



**Tioéter- és imidazolcsoportot tartalmazó peptidek
fémkomplexeinek vizsgálata**

Doktori (PhD) értekezés

Bóka Beáta

Debreceni Egyetem
Debrecen, 2003

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1. Az aminosavak és peptidek komplexkémiai sajátosságai	3
2.1.1. Sav-bázis tulajdonságok és lehetséges koordinációs módok	3
2.1.2. „A peptidek fémmegkötő képességének szelektivitása”	7
2.1.3. Az oldallánc hatása a peptidek koordinációs kémiájára	15
2.2. A tioétercsoport koordinációs kémiája	18
2.2.1. Sav-bázis és komplexképződési reakciók	19
2.2.2. A közbenső jellegű átmenetifém-ionok komplexei	19
2.2.3. A soft karakterű Pd(II)ionok komplexei	21
2.2.4. Pb(II)komplexek	23
2.3. A hisztidin aminosav szerepe peptidekben	23
2.3.1. Több hisztidil-oldalláncot tartalmazó peptidek	24
2.3.2. N-terminálisan védett hisztidintartalmú peptidek komplexei	25
2.4. A szuperoxid-diszmutáz enzimek és lehetséges modelljeik	26
2.4.1. A szuperoxid anion jelentősége	26
2.4.2. A szuperoxid-diszmutáz (SOD) enzimek típusai	27
2.4.3. A SOD enzim modelljei	28
3. Kísérleti körülmények és vizsgálati módszerek	31
3.1. A használt vegyszerek	31
3.2. Peptidszintézis	34
3.3. Az alkalmazott kísérleti technikák	38
3.3.1. pH-potenciometria	38
3.3.2. Spektrofotometria	41
3.3.3. CD spektroszkópia	42
3.3.4. NMR spektroszkópia	45
3.3.5. ESR spektroszkópia	47
4. Kísérleti eredmények és értékelésük	48
4.1. A tioéterkén donoratom koordinációjának fémionfüggése	48
4.1.1. Metionintartalmú tripeptidek Cu(II)komplexei	48
4.1.2. Metionintartalmú tripeptidek Ni(II)komplexei	61
4.1.3. Metionintartalmú di- és tripeptidek Zn(II)- és Co(II)- és Cd(II)komplexei	65
4.1.4. Metionintartalmú di- és tripeptidek Pd(II)komplexei	67
4.1.5. Tioéterhidat tartalmazó vegyes fémkomplexek vizsgálata	87

4.2. Aminosavak és peptidek Pb(II)komplexei	92
4.2.1. Az Pb(II)ion hidrolízisének vizsgálata	92
4.2.2. Az Pb(II)ion aminosavakkal képezett komplexei	94
4.2.3. Az Pb(II)ion peptidekkel képezett komplexei	96
4.3. A Cu,Zn-SOD aktív centrumát modellező peptidek Cu(II)- és Zn(II)komplexei ...	100
5. Összefoglalás	109
6. Summary	112
Irodalmi hivatkozások	116
Függelék	123

1. Bevezetés

Már régóta ismert, hogy egyes fémionok bár csak kis mennyiségben fordulnak elő az élő szervezetekben, fontos szerepet játszanak számos biokémiai folyamat irányításában. Az elmúlt évtizedek során a fémionok és különböző bioligandumok közötti kölcsönhatásokat széleskörűen tanulmányozták. A bonyolult biológiai folyamatok megértésében segítséget nyújthatnak a modellrendszerek vizsgálata során szerzett információk. Az élő szervezetekben előforduló ligandumok közül a fehérjék képesek legerősebben megkötni a fémionokat; e makromolekulákat peptidekkel modellezhetjük.

A metalloenzimekben a fémion megkötésében meghatározó szerepe van a peptid oldalláncbeli funkciócsoportjainak. A főbb kötőhelyek csoportjába sorolható a hisztidin imidazolnitrogén, a cisztein tiolkén, az aszparaginsav és glutaminsav karboxiláttoxigén valamint a metionin tioéterkén donoratomja. Példaként említhetnénk a kék rézproteinek csoportjába tartozó plasztocianint. Ezen metalloprotein aktív centrumában a réz(II)ionhoz egy tiolkén és két imidazolnitrogén donoratom mellett egy tioéterkénatom koordinálódik. A réz(II)-tioéterkén kötéstávolság jóval nagyobb, mint a másik három, ami jelzi, hogy a kötés erőssége jelentősen kisebb, mint a többi donoratom esetén. A réz(II) körül torzult tetraédes elrendeződés jön létre a szokásos torzult oktaédes szerkezettel szemben. Munkánk során az előbb említettek közül két csoport: az imidazol- és a tioétercsoport szerepét tanulmányoztuk.

