált metionin (Ac-Met(O)), ez a fragmens 190,055 m/z értéknél (számított: 190,054) jelent meg. Ezenkívül a megtalált y fragmensek – kivéve az $[y_{10}+O]^+$ -t – már nem tartalmaztak

oxigénatomot, mert az a metioninnal együtt lehasadt a molekuláról. Minden talált részecske azt mutatja, hogy a metionin oxidációja ment végbe.

Így arra következtettünk, hogy a Cu(II)-ionnak katalizáló szerepe van a folyamatban, mert a kötőhelytől távol lévő metionin oxidálódik és nem a koordinációs szférában jelen lévő hisztidin. Ezek alapján a Cu(II)/H₂O₂ hatására lejátszódó oxidációs folyamat nem oldallánc-specifikus, így ezzel a vizsgálati módszerrel nem tudjuk azt igazolni, hogy a ligandum mely részéhez kötődik a fémion.



49. ábra: dMIAKHA+O MS/MS spektruma

Összességében viszont az eredményekből az derül ki, hogy a metionin igen érzékeny oxidációja miatt képes a peptidláncot megvédeni a hasadástól és ilyen körülmények között a szulfoxiddá történő átalakulása következik be, ami azt sejteti, hogy az élő szervezetben a prion betegség során felhalmozódó szabad gyökök jó eséllyel elsődlegesen a fehérjében lévő metionint oxidálják és valóban fontos szerepet játszik a betegség kialakulásában a fehérje fémionkatalizált oxidációja.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkám során olyan védett multihisztidin peptideket vizsgáltunk, amelyek réz(II)komplexei a Cu,Zn-szuperoxid diszmutáz enzim aktív centrumát modellezik. A munkám további részében a prion betegségekkel összefüggésbe hozható prion fehérje 103-112 fragmensének és mutánsainak Cu(II)-, Ni(II)-komplexeit és oxidációját tanulmányoztuk.

Célkitűzésünk volt több hisztidint tartalmazó N- és C-terminálison egyaránt védett peptidek, az Ac-HAAH-NH₂, Ac-HAAHVH-NH₂, Ac-HAAHGH-NH₂, Ac-HGGHGH-NH₂, Ac-HGGGHGH-NH₂ szintézise és Cu(II), Ni(II)-komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata pH-potenciometriával, UV-látható spektroszkópiával és CD spektroszkópiával. További célunk volt a szintetizált peptidek Cu(II)-komplexei redoxi paramétereinek és SOD aktivitásának meghatározása is.

Célunk volt továbbá a hisztidint és metionint is tartalmazó prion fragmens (dMKHM) és a mutánsainak – amelyekben vagy az egyik vagy mindkét metionint alaninra cseréltük – szintézise, oldategyensúlyi és oxidációs vizsgálata. A Cu(II)- és Ni(II)-komplexek stabilitásának, sztöchiometriájának, szerkezetének meghatározására a fentebb említett technikákat alkalmaztuk. Az oxidáció során keletkező termékek azonosítására HPLC-MS, MS/MS módszert használtunk.

Az öt tíztagú egy hisztidint tartalmazó peptid Cu(II)-ionnal képzett komplexei ugyanolyan összetételűek és hasonló stabilitásúak. Ugyanez mondható el a Ni(II)-komplexeiről is, de azok a Cu(II)-komplexekhez képest kisebb stabilitást mutatnak. A hisztidin a horgonycsoport mindkét fémion esetében és egymagvú komplexek képződnek ezekben a rendszerekben. Az egyetlen különbség a ligandumok Cu(II)-ionnal képzett [N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációs módú komplexeiknél volt. A 109-es pozícióban metionint tartalmazó ligandumoknál kimutatható volt a metionin tioéter kénatomjának kismértékű kölcsönhatása.

A vizsgált több hisztidint tartalmazó peptidek réz(II)ionok jelenlétében fiziológiás pH-tartományban az imidazolnitrogének koordinációjával CuL komplexeket alakítanak ki, valamint a tetrapeptid esetében CuL₂ biszkomplex is kialakul. A keletkező CuL komplexek nagy stabilitásúak és uralkodóak a gyengén savas pH-tartományban, de nem tudják megakadályozni az amidnitrogének deprotonálódását. A rendszerben CuLH₋₁, CuLH₋₂ és CuLH₋₃ összetételű komplexek keletkeznek. A hat- és héttagú peptidek esetében az egymagvú Cu(II)-komplexeiknél koordinációs izomerek vannak jelen az oldatban. A CuLH₋₂-ben a réz(II)ion koordinációja a HZH részen a domináns és ezekben a részecskékben [N(Im), N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációs mód valószínűsíthető kiegészítve az N-terminális hisztidin axiális kötődésével. A CuLH₋₃-ban az aminosav oldallánc térkitöltésétől függően a HXXH és HZH rész is lehet domináns. Az Ac-HAAHVH-NH₂-nél elsősorban a közbelső, míg az Ac-HGGGHGH-NH₂-nél a C-

terminális végen található hisztidin vesz részt a fémion megkötésében. Megállapítottuk, hogy a CuLH_{-2} és CuLH_{-3} komplexekben a fémion kötődésének aránya a C-terminális végen a következő sorrendben csökken: $\text{Ac-HGGGHGH-NH}_2 > \text{Ac-HGGHGHNH}_2 > \text{Ac-HAAHGH-NH}_2 > \text{Ac-HAAHVH-NH}_2$. Fémionfelesleget tartalmazó rendszerek esetén többmagvú komplexek is keletkeznek, melyek $\text{Cu}_2\text{LH}_{-4}$, $\text{Cu}_2\text{LH}_{-5}$ és $\text{Cu}_2\text{LH}_{-6}$ összetétellel jellemezhetők. A multihisztidin ligandumok csak egy ekvivalens Ni(II)-ion megkötésére képesek és a fő fémionkötőhely ebben az esetben is a hisztidin imidazolnitrogénje. A komplexképződés $\text{pH} > 5$ felett kezdődik, és az imidazolnitrogének részvételével NiL makrokelát szerkezetű komplex keletkezik. A Ni(II)-ion is, mint a Cu(II)-ion indukálja az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját, azzal a különbséggel, hogy ez a folyamat nikkell(II)ionnal egy lépésben és nagyobb pH-n játszódik le. A három hisztidint tartalmazó ligandumok NiLH₋₃ komplexeinél szintén lehetőség adódik koordinációs izomerek kialakulására az oldatban. Az Ac-HAAHVH-NH₂ ligandumnál a HAAH, az Ac-HAAHGH-NH₂ ligandumnál a HGH részhez kötődik a fémion a legnagyobb mennyiségben. A csak glicint tartalmazó peptideknél a fémion ~50:50 arányban oszlik meg a két kötőhely között. Általánosan elmondható, hogy ha nagyobb térkitöltésű csoportot tartalmaz a ligandum az adott horgonycsoportként viselkedő hisztidin előtt a szekvenciában, akkor kisebb a valószínűsége a fémion kötődésének ahhoz a kötőhelyhez. Az oldallánc változtatásával szabályozhatóvá válik a Ni(II)-ion kedvezményezettsége az egyes kötőhelyek felé a peptidekben.

A ciklikus voltammetriás vizsgálatok során megállapítottuk, hogy az oldatban kialakuló imidazol-koordinációjú komplexek redoxipotenciál értékei kisebbek, ha három imidazolnitrogén van a koordinációs szférában. Ez összhangban van azzal, hogy a stabilitási állandó növekedésével a formálpotenciál értéke csökken. Ugyanakkor az amidnitrogénes koordinációjú CuLH_{-1} és CuLH_{-2} komplexek redoxi paraméterei is meghatározhatók. Mind a CuL, CuLH_{-1} , CuLH_{-2} komplexekre jellemző formálpotenciál értékek a SOD aktivitáshoz szükséges potenciáltartomány közepén vannak. Ezek alapján jó SOD modellek lehetnek.

Az elektrokémiai vizsgálatokat követően meghatároztuk a redoxi szempontból ígéretesnek tűnő Cu(II)-komplexek SOD aktivitását. A pH 7,4-n kialakuló komplexek aktivitása hasonló a Cu(II)-His-BIMA rendszerben képződő imidazolátohidas komplex és a korábban meghatározott Ac-S3H4-NH₂ CuL relatív aktivitásával, viszont a Cu,Zn-SOD enzimhez képest egy nagyságrenddel kisebb. Ugyanakkor azt is megállapítottuk, hogy a SOD aktivitáshoz nemcsak az imidazol-koordinációjú komplexek, de az $[\text{N}(\text{Im}), \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$, illetve $[\text{N}(\text{Im}), \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$ koordinációjú komplexek is hozzájárulnak. Ezen komplexek torzult geometriája elősegíti a $\text{Cu}(\text{II}) + e^- \rightarrow \text{Cu}(\text{I})$ átalakulást, illetve a $\text{O}_2^{\cdot-}$ kötődését a fémcentrumhoz.

Az oxidáció során kapott eredményekből az derül ki, hogy a prion fehérje 103-112 fragmensének metionint nem tartalmazó mutánsánál (dAKHA) a peptidlánc hasadása megy végbe, és az irodalomban leírtakkal ellentétben nem keletkezett 2-oxo-hisztidin származék. A hisztidin mellett metionint is tartalmazó ligandumok oxidációs vizsgálatával azt bizonyítottuk, hogy a metionin igen érzékeny oxidációja miatt képes a peptidláncot megvédeni a hasadástól és ilyen körülmények között csak a reverzibilis szulfoxiddá történő átalakulása következik be. Ugyanakkor azt is megállapíthatjuk, hogy az élő szervezetben a prion betegség során felhalmozódó szabad gyökök jó eséllyel elsődlegesen a fehérjében lévő metionint oxidálják és valóban fontos szerepet játszhat a betegség alakulásában a fehérje fémionkatalizált oxidációja.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált multihisztidin ligandumok jó szerkezeti és funkcionális modellek kiindulópontjai lehetnek a Cu,Zn-SOD enzimnek. Másfelől a prion modellek oxidációs vizsgálata megfelelő információt nyújthat arról, hogy mi történik az élő szervezetben a prion betegség során. Ez támpontot adhat olyan biológiai kutatásokhoz, amelyek célja a neurodegeneratív betegségek kiváltó okának és lefolyásának felderítése.

6. SUMMARY

During the first part of my Ph.D. work I studied the Cu(II) complexes of various terminally protected multihistidine peptides which mimic the active site of Cu,Zn superoxide dismutase enzyme. In the second part of my work, we investigated the Cu(II) and Ni(II) complexes and oxidation of 103-112 prion protein fragment and its mutants related to prion diseases.

Our aim was the synthesis of protected peptides containing several histidyl residues, Ac-HAAH-NH₂, Ac-HAAHVH-NH₂, Ac-HAAHGH-NH₂, Ac-HGGHGH-NH₂, Ac-HGGGGHGH-NH₂ and the solution equilibrium studies of the Cu(II) and Ni(II) complexes of these ligands by potentiometric titration, UV-Vis and CD spectroscopy. Our other aim was the determination of the redox properties and SOD activity of the Cu(II) complexes of the synthesized ligands.

Additional aim was the investigation of human prion protein fragment and its mutants. The studied human prion fragment (dMKHM) contains both histidine and methionine residues, while methionine residues are systematically replaced or displaced in the studied mutants (dAKHA, dAKHM, dMKHA, dM1AKHA). The above mentioned techniques were applied to study the stoichiometry, stability and structure of the copper(II) and nickel(II) complexes, while we used HPLC-MS and MS/MS for identifying the products of copper(II) catalyzed oxidation.

The coordination chemistry of the five studied decapeptides containing one histidine residue is rather similar to each other including the stability and the coordination mode of the copper(II) and nickel(II) complexes. The histidine residue behaves as an anchor site and 1:1 complexes are formed in these systems. The only difference is that in the peptides, which contain Met109, in addition to the [N⁻, N⁻, N(Im)] coordination mode, a weak interaction of thioether sulfur atom can be supposed with copper(II) ion.

In the presence of copper(II) ions the multihistidine ligands form CuL complexes with the coordination of imidazole nitrogens in the physiological pH range and in the case of the tetrapeptide CuL₂ complex is formed as well. The stabilities of the CuL complexes are high and these species dominate in the slightly acidic range, but they cannot prevent the deprotonation of amide nitrogens so complexes with CuLH₋₁, CuLH₋₂ and CuLH₋₃ compositions are formed. In the case of hexa- and heptapeptides coordination isomers of CuLH₋₂ and CuLH₋₃ complexes can be formed. For the CuLH₋₂ species the metal ion binding on the C-termini is preferred, where the coordination of [N(Im), N⁻, N⁻, N(Im)] donor set and the weak axial coordination of the imidazole nitrogen of the N-terminal histidine can be supposed. Either HZH or HXXH sequence can be the primary metal binding site of CuLH₋₃, it depends on the steric effect of amino acid side chain. In the case of Ac-HAAHVH-NH₂ mainly the internal histidyl residue is the

anchoring group in contrast with of Ac-HGGGHGH-NH₂, with which the C-termini is preferred in the above mentioned complex. As a consequence the metal binding affinity of C-terminal HZH sequence of CuLH₂ and CuLH₃ complex follows the Ac-HGGGHGH-NH₂ > Ac-HGGGHGH-NH₂ > Ac-HAAHGH-NH₂ > Ac-HAAHVH-NH₂ order. Due to its structure, this peptide is able to bind more than one Cu(II) ion. In the presence of excess metal ion, Cu₂LH₄, Cu₂LH₅ and Cu₂LH₆ complexes are formed in the systems. In the case of multihistidine peptides we have stated that the imidazole nitrogen in the histidyl residue is the major binding sites for Ni(II) ions and only 1:1 complexes form at any metal:ligand ratios. In the case of Ni(II) ion the formation of macrochelates is characteristic above pH 5 which is followed by the deprotonation and coordination of amide nitrogen with increasing pH resulting in 4N complexes with [3N⁻,N(Im)] coordination mode. In the case of the hexa- and heptapeptides containing three histidyl residues coordination isomers of NiLH₃ complex are formed in the solution. For the NiLH₃ complex the coordination of metal ion to the C-terminal end of the Ac-HAAHGH-NH₂ ligand is preferred, while for NiLH₃ metal ion is bound mainly in the intermediate part of the Ac-HAAHVH-NH₂. The ratio of isomeric structure of NiLH₃ complex of glycine and histidine containing peptides: C-terminal coordinated complex: N-terminal coordinated complex ~ 50:50 %. In generally it can be said, the ligand contains larger side chain amino acid preceding the histidine (anchoring group) in the peptide sequence, the metal binding ability is less to this binding site. The preference of Ni(II) ion in the peptides can be regulated by changing side chain toward the one of metal binding sites.

Based on the cyclic voltammetric studies we concluded that the formal reduction potential values of imidazole nitrogen coordinated complexes are smaller, if three imidazole nitrogens are present in the coordination sphere. This is in agreement with the fact that the greater the stability of the complex is, the more negative reduction potential can be measured. However, redox parameters of CuLH₁ and CuLH₂ complexes containing amide nitrogen coordination can be determined as well. All formal potential values of CuL, CuLH₁, CuLH₂ complexes fall in the middle potential range of the SOD activity. Based on these data the Cu(II) complexes may be good SOD models.

As a continuation of our electrochemical experiments, we measured the SOD activity of the complexes that seemed to be promising SOD models from a redox point of view. SOD activity of Cu(II)-peptide complexes are similar to that of the imidazolato-bridged complex of His-BIMA and previously studied Cu(II) complexes (CuL of Ac-HisSarHisSarHisSarHis-NH₂) but compared to the native enzyme it is still one order of magnitude lower. The imidazole coordinated complex and the formation of [N(Im), N⁻, N(Im)], [N(Im), N⁻, N⁻, N(Im)] coordinated Cu(II) complexes too are contributed to the SOD activity. The amide

nitrogen coordinated complexes with slightly distorted geometry promotes the reduction reaction of $\text{Cu(II)} + e^- \rightarrow \text{Cu(I)}$ and the O_2^- binding to metal ion centre.

The studies of Cu(II) catalyzed oxidation of prion protein (103-112) fragment and its mutants reveal that the histidine residue behaves as an anchor site, and the $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})] / [\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$ coordination modes prevent the oxidation of this side chain. The mutant peptide, which does not contain methionine, did not undergo oxidation, only the fragmentation of the peptide chain is perceived. The cleavage of the peptide bonds occurred far away from the histidine residue. However, in the case of methionine containing peptides, the peptide chain was not cleaved; the presence of methionine residues protects the peptides from fragmentation. In these cases copper(II) ions catalyze the oxidation of methionine to methionine sulfoxide. This process occurs randomly, it does not depend on the position of the methionine; methionine residues undergo oxidation either involved in the coordination of the copper(II) ions, or near or far the binding sites. Our results revealed that methionine residues of prion protein can play a role as ROS scavenger. The oxidation of methionine residues in these short peptides containing only one histidine is able to protect the peptides from oxidation and degradation.

Summarizing our results we can say that these multihistidine ligands are good starting points for the planning of the Cu(II) complexes such molecules of which can be good structural and functional models of the SOD enzyme. On the other hand the investigation of oxidation of prion models can give good information of prion disease. These can provide valuable information for biological investigations aimed at determining the cause of neurodegenerative diseases.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. J. D. Crapo; T. Oury; C. Rabouille; J. W. Slot; L. Y. Chang „*Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells*” Proceedings of the National Academy of Sciences, **89**, 21, 10405-10409 (1992).
2. D. Barra; F. Martini; J. V. Bannister; M. E. Schininà; G. Rotilio; W. H. Bannister; F. Bossa „*The complete amino acid sequence of human Cu/Zn superoxide dismutase*” FEBS Letters, **120**, 1, 53-56 (1980).
3. J. A. Tainer; E. D. Getzoff; J. S. Richardson; D. C. Richardson „*Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase*” Nature, **306**, 5940, 284-287 (1983).
4. J. A. Tainer; E. D. Getzoff; K. M. Beem; J. S. Richardson; D. C. Richardson „*Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase*” J Mol Biol, **160**, 2, 181-217 (1982).
5. Y. Furukawa; I. Anzai; S. Akiyama; M. Imai; F. J. C. Cruz; T. Saio; K. Nagasawa; T. Nomura; K. Ishimori „*Conformational Disorder of the Most Immature Cu, Zn-Superoxide Dismutase Leading to Amyotrophic Lateral Sclerosis*” Journal of Biological Chemistry, **291**, 8, 4144-4155 (2016).
6. L. Banci; I. Bertini; F. Cramaro; R. Del Conte; M. S. Viezzoli „*The solution structure of reduced dimeric copper zinc superoxide dismutase*” European Journal of Biochemistry, **269**, 7, 1905-1915 (2002).
7. L. Banci; I. Bertini; F. Cramaro; R. Del Conte; M. S. Viezzoli „*Solution Structure of Apo Cu,Zn Superoxide Dismutase: Role of Metal Ions in Protein Folding*” Biochemistry, **42**, 32, 9543-9553 (2003).
8. L. J. Hayward; J. A. Rodriguez; J. W. Kim; A. Tiwari; J. J. Goto; D. E. Cabelli; J. S. Valentine; R. H. Brown, Jr. „*Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis*” J Biol Chem, **277**, 18, 15923-15931 (2002).
9. M. J. Lindberg; L. Tibell; M. Oliveberg „*Common denominator of Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis: Decreased stability of the apo state*” Proceedings of the National Academy of Sciences, **99**, 26, 16607-16612 (2002).
10. P. B. Stathopoulos; J. a. O. Rumfeldt; G. A. Scholz; R. A. Irani; H. E. Frey; R. A. Hallewell; J. R. Lepock; E. M. Meiering „*Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis show enhanced formation of aggregates in vitro*” Proceedings of the National Academy of Sciences, **100**, 12, 7021-7026 (2003).
11. F. Arnesano; L. Banci; I. Bertini; M. Martinelli; Y. Furukawa; T. V. O'halloran „*The Unusually Stable Quaternary Structure of Human Cu,Zn-Superoxide Dismutase 1 Is Controlled by Both Metal Occupancy and Disulfide Status*” Journal of Biological Chemistry, **279**, 46, 47998-48003 (2004).
12. P. A. Doucette; L. J. Whitson; X. Cao; V. Schirf; B. Demeler; J. S. Valentine; J. C. Hansen; P. J. Hart „*Dissociation of Human Copper-Zinc Superoxide Dismutase Dimers Using Chaotrope and Reductant: INSIGHTS INTO THE MOLECULAR BASIS FOR DIMER STABILITY*” Journal of Biological Chemistry, **279**, 52, 54558-54566 (2004).
13. Y. Furukawa; A. S. Torres; T. V. O'halloran „*Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS*” The EMBO Journal, **23**, 14, 2872-2881 (2004).
14. S. M. Lynch; S. A. Boswell; W. Colon „*Kinetic stability of Cu/Zn superoxide dismutase is dependent on its metal ligands: implications for ALS*” Biochemistry, **43**, 51, 16525-16531 (2004).
15. R. W. Strange; S. V. Antonyuk; M. A. Hough; P. A. Doucette; J. S. Valentine; S. S. Hasnain „*Variable metallation of human superoxide dismutase: atomic resolution crystal structures of Cu-Zn, Zn-Zn and as-isolated wild-type enzymes*” J Mol Biol, **356**, 5, 1152-1162 (2006).
16. P. C. Wong; D. Waggoner; J. R. Subramaniam; L. Tessarollo; T. B. Bartnikas; V. C. Culotta; D. L. Price; J. Rothstein; J. D. Gitlin „*Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase*” Proceedings of the National Academy of Sciences, **97**, 6, 2886-2891 (2000).

17. N. M. Brown; A. S. Torres; P. E. Doan; T. V. O'halloran „*Oxygen and the copper chaperone CCS regulate posttranslational activation of Cu,Zn superoxide dismutase*” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **101**, 15, 5518-5523 (2004).
18. R. L. B. Casareno; D. Waggoner; J. D. Gitlin „*The Copper Chaperone CCS Directly Interacts with Copper/Zinc Superoxide Dismutase*” Journal of Biological Chemistry, **273**, 37, 23625-23628 (1998).
19. P. J. Schmidt; M. Ramos-Gomez; V. C. Culotta „*A Gain of Superoxide Dismutase (SOD) Activity Obtained with CCS, the Copper Metallochaperone for SOD1*” Journal of Biological Chemistry, **274**, 52, 36952-36956 (1999).
20. L. T. Hall; R. J. Sanchez; S. P. Holloway; H. Zhu; J. E. Stine; T. J. Lyons; B. Demeler; V. Schirf; J. C. Hansen; A. M. Nersissian; J. S. Valentine; P. J. Hart „*X-ray Crystallographic and Analytical Ultracentrifugation Analyses of Truncated and Full-Length Yeast Copper Chaperones for SOD (LYS7): A Dimer–Dimer Model of LYS7–SOD Association and Copper Delivery*” Biochemistry, **39**, 13, 3611-3623 (2000).
21. A. L. Lamb; A. S. Torres; T. V. O'halloran; A. C. Rosenzweig „*Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone*” Nat Struct Biol, **8**, 9, 751-755 (2001).
22. R. H. Holm; P. Kennepohl; E. I. Solomon „*Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology*” Chemical Reviews, **96**, 7, 2239-2314 (1996).
23. J. M. Mates; C. Perez-Gomez; I. Nunez De Castro „*Antioxidant enzymes and human diseases*” Clin Biochem, **32**, 8, 595-603 (1999).
24. W. Rachidi; D. Vilette; P. Guiraud; M. Arlotto; J. Riondel; H. Laude; S. Lehmann; A. Favier „*Expression of Prion Protein Increases Cellular Copper Binding and Antioxidant Enzyme Activities but Not Copper Delivery*” Journal of Biological Chemistry, **278**, 11, 9064-9072 (2003).
25. D. R. Brown; B. S. Wong; F. Hafiz; C. Clive; S. J. Haswell; I. M. Jones „*Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase*” Biochemical Journal, **344**, Pt 1, 1-5 (1999).
26. D. C. Bolton; M. P. McKinley; S. B. Prusiner „*Identification of a protein that purifies with the scrapie prion*” Science, **218**, 4579, 1309-1311 (1982).
27. R. Riek; S. Hornemann; G. Wider; M. Billeter; R. Glockshuber; K. Wuthrich „*NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231)*” Nature, **382**, 6587, 180-182 (1996).
28. D. R. Brown; H. Kozłowski „*Biological inorganic and bioinorganic chemistry of neurodegeneration based on prion and Alzheimer diseases*” Dalton Transactions, 13, 1907-1917 (2004).
29. R. P. Bonomo; D. Grasso; G. Grasso; V. Guantieri; G. Impellizzeri; C. La Rosa; D. Milardi; G. Pappalardo; G. Tabbi; E. Rizzarelli „*Metal Binding to Prion Protein*” in Metal-Ligand Interactions in Molecular-, Nano-, and Macro-Systems in Complex Environments, (Eds) N. Russo, D.R. Salahub, M. Witko; Kluwer, Dordrecht, 21-39 (2003).
30. C. S. Burns; E. Aronoff-Spencer; G. Legname; S. B. Prusiner; W. E. Antholine; G. J. Gerfen; J. Peisach; G. L. Millhauser „*Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein*” Biochemistry, **42**, 22, 6794-6803 (2003).
31. A. R. Thompsett; S. R. Abdelraheim; M. Daniels; D. R. Brown „*High Affinity Binding between Copper and Full-length Prion Protein Identified by Two Different Techniques*” Journal of Biological Chemistry, **280**, 52, 42750-42758 (2005).
32. M. F. Jobling; X. Huang; L. R. Stewart; K. J. Barnham; C. Curtain; I. Volitakis; M. Perugini; A. R. White; R. A. Cherny; C. L. Masters; C. J. Barrow; S. J. Collins; A. I. Bush; R. Cappai „*Copper and Zinc Binding Modulates the Aggregation and Neurotoxic Properties of the Prion Peptide PrP106–126*” Biochemistry, **40**, 27, 8073-8084 (2001).
33. M. Remelli; M. Donatoni; R. Guerrini; A. Janicka; P. Pretegianni; H. Kozłowski „*Copper-ion interaction with the 106-113 domain of the prion protein: a solution-equilibria study on model peptides*” Dalton Transactions, 17, 2876-2885 (2005).
34. G. Di Natale; G. Grasso; G. Impellizzeri; D. La Mendola; G. Micera; N. Mihala; Z. Nagy; K. Ősz; G. Pappalardo; V. Rigó; E. Rizzarelli; D. Sanna; I. Sívágó „*Copper(II) Interaction with Unstructured Prion Domain Outside the Octarepeat Region: Speciation, Stability, and*

- Binding Details of Copper(II) Complexes with PrP106–126 Peptides* Inorganic Chemistry, **44**, 20, 7214-7225 (2005).
35. D. R. Brown; V. Guantieri; G. Grasso; G. Impellizzeri; G. Pappalardo; E. Rizzarelli „*Copper(II) complexes of peptide fragments of the prion protein. Conformation changes induced by copper(II) and the binding motif in C-terminal protein region*” Journal of Inorganic Biochemistry, **98**, 1, 133-143 (2004).
 36. D. Grasso; G. Grasso; V. Guantieri; G. Impellizzeri; C. La Rosa; D. Milardi; G. Micera; K. Ösz; G. Pappalardo; E. Rizzarelli; D. Sanna; I. Sóvágó „*Environmental Effects on a Prion's Helix II Domain: Copper(II) and Membrane Interactions with PrP180–193 and Its Analogues*” Chemistry – A European Journal, **12**, 2, 537-547 (2006).
 37. G. M. Cereghetti; A. Schweiger; R. Glockshuber; S. Van Doorslaer „*Electron paramagnetic resonance evidence for binding of Cu²⁺ to the C-terminal domain of the murine prion protein*” Biophysical Journal, **81**, 1, 516-525 (2001).
 38. M. L. Kramer; H. D. Kratzin; B. Schmidt; A. Römer; O. Windl; S. Liemann; S. Hornemann; H. Kretzschmar „*Prion Protein Binds Copper within the Physiological Concentration Range*” Journal of Biological Chemistry, **276**, 20, 16711-16719 (2001).
 39. A. I. Bush „*Metals and neuroscience*” Curr Opin Chem Biol, **4**, 2, 184-191 (2000).
 40. G. L. Millhauser „*Copper Binding in the Prion Protein*” Accounts of Chemical Research, **37**, 2, 79-85 (2004).
 41. D. J. Waggoner; T. B. Bartnikas; J. D. Gitlin „*The Role of Copper in Neurodegenerative Disease*” Neurobiology of Disease, **6**, 4, 221-230 (1999).
 42. R. Zahn „*The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site*” J Mol Biol, **334**, 3, 477-488 (2003).
 43. C. L. Haigh; S. C. Drew; M. P. Boland; C. L. Masters; K. J. Barnham; V. A. Lawson; S. J. Collins „*Dominant roles of the polybasic proline motif and copper in the PrP23-89-mediated stress protection response*” Journal of Cell Science, **122**, 10, 1518 (2009).
 44. F. Klamt; F. Dal-Pizzol; M. L. Conte Da Frota; R. Walz; M. E. Andrades; E. G. Da Silva; R. R. Brentani; I. Izquierdo; J. C. Fonseca Moreira „*Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein*” Free radical biology & medicine, **30**, 10, 1137-1144 (2001).
 45. R. C. Nadal; S. R. Abdelraheim; M. W. Brazier; S. E. J. Rigby; D. R. Brown; J. H. Viles „*Prion protein does not redox-silence Cu²⁺, but is a sacrificial quencher of hydroxyl radicals*” Free Radical Biology and Medicine, **42**, 1, 79-89 (2007).
 46. P. Csermely „*Stresszfehérjék*” Vince Kiadó, (2000).
 47. P. Tompa „*Természet világa*” **131. évf. 7. sz.**, (2000).
 48. S. B. Prusiner „*Neurodegenerative Diseases and Prions*” New England Journal of Medicine, **344**, 20, 1516-1526 (2001).
 49. S. B. Prusiner „*Prions*” Proc Natl Acad Sci U S A, **95**, 23, 13363-13383 (1998).
 50. B. S. Berlet; E. R. Stadtman „*Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress*” Journal of Biological Chemistry, **272**, 33, 20313-20316 (1997).
 51. G. Y. Yin; Y. F. Yin; X. F. He „*Effect of zhuchun pill on immunity and endocrine function of elderly with kidney-yang deficiency*” Chinese journal of integrated traditional and Western medicine, **15**, 10, 601-603 (1995).
 52. L. E. Rikans; K. R. Hornbrook „*Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging*” Biochim Biophys Acta, **1362**, 2-3, 116-127 (1997).
 53. F. Oesch „*Metabolism of carcinogens, possibilities for modulation*” Acta Pharmacol Toxicol (Copenh), **55 Suppl 2**, 15-33 (1984).
 54. H. Esterbauer; J. Gebicki; H. Puhl; G. Jurgens „*The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL*” Free Radic Biol Med, **13**, 4, 341-390 (1992).
 55. R. Hurst; Y. Bao; P. E. R. Jemth; B. Mannervik; G. Williamson „*3 Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of rat class Theta glutathione transferase T2-2*” Biochemical Society Transactions, **25**, 4, S559 (1997).
 56. E. L. Da Silva; M. K. Piskula; N. Yamamoto; J.-H. Moon; J. Terao „*Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma*” FEBS Letters, **430**, 3, 405-408 (1998).
 57. R. A. Patterson; D. S. Leake „*Human serum, cysteine and histidine inhibit the oxidation of low density lipoprotein less at acidic pH*” FEBS Lett, **434**, 3, 317-321 (1998).

58. H. Sigel; R. B. Martin „*Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands*” *Chemical Reviews*, **82**, 4, 385-426 (1982).
59. I. Sóvágó „*Coordination equilibria in biologically active systems*” in *Biocoordination chemistry*, K. Burger (Ed) Ellis Horwood, Chichester, Ch. 4, 135-184 (1990).
60. L. D. Pettit; J. E. Gregor; H. Kozłowski „*Complex formation between metal ions and peptides*” in *Perspectives in bioinorganic chemistry*, R. W. Hay; J. R. Dilworth; K. B. Nolan (Eds) Jai Press Ltd., London, 1, (1991).
61. L. D. Pettit; L. A. R. „*Metal-peptide complex formation*” in *Handbook of metal-ligand interaction in biological fluids*, G. Berthon (Ed) Marcel Dekker Inc., New York, Ch. 2, 1, 636-647 (1995).
62. H. Kozłowski; W. Bal; M. Dyba; T. Kowalik-Jankowska „*Specific structure–stability relations in metallopeptides*” *Coordination Chemistry Reviews*, **184**, 1, 319-346 (1999).
63. I. Sóvágó; K. Ósz „*Metal ion selectivity of oligopeptides*” *Dalton Transactions*, 32, 3841-3854 (2006).
64. I. Sóvágó; C. Kállay; K. Várnagy „*Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes*” *Coordination Chemistry Reviews*, **256**, 19–20, 2225-2233 (2012).
65. T. Kiss „*Coordination equilibria in biologically active systems*” in *Biocoordination chemistry*, K. Burger (Ed) Ellis Horwood, Chichester, Ch. 3, 56-134 (1990).
66. S. H. Laurie „*Bioinorganic chemistry*” in *Handbook of metal-ligand interactions in biological fluids*, G. Berthon (Ed) Marcel Dekker Inc., New York, Ch. 2, 1, 603-619 (1995).
67. G. Brookes; L. D. Pettit „*Thermodynamics of complex formation between hydrogen, copper(II), and nickel(II) ions and dipeptides containing non-co-ordinating substituent groups*” *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 20, 2106-2112 (1975).
68. G. F. Bryce; R. W. Roeske; F. R. N. Gurd „*Cupric Ion Complexes of Histidine-containing Peptides*” *Journal of Biological Chemistry*, **240**, 10, 3837-3846 (1965).
69. G. F. Bryce; R. W. Roeske; F. R. N. Gurd „*l-Histidine-containing Peptides as Models for the Interaction of Copper (II) and Nickel (II) Ions with Sperm Whale Apomyoglobin*” *Journal of Biological Chemistry*, **241**, 5, 1072-1080 (1966).
70. D. Sanna; C. G. Ágoston; I. Sóvágó; G. Micera „*Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) complexes formed by oligopeptides containing histidine with a protection at the terminal amino group*” *Polyhedron*, **20**, 9–10, 937-947 (2001).
71. M. Orfei; M. C. Alcaro; G. Marcon; M. Chelli; M. Ginanneschi; H. Kozłowski; J. Brasuń; L. Messori „*Modeling of copper(II) sites in proteins based on histidyl and glycyl residues*” *Journal of Inorganic Biochemistry*, **97**, 3, 299-307 (2003).
72. A. E. Martell; R. M. Smith „*Critical stability constants*” in *Biochemical Education*, Plenum Press, New York and London, **5**, 604 (1982).
73. I. Sóvágó; T. Kiss; A. Gergely „*Proton and copper(II) complexes of the pentapeptide thymopoietin(32–36)*” *Inorganica Chimica Acta*, **93**, 4, L53-L55 (1984).
74. I. Sóvágó; C. Bertalan; L. Göbl; I. Sóvágó; O. Nyéki „*Copper(II) complexes of low molecular weight derivatives of thymopoietin*” *Journal of Inorganic Biochemistry*, **55**, 1, 67-75 (1994).
75. M. Remelli; M. Peana; S. Medici; L. G. Delogu; M. A. Zoroddu „*Interaction of divalent cations with peptide fragments from Parkinson's disease genes*” *Dalton Transactions*, **42**, 17, 5964-5974 (2013).
76. Á. Grenács; D. Sanna; I. Sóvágó „*Copper(II) and nickel(II) binding sites of peptide containing adjacent histidyl residues*” *Journal of Inorganic Biochemistry*, **151**, 87-93 (2015).
77. N. M. Chiera; M. Rowinska-Zyrek; R. Wiczorek; R. Guerrini; D. Witkowska; M. Remelli; H. Kozłowski „*Unexpected impact of the number of glutamine residues on metal complex stability*” *Metallomics*, **5**, 3, 214-221 (2013).
78. K. Ósz; Z. Nagy; G. Pappalardo; G. Di Natale; D. Sanna; G. Micera; E. Rizzarelli; I. Sóvágó „*Copper(II) Interaction with Prion Peptide Fragments Encompassing Histidine Residues Within and Outside the Octarepeat Domain: Speciation, Stability Constants and Binding Details*” *Chemistry – A European Journal*, **13**, 25, 7129-7143 (2007).

79. M. Luczkowski; H. Kozłowski; A. Legowska; K. Rolka; M. Remelli „*The possible role of Gly residues in the prion octarepeat region in the coordination of Cu²⁺ ions*” Dalton Transactions, 4, 619-624 (2003).
80. C. S. Burns; E. Aronoff-Spencer; C. M. Dunham; P. Lario; N. I. Avdievich; W. E. Antholine; M. M. Olmstead; A. Vrielink; G. J. Gerfen; J. Peisach; W. G. Scott; G. L. Millhauser „*Molecular Features of the Copper Binding Sites in the Octarepeat Domain of the Prion Protein*” Biochemistry, **41**, 12, 3991-4001 (2002).
81. E. Aronoff-Spencer; C. S. Burns; N. I. Avdievich; G. J. Gerfen; J. Peisach; W. E. Antholine; H. L. Ball; F. E. Cohen; S. B. Prusiner; G. L. Millhauser „*Identification of the Cu²⁺ Binding Sites in the N-Terminal Domain of the Prion Protein by EPR and CD Spectroscopy*” Biochemistry, **39**, 45, 13760-13771 (2000).
82. M. Luczkowski; H. Kozłowski; M. Stawikowski; K. Rolka; E. Gaggelli; D. Valensin; G. Valensin „*Is the monomeric prion octapeptide repeat PHGGGWGQ a specific ligand for Cu²⁺ ions?*” Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, 11, 2269-2274 (2002).
83. L. R. Brown; D. A. Harris „*Copper and zinc cause delivery of the prion protein from the plasma membrane to a subset of early endosomes and the Golgi*” Journal of Neurochemistry, **87**, 2, 353-363 (2003).
84. B. Belosi; E. Gaggelli; R. Guerrini; H. Kozłowski; M. Luczkowski; F. M. Mancini; M. Remelli; D. Valensin; G. Valensin „*Copper Binding to the Neurotoxic Peptide PrP106–126: Thermodynamic and Structural Studies*” ChemBioChem, **5**, 3, 349-359 (2004).
85. C. E. Jones; S. R. Abdelraheim; D. R. Brown; J. H. Viles „*Preferential Cu²⁺ coordination by His96 and His111 induces beta-sheet formation in the unstructured amyloidogenic region of the prion protein*” J Biol Chem, **279**, 31, 32018-32027 (2004).
86. F. Berti; E. Gaggelli; R. Guerrini; A. Janicka; H. Kozłowski; A. Legowska; H. Miecznikowska; C. Migliorini; R. Pogni; M. Remelli; K. Rolka; D. Valensin; G. Valensin „*Structural and Dynamic Characterization of Copper(II) Binding of the Human Prion Protein Outside the Octarepeat Region*” Chemistry – A European Journal, **13**, 7, 1991-2001 (2007).
87. H. Kozłowski; A. Janicka-Kłos; P. Stanczak; D. Valensin; G. Valensin; K. Kulon „*Specificity in the Cu²⁺ interactions with prion protein fragments and related His-rich peptides from mammals to fishes*” Coordination Chemistry Reviews, **252**, 10–11, 1069-1078 (2008).
88. E. Gralka; D. Valensin; K. Gajda; D. Bacco; L. Szyrwił; M. Remelli; G. Valensin; W. Kamasz; W. Baranska-Rybak; H. Kozłowski „*Copper(II) coordination outside the tandem repeat region of an unstructured domain of chicken prion protein*” Molecular BioSystems, **5**, 5, 497-510 (2009).
89. V. Józai; Z. Nagy; K. Ósz; D. Sanna; G. Di Natale; D. La Mendola; G. Pappalardo; E. Rizzarelli; I. Sóvágó „*Transition metal complexes of terminally protected peptides containing histidyl residues*” Journal of Inorganic Biochemistry, **100**, 8, 1399-1409 (2006).
90. C. Kállay; I. Turi; S. Timári; Z. Nagy; D. Sanna; G. Pappalardo; P. De Bona; E. Rizzarelli; I. Sóvágó „*The effect of point mutations on copper(II) complexes with peptide fragments encompassing the 106–114 region of human prion protein*” Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly, **142**, 4, 411-419 (2011).
91. C. E. Jones; M. Klewpatinond; S. R. Abdelraheim; D. R. Brown; J. H. Viles „*Probing Copper²⁺ Binding to the Prion Protein Using Diamagnetic Nickel²⁺ and ¹H NMR: The Unstructured N terminus Facilitates the Coordination of Six Copper²⁺ Ions at Physiological Concentrations*” Journal of Molecular Biology, **346**, 5, 1393-1407 (2005).
92. M. Klewpatinond; J. H. Viles „*Empirical rules for rationalising visible circular dichroism of Cu²⁺ and Ni²⁺ histidine complexes: Applications to the prion protein*” FEBS Letters, **581**, 7, 1430-1434 (2007).
93. M. Klewpatinond; J. H. Viles „*Fragment length influences affinity for Cu²⁺ and Ni²⁺ binding to His⁹⁶ or His¹¹¹ of the prion protein and spectroscopic evidence for a multiple histidine binding only at low pH*” Biochemical Journal, **404**, 3, 393-402 (2007).
94. J. Shearer; P. Soh „*Ni K-edge XAS suggests that coordination of Ni^{II} to the unstructured amyloidogenic region of the human prion protein produces a Ni₂ bis-μ-hydroxo dimer*” Journal of Inorganic Biochemistry, **101**, 2, 370-373 (2007).

95. D. Valensin; K. Gajda; E. Gralka; G. Valensin; W. Kamysz; H. Kozłowski „*Copper binding to chicken and human prion protein amyloidogenic regions: Differences and similarities revealed by Ni²⁺ as a diamagnetic probe*” *Journal of Inorganic Biochemistry*, **104**, 1, 71-78 (2010).
96. T. Karavelas; M. Mylonas; G. Malandrinos; J. C. Plakatouras; N. Hadjiliadis; P. Mlynarz; H. Kozłowski „*Coordination properties of Cu(II) and Ni(II) ions towards the C-terminal peptide fragment –ELAKHA– of histone H2B*” *Journal of Inorganic Biochemistry*, **99**, 2, 606-615 (2005).
97. K. Várnagy; J. Szabó; I. Sóvágó; G. Malandrinos; N. Hadjiliadis; D. Sanna; G. Micera „*Equilibrium and structural studies on copper(II) complexes of tetra-, penta- and hexapeptides containing histidyl residues at the C-termini*” *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 4, 467-472 (2000).
98. S. Rajkovic; C. Kállay; R. Serényi; G. Malandrinos; N. Hadjiliadis; D. Sanna; I. Sóvágó „*Complex formation processes of terminally protected peptides containing two or three histidyl residues. Characterization of the mixed metal complexes of peptides*” *Dalton Transactions*, 37, 5059-5071 (2008).
99. M. Bataille; G. Formicka-Kozłowska; H. Kozłowski; L. D. Pettit; I. Steel „*The L-proline residue as a 'break-point' in the co-ordination of metal-peptide systems*” *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 4, 231-232 (1984).
100. C. Kállay; K. Várnagy; G. Malandrinos; N. Hadjiliadis; D. Sanna; I. Sóvágó „*Thermodynamic and structural characterization of the macrochelates formed in the reactions of copper(II) and zinc(II) ions with peptides of histidine*” *Inorganica Chimica Acta*, **362**, 3, 935-945 (2009).
101. B. Bóka; A. Myari; I. Sóvágó; N. Hadjiliadis „*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*, **98**, 1, 113-122 (2004).
102. D. Sanna; G. Micera; C. Kállay; V. Rigó; I. Sóvágó „*Copper(II) complexes of N-terminal protected tri- and tetra-peptides containing histidine residues*” *Dalton Transactions*, 17, 2702-2707 (2004).
103. C. Kállay; K. Várnagy; G. Malandrinos; N. Hadjiliadis; D. Sanna; I. Sóvágó „*Copper(II) complexes of terminally protected pentapeptides containing three histidyl residues in alternating positions, Ac-His-Xaa-His-Yaa-His-NH₂*” *Dalton Transactions*, 38, 4545-4552 (2006).
104. C. Kállay; Z. Nagy; K. Várnagy; G. Malandrinos; N. Hadjiliadis; I. Sóvágó „*Thermodynamic and Structural Characterization of the Copper(II) Complexes of Peptides Containing Both Histidyl and Aspartyl Residues*” *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 30394 (2007).
105. S. Timári; C. Kállay; K. Ósz; I. Sóvágó; K. Várnagy „*Transition metal complexes of short multihistidine peptides*” *Dalton Transactions*, 11, 1962-1971 (2009).
106. M. Casolaro; M. Chelli; M. Ginanneschi; F. Laschi; L. Messori; M. Muniz-Miranda; A. M. Papini; T. Kowalik-Jankowska; H. Kozłowski „*Spectroscopic and potentiometric study of the SOD mimic system copper(II)/acetyl-l-histidylglycyl-l-histidylglycine*” *Journal of Inorganic Biochemistry*, **89**, 3–4, 181-190 (2002).
107. P. Mlynarz; W. Bal; T. Kowalik-Jankowska; M. Stasiak; M. T. Leplawy; H. Kozłowski „*Introduction of α-hydroxymethylserine residues in a peptide sequence results in the strongest peptidic, albumin-like, copper(II) chelator known to date*” *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 2, 109-110 (1999).
108. N. I. Jakab; A. Jancsó; T. Gajda; B. Gyurcsik; A. Rockenbauer „*Copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of N-acetyl-His-Pro-His-His-NH₂: Equilibria, solution structure and enzyme mimicking*” *Journal of Inorganic Biochemistry*, **102**, 7, 1438-1448 (2008).
109. G. D. Natale; C. A. Damante; Z. Nagy; K. Ósz; G. Pappalardo; E. Rizzarelli; I. Sóvágó „*Copper(II) binding to two novel histidine-containing model hexapeptides: Evidence for a metal ion driven turn conformation*” *Journal of Inorganic Biochemistry*, **102**, 11, 2012-2019 (2008).
110. M. Remelli; M. Luczkowski; A. Mieczyslaw Bonna; Z. Mackiewicz; C. Conato; H. Kozłowski „*Cu(II) ion coordination to SPARC: a model study on short peptide fragments*” *New Journal of Chemistry*, **27**, 2, 245-250 (2003).

111. J. Brasun; H. Czapor; A. Matera-Witkiewicz; A. Kotynia; A. Sochacka; M. Cebzat „*The unusual coordination abilities of the peptides with β XaaHisGlyHis sequence. The influence of structural modification of the peptide chain on the copper(II) binding*” Dalton Transactions, **39**, 28, 6518-6523 (2010).
112. A. Matera-Witkiewicz; J. Brasun; J. Świątek-Kozłowska; A. Pratesi; M. Ginanneschi; L. Messori „*Short-chain oligopeptides with copper(II) binding properties: The impact of specific structural modifications on the copper(II) coordination abilities*” Journal of Inorganic Biochemistry, **103**, 5, 678-688 (2009).
113. G. Grasso; A. Magri; F. Bellia; A. Pietropaolo; D. La Mendola; E. Rizzarelli „*The copper(II) and zinc(II) coordination mode of HExxH and HxxEH motif in small peptides: The role of carboxylate location and hydrogen bonding network*” Journal of Inorganic Biochemistry, **130**, 92-102 (2014).
114. D. Brasili; J. Watly; E. Simonovsky; R. Guerrini; N. A. Barbosa; R. Wieczorek; M. Remelli; H. Kozłowski; Y. Miller „*The unusual metal ion binding ability of histidyl tags and their mutated derivatives*” Dalton Transactions, **45**, 13, 5629-5639 (2016).
115. J. Watly; E. Simonovsky; N. Barbosa; M. Spodzieja; R. Wieczorek; S. Rodziewicz-Motowidło; Y. Miller; H. Kozłowski „*African Viper Poly-His Tag Peptide Fragment Efficiently Binds Metal Ions and Is Folded into an α -Helical Structure*” Inorganic Chemistry, **54**, 16, 7692-7702 (2015).
116. D. Witkowska; R. Politano; M. Rowinska-Zyrek; R. Guerrini; M. Remelli; H. Kozłowski „*The Coordination of Ni^{II} and Cu^{II} Ions to the Polyhistidyl Motif of Hpn Protein: Is It as Strong as We Think?*” Chemistry – A European Journal, **18**, 35, 11088-11099 (2012).
117. G. Di Natale; I. Turi; G. Pappalardo; I. Sóvágó; E. Rizzarelli „*Cross-Talk Between the Octarepeat Domain and the Fifth Binding Site of Prion Protein Driven by the Interaction of Copper(II) with the N-terminus*” Chemistry – A European Journal, **21**, 10, 4071-4084 (2015).
118. E. Gaggelli; H. Kozłowski; D. Valensin; G. Valensin „*Copper Homeostasis and Neurodegenerative Disorders (Alzheimer's, Prion, and Parkinson's Diseases and Amyotrophic Lateral Sclerosis)*” Chemical Reviews, **106**, 6, 1995-2044 (2006).
119. T. Karavelas; G. Malandrinos; N. Hadjiliadis; P. Mlynarz; H. Kozłowski; M. Barsam; I. Butler „*Coordination properties of Cu(II) and Ni(II) ions towards the C-terminal peptide fragment -TYTEHA- of histone H4*” Dalton Transactions, 9, 1215-1223 (2008).
120. D. La Mendola; R. P. Bonomo; S. Caminati; G. Di Natale; S. S. Emmi; Ö. Hansson; G. Maccarrone; G. Pappalardo; A. Pietropaolo; E. Rizzarelli „*Copper(II) complexes with an avian prion N-terminal region and their potential SOD-like activity*” Journal of Inorganic Biochemistry, **103**, 2, 195-204 (2009).
121. D. Valensin; L. Szyrwiel; F. Camponeschi; M. Rowińska-Żyrek; E. Molteni; E. Jankowska; A. Szymanska; E. Gaggelli; G. Valensin; H. Kozłowski „*Heteronuclear and Homonuclear Cu²⁺ and Zn²⁺ Complexes with Multihistidine Peptides Based on Zebrafish Prion-like Protein*” Inorganic Chemistry, **48**, 15, 7330-7340 (2009).
122. V. Józai; I. Turi; C. Kállay; G. Pappalardo; G. Di Natale; E. Rizzarelli; I. Sóvágó „*Mixed metal copper(II)-nickel(II) and copper(II)-zinc(II) complexes of multihistidine peptide fragments of human prion protein*” Journal of Inorganic Biochemistry, **112**, 17-24 (2012).
123. R. P. Bonomo; G. Impellizzeri; G. Pappalardo; E. Rizzarelli; G. Tabbi „*Copper(II) Binding Modes in the Prion Octapeptide PHGGGWGQ: A Spectroscopic and Voltammetric Study*” Chemistry – A European Journal, **6**, 22, 4195-4202 (2000).
124. C. Hureau; L. Charlet; P. Dorlet; F. Gonnet; L. Spadini; E. Anxolabehere-Mallart; J. J. Girerd „*A spectroscopic and voltammetric study of the pH-dependent Cu(II) coordination to the peptide GGGTH: relevance to the fifth Cu(II) site in the prion protein*” J Biol Inorg Chem, **11**, 6, 735-744 (2006).
125. R. P. Bonomo; G. Di Natale; E. Rizzarelli; G. Tabbi; L. I. Vagliasindi „*Copper(II) complexes of prion protein PEG11-tetraoctarepeat fragment: spectroscopic and voltammetric studies*” Dalton Transactions, 14, 2637-2646 (2009).
126. S. Timári; R. Cerea; K. Várnagy „*Characterization of CuZnSOD model complexes from a redox point of view: redox properties of copper(II) complexes of imidazole containing ligands*” Journal of inorganic biochemistry, **105**, 8, 1009-1017 (2011).

127. G. Csire; J. Demjén; S. Timári; K. Várnagy „*Electrochemical and SOD activity studies of copper(II) complexes of bis(imidazol-2-yl) derivatives*” *Polyhedron*, **61**, 202-212 (2013).
128. M. Mylonas; A. Krezel; J. C. Plakatouras; N. Hadjiliadis; W. Bal „*The binding of Ni(II) ions to terminally blocked hexapeptides derived from the metal binding -ESHH- motif of histone H2A*” *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, **22**, 4296-4306 (2002).
129. I. Turi; C. Kállay; D. Szikszai; G. Pappalardo; G. Di Natale; P. De Bona; E. Rizzarelli; I. Sóvágó „*Nickel(II) complexes of the multihistidine peptide fragments of human prion protein*” *J Inorg Biochem*, **104**, 8, 885-891 (2010).
130. I. Turi; D. Sanna; E. Garribba; G. Pappalardo; I. Sóvágó „*The effect of non-coordinating side chains on the metal binding affinities of peptides of histidine*” *Polyhedron*, **62**, 7-17 (2013).
131. M. A. Zoroddu; M. Peana; T. Kowalik-Jankowska; H. Kozlowski; M. Costa „*Nickel(II) binding to Cap43 protein fragments*” *Journal of Inorganic Biochemistry*, **98**, 6, 931-939 (2004).
132. A. J. Bard; R. Parsons; J. Jordan „*Standard potentials in aqueous solution*” Marcel Dekker Incl., New York, (1985).
133. N. N. Greenwood; A. Earnshaw „*Chemistry of the Elements 2ed.*” Butterworth-Heinemann, (1997).
134. B. R. James; R. J. P. Williams „*383. The oxidation-reduction potentials of some copper complexes*” *Journal of the Chemical Society*, 2007-2019 (1961).
135. R. P. Bonomo; G. Impellizzeri; G. Pappalardo; R. Purrello; E. Rizzarelli; G. Tabbi „*Coordinating properties of cyclopeptides. Thermodynamic and spectroscopic study on the formation of copper(II) complexes with cyclo(Gly-His)₄ and cyclo(Gly-His-Gly)₂ and their superoxide dismutase-like activity*” *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, **22**, 3851-3858 (1998).
136. K. Takehara; Y. Ide „*Electrochemistry of Cu(II)-peptide complexes containing histidine residues II. Anomalous current fluctuation in the reduction process of Cu(II)-GGH*” *Inorganica Chimica Acta*, **186**, 1, 73-78 (1991).
137. K. Takehara; Y. Ide „*Electrochemistry of copper(II)-peptide complexes containing histidine residues*” *Inorganica Chimica Acta*, **183**, 2, 195-202 (1991).
138. R. P. Bonomo; G. Pappalardo; E. Rizzarelli; G. Tabbi; L. I. Vagliasindi „*Studies of nitric oxide interaction with mono- and dinuclear copper(II) complexes of prion protein bis-octarepeat fragments*” *Dalton Transactions*, **29**, 3805-3816 (2008).
139. D. T. Sawyer; J. S. Valentine „*How super is superoxide?*” *Accounts of Chemical Research*, **14**, 12, 393-400 (1981).
140. H. A. Azab; L. Banci; M. Borsari; C. Luchinat; M. Sola; M. S. Viezzoli „*Redox chemistry of superoxide dismutase. Cyclic voltammetry of wild-type enzymes and mutants on functionally relevant residues*” *Inorganic Chemistry*, **31**, 22, 4649-4655 (1992).
141. J. Casanova; G. Alzuet; J. Borrás; O. Carugo „*Crystal structures and superoxide dismutase mimetic activity of [CuL₂(Him)₂].MeOH and [CuL₂(mim)₂].H₂O [HL = 4-amino-N-(thiazol-2-yl)benzenesulfonamide, Him = imidazole, mim =N-methylimidazole]*” *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, **11**, 2239-2244 (1996).
142. J. Casanova; G. Alzuet; S. Ferrer; J. Latorre; J. Antonio RamíRez; J. N. Borrás „*Superoxide dismutase activity of ternary copper complexes of sulfathiazole and imidazole derivatives. Synthesis and properties of [CuL₂(R-Him)₂] [HL=4-amino-N-(thiazol-2-yl)benzenesulfonamide, R-Him=4-methylimidazole, 4,4-dimethylimidazoline or 1,2-dimethylimidazole]. Crystal structure of [CuL₂(4,4-dimethylimidazoline)₂]*” *Inorganica Chimica Acta*, **304**, 2, 170-177 (2000).
143. E. Bienvenue; S. Choua; M. A. Lobo-Recio; C. Marzin; P. Pacheco; P. Seta; G. Tarrago „*Structure and superoxide dismutase activity of Ru(II), Cu(II), and Mn(II) macrocyclic complexes*” *Journal of Inorganic Biochemistry*, **57**, 3, 157-168 (1995).
144. I. Bertini; S. Manganl; M. S. Viezzoli; Academic Press „*Structure and Properties of Copper-Zinc Superoxide Dismutases*” in *Advances in Inorganic Chemistry*, ed.: A. G. Sykes, 127-250 (1998).
145. L. L. Costanzo; G. De Guidi; S. Giuffrida; E. Rizzarelli; E. Rizzarelli; G. Vecchio „*Determination of superoxide dismutase-like activity of copper(II) complexes. Relevance of*

- the speciation for the correct interpretation of in vitro O_2^- scavenger activity” Journal of Inorganic Biochemistry, **50**, 4, 273-281 (1993).
146. Z. Duračková; M. A. Mendiola; M. T. Sevilla; A. Valent „Thiohydrazone copper(II) complexes. The relationship between redox properties and superoxide dismutase mimetic activity” Bioelectrochemistry and Bioenergetics, **48**, 1, 109-116 (1999).
 147. G. Condorelli; L. L. Costanzo; G. De Guidi; S. Giuffrida; E. Rizzarelli; G. Vecchio; E. Rizzarelli „Inhibition of photohemolysis by copper(II) complexes with Sod-like activity” Journal of Inorganic Biochemistry, **54**, 4, 257-265 (1994).
 148. R. P. Bonomo; V. Bruno; E. Conte; G. De Guidi; D. L. Mendola; G. Maccarrone; F. Nicoletti; E. Rizzarelli; S. Sortino; G. Vecchio „Potentiometric, spectroscopic and antioxidant activity studies of SOD mimics containing carnosine” Dalton Transactions, 23, 4406-4415 (2003).
 149. R. Pogni; M. C. Baratto; E. Busi; R. Basosi „EPR and O_2^- scavenger activity: Cu(II)—peptide complexes as superoxide dismutase models” Journal of Inorganic Biochemistry, **73**, 3, 157-165 (1999).
 150. G. Arena; D. La Mendola; G. Pappalardo; I. Sóvágó; E. Rizzarelli „Interactions of Cu^{2+} with prion family peptide fragments: Considerations on affinity, speciation and coordination” Coordination Chemistry Reviews, **256**, 19–20, 2202-2218 (2012).
 151. A. Jancsó; Z. Paksi; N. Jakab; B. Gyurcsik; A. Rockenbauer; T. Gajda „Solution chemical properties and catecholase-like activity of the copper(II)-Ac-His-His-Gly-His-OH system, a relevant functional model for copper containing oxidases” Dalton Transactions, 19, 3187-3194 (2005).
 152. K. Barbusiński „Fenton reaction - controversy concerning the chemistry” Ecological Chemistry and Engineering. S, **16**, 3, 347-358 (2009).
 153. E. R. Stadtman; B. S. Berlett „Fenton chemistry. Amino acid oxidation” J Biol Chem, **266**, 26, 17201-17211 (1991).
 154. S. Fu; S. Gebicki; W. Jessup; J. M. Gebicki; R. T. Dean „Biological fate of amino acid, peptide and protein hydroperoxides” Biochemical Journal, **311**, 3, 821-827 (1995).
 155. F. E. Ali; K. J. Barnham; C. J. Barrow; F. Separovic „Copper catalysed oxidation of amino acids and Alzheimer's disease” Letters in Peptide Science, **10**, 5, 405-412 (2003).
 156. C. Schöneich „Mechanisms of metal-catalyzed oxidation of histidine to 2-oxo-histidine in peptides and proteins” Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **21**, 6, 1093-1097 (2000).
 157. J. A. Ji; B. Zhang; W. Cheng; Y. J. Wang „Methionine, tryptophan, and histidine oxidation in a model protein, PTH: Mechanisms and stabilization” Journal of Pharmaceutical Sciences, **98**, 12, 4485-4500 (2009).
 158. E. R. Stadtman; R. L. Levine „Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins” Amino Acids, **25**, 3, 207-218 (2003).
 159. K. Freudenberg; C. L. Chen; J. M. Harkin; H. Nimz; H. Renner „Observation on lignin” Chemical Communications (London), 11, 224-225 (1965).
 160. S. Boonvisut; A. Aksnes; L. R. Njaa „Oxidation of methionine. Effects of hydrogen peroxide alone and in combination with iodide and selenite” Food Chemistry, **9**, 3, 183-194 (1982).
 161. J. R. Requena; M. N. Dimitrova; G. Legname; S. Teijeira; S. B. Prusiner; R. L. Levine „Oxidation of methionine residues in the prion protein by hydrogen peroxide” Archives of Biochemistry and Biophysics, **432**, 2, 188-195 (2004).
 162. V. S. Sharma; J. Schubert; H. B. Brooks; F. Sicilio „Catalytic activity of metal chelates and mixed-ligand complexes in the neutral pH region. II. Copper-histidine” Journal of the American Chemical Society, **92**, 4, 822-826 (1970).
 163. S. A. Lewisch; R. L. Levine „Determination of 2-oxohistidine by amino acid analysis” Anal Biochem, **231**, 2, 440-446 (1995).
 164. T. Kowalik-Jankowska; M. Ruta; K. Wiśniewska; L. Łankiewicz; M. Dyba „Products of Cu(II)-catalyzed oxidation in the presence of hydrogen peroxide of the 1–10, 1–16 fragments of human and mouse β -amyloid peptide” Journal of Inorganic Biochemistry, **98**, 6, 940-950 (2004).
 165. J. D. Bridgewater; R. Srikanth; J. Lim; R. W. Vachet „The Effect of Histidine Oxidation on the Dissociation Patterns of Peptide Ions” Journal of the American Society for Mass Spectrometry, **18**, 3, 553-562 (2007).

166. T. Kowalik-Jankowska; A. Rajewska; E. Jankowska; Z. Grzonka „*Products of Cu(II)-catalyzed oxidation of α -synuclein fragments containing M^1 -D² and H⁵⁰ residues in the presence of hydrogen peroxide*” Dalton Transactions, 6, 832-838 (2008).
167. K. Uchida; S. Kawakishi „*Identification of oxidized histidine generated at the active site of Cu,Zn-superoxide dismutase exposed to H₂O₂. Selective generation of 2-oxo-histidine at the histidine 118*” J Biol Chem, **269**, 4, 2405-2410 (1994).
168. F. Zhao; E. Ghezzi-Schoneich; G. I. Aced; J. Hong; T. Milby; C. Schoneich „*Metal-catalyzed oxidation of histidine in human growth hormone. Mechanism, isotope effects, and inhibition by a mild denaturing alcohol*” J Biol Chem, **272**, 14, 9019-9029 (1997).
169. S. Li; T. H. Nguyen; C. Schoneich; R. T. Borchardt „*Aggregation and precipitation of human relaxin induced by metal-catalyzed oxidation*” Biochemistry, **34**, 17, 5762-5772 (1995).
170. J.-W. Lee; J. D. Helmann „*The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalyzed histidine oxidation*” Nature, **440**, 7082, 363-367 (2006).
171. V. Au; S. A. Madison „*Effects of singlet oxygen on the extracellular matrix protein collagen: oxidation of the collagen crosslink histidinohydroxylysinoisoleucine and histidine*” Arch Biochem Biophys, **384**, 1, 133-142 (2000).
172. R. B. Merrifield „*Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*” Journal of the American Chemical Society, **85**, 14, 2149-2154 (1963).
173. L. E. Lammish; S. A. Kates „*Instrumentation for automated solid phase peptide synthesis*” in Fmoc solid phase peptide synthesis, a practical approach, W. C. Chan; P. D. White (Eds) Oxford University Press, Oxford, 277-302 (2000).
174. L. A. Carpino; G. Y. Han „*9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group*” The Journal of Organic Chemistry, **37**, 22, 3404-3409 (1972).
175. E. Atherton; D. L. J. Clive; R. C. Sheppard „*Polyamide supports for polypeptide synthesis*” Journal of the American Chemical Society, **97**, 22, 6584-6585 (1975).
176. H. Rink „*Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin*” Tetrahedron Letters, **28**, 33, 3787-3790 (1987).
177. F. Albericio; N. Kneib-Cordonier; S. Biancalana; L. Gera; R. I. Masada; D. Hudson; G. Barany „*Preparation and application of the 5-(4-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeric acid (PAL) handle for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions*” The Journal of Organic Chemistry, **55**, 12, 3730-3743 (1990).
178. D. S. King; C. G. Fields; G. B. Fields „*A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis*” International Journal of Peptide and Protein Research, **36**, 3, 255-266 (1990).
179. L. Zékány; I. Nagypál „*PSEQUAD: A comprehensive program for the evaluation of potentiometric and/or spectrophotometric equilibrium data using analytical derivatives*” Computational methods for the determination of formation constants, D. Leggett (Ed) Plenum Press, New York, 291-353 (1985).
180. G. Eriksson „*Algorithm for the computation of aqueous multicomponent, multiphase equilibria*” Analytica Chimica Acta - Computer Techniques and Optimization, **3**, 375-383 (1979).
181. H. M. Irving; M. G. Miles; L. D. Pettit „*A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode*” Analytica Chimica Acta, **38**, 475-488 (1967).
182. P. Gans; A. Sabatini; A. Vacca „*SUPERQUAD: an improved general program for computation of formation constants from potentiometric data*” Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, 6, 1195-1200 (1985).
183. J. Császár; M. Bán „*Optikai szinképek, ligandumtér-elmélet, komplexszerkezet*” Akadémiai Kiadó, Budapest, (1972).
184. J. W. Chang; R. B. Martin „*Visible circular dichroism of planar nickel ion complexes of peptides and cysteine and derivatives*” The Journal of Physical Chemistry, **73**, 12, 4277-4283 (1969).
185. E. W. Wilson; R. B. Martin „*Circular dichroism of palladium(II) complexes of amino acids and peptides*” Inorganic Chemistry, **9**, 3, 528-532 (1970).

186. J. M. Tsangaris; R. B. Martin „Visible circular dichroism of copper(II) complexes of amino acids and peptides” *Journal of the American Chemical Society*, **92**, 14, 4255-4260 (1970).
187. R. B. Martin in *Metal ions in biological systems*, H. Sigel (Ed) Marcel Dekker, New York, Ch. 4, 1, 129-156 (1974).
188. H. Kozłowski; G. Micera in *Handbook of metal-ligand interactions in biological fluids*, G. Berthon (Ed) Marcel Dekker Inc., New York, 1, 566-582 (1995).
189. D. H. Evans; K. M. O'connell; R. A. Petersen; M. J. Kelly „Cyclic voltammetry” *Journal of Chemical Education*, **60**, 4, 290-293 (1983).
190. G. A. Mabbott „An introduction to cyclic voltammetry” *Journal of Chemical Education*, **60**, 9, 697-702 (1983).
191. P. T. Kissinger; W. R. Heineman „Cyclic voltammetry” *Journal of Chemical Education*, **60**, 9, 702-706 (1983).
192. E. Farkas; P. Buglyó; É. A. Enyedy; M. Amelia Santos „Factors affecting the metal ion-hydroxamate interactions II: effect of the length of the connecting chain on the Fe(III), Mo(VI) and V(V) complexation of some new desferrioxamine B (DFB) model dihydroxamic acids” *Inorganica Chimica Acta*, **357**, 9, 2451-2461 (2004).
193. S. Goldstein; C. Michel; W. Bors; M. Saran; G. Czapski „A critical reevaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity” *Free Radical Biology and Medicine*, **4**, 5, 295-303 (1988).
194. C. S. Ho; C. W. Lam; M. H. Chan; R. C. Cheung; L. K. Law; L. C. Lit; K. F. Ng; M. W. Suen; H. L. Tai „Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications” *Clin Biochem Rev*, **24**, 1, 3-12 (2003).
195. V. H. Wysocki; K. A. Resing; Q. Zhang; G. Cheng „Mass spectrometry of peptides and proteins” *Methods*, **35**, 3, 211-222 (2005).
196. Józsaí Viktória „Doktori (Ph.D) értekezés”, Debrecen (2008).
197. Timári Sarolta „Doktori (Ph.D) értekezés”, Debrecen (2012).
198. S. Sjöberg „*Pure and Appl. Chem.*” **69**, 1549 (1996).
199. J. Müller; K. Felix; C. Maichle; E. Lengfelder; J. Strähle; U. Weser „Phenyl-substituted copper di-Schiff base, a potent Cu₂Zn₂ superoxide dismutase mimic surviving competitive biochelation” *Inorganica Chimica Acta*, **233**, 1, 11-19 (1995).
200. I. Szilágyi; I. Labádi; K. Hernadi; I. Pálinkó; N. V. Nagy; L. Korecz; A. Rockenbauer; Z. Kele; T. Kiss „Speciation study of an imidazolate-bridged copper(II)-zinc(II) complex in aqueous solution” *Journal of Inorganic Biochemistry*, **99**, 8, 1619-1629 (2005).
201. U. Weser; C. Richter; A. Wendel; M. Younes „Reactivity of antiinflammatory and superoxide dismutase active Cu(II)-salicylates” *Bioinorganic chemistry*, **8**, 3, 201-213 (1978).
202. Z. Guan; N. A. Yates; R. Bakhtiar „Detection and characterization of methionine oxidation in peptides by collision-induced dissociation and electron capture dissociation” *J Am Soc Mass Spectrom*, **14**, 6, 605-613 (2003).

8. FÜGGELÉK

Tudományos publikációk (Publications)

Az értekezés alapját képező közlemények (Articles connected to the thesis) (3):

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények (Published articles) (2):

1. Gizella Csire, József Demjén, Sarolta Timári, Katalin Várnagy **Electrochemical and SOD activity studies of copper(II) complexes of bis(imidazol-2-yl) derivatives**, Polyhedron, **61**, 202-212 (2013) IF: 2,047
2. Gizella Csire, Lajos Nagy, Katalin Várnagy, Csilla Kállay **Copper(II) Interaction with the Humán Prion 103-112 Fragment – Coordination and Oxidation**, Journal of Inorganic Biochemistry, **170**, 195-201 (2017)
IF: 3,205

Tudományos folyóiratban még meg nem jelent közlemények (Not published articles) (1):

1. Gizella Csire, Sarolta Timári, József Asztalos, Judit Király, Mariann Kiss, Katalin Várnagy
Coordination, redox properties and SOD activity of Cu(II) complexes of multihistidine peptides
(közlésre beküldve)

Az értekezés alapját képező előadások (Lectures connected to the thesis) (10):

1. Gizella Csire, Sarolta Timári, Katalin Várnagy
Coordination, redox properties and SOD activity of Cu(II) complexes of multihistidine peptides
International Symposium on Metal Complexes 2016, Poster Presentation, Barcelona, Spanyolország, 2016. 06. 07-10., 65. oldal
2. Csire Gizella, Kállay Csilla, Nagy Lajos, Várnagy Katalin, Sóvágó Imre
A humán prion fehérje 103-112 fragmense és a Cu(II)-ion közötti kölcsönhatás vizsgálata – koordináció és oxidáció
50. Komplexkémiai Kollokvium, Balatonvilágos, Magyarország, 2016.05.30-06.01., E41
3. Katalin Várnagy, Gizella Csire, Sarolta Timári, Ágnes Dávid, Csilla Kállay
The role of side chains in the fine tuning of metal binding ability of peptides
12th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Zürich, Svájc, 2014. 08. 24-28., S751. oldal, OP 6
4. Katalin Várnagy, Gizella Csire, Sarolta Timári
The role of side chains in the fine tuning of metal binding ability of peptides

International Symposium on Metal Complexes 2014, Pávia, Olaszország, 2014. 06. 08-12., 38. oldal, OC-6

5. Kállay Csilla, Csire Gizella, Nagy Lajos, Várnagy Katalin, Sóvágó Imre
Hisztidint és metionint tartalmazó peptidok kölcsönhatása réz(II)-ionokkal
48. Komplexkémiái Kollokvium, Siófok, Magyarország, 2014. 05. 28-30., E36
6. Csire Gizella
Cu(II)-peptidkomplexek koordinációs és redoxi sajátása, , illetve SOD aktivitása
XXXVI. Kémiai Előadói Napok, Szeged, Magyarország, 2013. 10. 28-31., 231. oldal
7. Katalin Várnagy, Gizella Csire, Sarolta Timári
Copper(II) complexes of peptide derivatives containing imidazole side chains, as models of Cu,Zn-SOD enzyme
International Symposium on Metal Complexes 2013, Burgos, Spanyolország, 2013. 06. 16-20., 50. oldal OC-5
8. Csire Gizella
Cu(II)-peptidkomplexek koordinációs és redoxi sajátása, , illetve SOD aktivitása
9. 47. Komplexkémiái Kollokvium, Mátraháza, Magyarország, 2013. 05. 29-31., E21
Csire Gizella
Cu(II)-bisz(imidazolil) származékok redoxi sajátásainak és SOD aktivitásának vizsgálata
XXXI. OTDK, Kémiai és Vegyipari Szekció, Koordinációs kémiai tagozat, Eger, Magyarország, 2013. április 4-6., 173. oldal
10. Csire Gizella
Cu(II)-bisz(imidazolil) származékok redoxi sajátásainak és SOD aktivitásának vizsgálata
DE TTK TDK konferencia, Debrecen, Magyarország, 2012. 11. 20-23.

Az értekezés alapját képező poszterek (Posters connected to the thesis) (5):

1. Gizella Csire, Sarolta Timári, Mariann Kiss, Katalin Várnagy **Coordination, redox properties and SOD activity of Cu(II) complexes of multihistidine peptides**
13th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Budapest, Magyarország, 2016. 08. 28.- 09. 01., 257. oldal, P104
2. Gizella Csire, Sarolta Timári, Katalin Várnagy
Coordination, redox properties and SOD activity of Cu(II) complexes of multihistidine peptides
International Symposium on Metal Complexes 2016, Barcelona, Spanyolország, 2016. 06. 07-10., 65. oldal

3. Gizella Csire, Csilla Kállay, Lajos Nagy, Katalin Várnagy, Imre Sóvágó
Copper(II) Interaction with the Humán Prion 103-112 Fragment – Coordination and Oxidation
13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 2015. június 12–15., Galway, Írország, 111. oldal, P13
4. Gizella Csire, Csilla Kállay, Lajos Nagy, Katalin Várnagy, Imre Sóvágó
Metal ion catalyzed oxidation of a humán prion fragment
12th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Zürich, Svájc, 2014. 08. 24-28., S813. oldal, P103
5. Csire Gizella, Várnagy Katalin
Cu(II)–peptidkomplexek koordinációs és redoxi sajátossága, illetve SOD aktivitása
XIX. Bolyai Konferencia, Budapest, Magyarország, 2014. 03. 22-23. 26. oldal, IX.

Az értekezésben nem tárgyalt előadások (Lectures not connected to the thesis) (2):

1. Csire Gizella
Imidazolgyűrűt tartalmazó ligandumok Cu(II)-komplexeinek elektrokémiai és SOD aktivitás vizsgálata
DETEP konferencia, Debrecen, Magyarország 2012. 05. 10.
2. Csire Gizella
Imidazolgyűrűt tartalmazó aminosav- és peptidszármazékok átmenetifém komplexeinek elektrokémiai vizsgálata
DETEP konferencia, Debrecen, Magyarország, 2011. 05. 05.

Az értekezésben nem tárgyalt poszterek (Posters not connected to the thesis) (1):

1. Katalin Várnagy, Sarolta Timári, Gizella Csire, Norbert Lihi
Coordination and redox properties of copper(II) and iron(II/III) complexes of bis(imidazol-2-yl) ligands
11th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, Barcelona, Spanyolország, 2011. 12. 02-05, P147