Munkánk egyik fő célkitűzése a fémion-tioéterkén kölcsönhatás vizsgálata volt. A tioétercsoport kevésbé tanulmányozott, szerepe az enzimekben illetve a komplexképződésre gyakorolt hatása kevésbé tisztázott. Az irodalomból ismert azonban, hogy ezen soft donoratomot nagyfokú fémionszelektivitás jellemzi, s a koordinációja nagymértékben függ egyéb donoratomok jelenlététől. Célul tűztük ki tehát a tioétercsoport koordinációjának vizsgálatát a fémionok széles körében, s a donoresoportot különböző környezetben tartalmazó ligandumok esetén. A Cu(II)-, Ni(II)-, Zn(II)- és Co(II)- mellett a szoftabb karakterű Cd(II)- és Pd(II)- valamint Pb(II)komplexeket tanulmányoztunk. A választott ligandumok a metionin aminosavat különböző számban és helyzetben tartalmazó di- és tripeptidek voltak.

Az előbb felsorolt fémionok közül az irodalomban kevés adat található az Pb(II)ion peptidekkel való kölcsönhatására vonatkozóan, ezért a megfelelő összehasonlítás érdekében célul tűztük ki az Pb(II) aminosav- és peptidkomplexeinek szélesebb körű vizsgálatát is.

Az imidazolnitrogén szinte valamennyi metalloenzim esetén elsődleges fémmegkötőhely, ezért hatására vonatkozóan igen sok irodalmi adat áll rendelkezésre. Ezek egy része konkrét metalloenzimek vizsgálatával foglalkozik, egy másik csoportja pedig modell rendszerekben tanulmányozza az imidazolnitrogén szerepét, ez utóbbi csoportba tartoznak a hisztidintartalmú peptidek fémkomplexeire vonatkozó munkák.

Talán az egyik legérdekesebb imidazolhidas enzim a szuperoxid-diszmutáz. Ezen enzim esetén a fémionokhoz a peptidszekvenciában egymáshoz közel elhelyezkedő aminosavak oldalláncbeli donorcsoportjai koordinálódnak. A rézkötőhely egy tripeptiddel (HisValHis), míg a cinkkötőhely egy tetrapeptiddel (HisValGlyAsp) modellezhető. Az enzim aktív centrumában ezen két iont egy híd hisztidinoldallánc köti össze, amely a cinkhez a piridin-, a rézhez pedig a pirrol-típusú nitrogéneken keresztül koordinálódik. Munkánk egyik célja ezen két peptid komplexeinek a vizsgálata volt. A C- és N-terminálison védett peptidek komplexeit tanulmányoztuk, mivel ezek az enzim közelebbi modelljének tekinthetők.

2. Irodalmi áttekintés

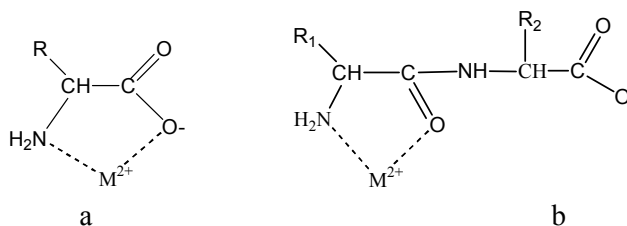
2.1. Az aminosavak és peptidok komplexkémiai sajátosságai

Az aminosavak és peptidok kölcsönhatását különböző fémionokkal széleskörűen vizsgálták az elmúlt évtizedek során, s számos összefoglaló mű is megjelent erről a területről.¹⁻⁹ A képződő komplexek szerkezete és stabilitása függ a fémion sajátosságaitól, illetve az oldalláncbeli donorcsoportok jelenlététől.

A továbbiakban az egyszerű aminosavak és peptidok esetén megvalósuló koordinációs módok ismertetését követően a képződő komplexek szerkezetét alapvetően befolyásoló tényezők közül a fémion és az oldallánc hatását külön alfejezetekben részletesebben tárgyaljuk.

2.1.1. Sav-bázis tulajdonságok és lehetséges koordinációs módok

Az aminosavak vizes oldatban ikerionos formában fordulnak elő és egy proton felvételére ($pK_{\text{karboxil}} \sim 2-2,5$), illetve leadására ($pK_{\text{amino}} \sim 9-10$) képesek. Átmenetifémionokhoz az α -amino és a karboxilátcsoponton keresztül koordinálódnak, a kialakuló öttagú kelátgyűrű miatt a képződő komplex igen stabilis (2.1.a ábra).



2.1. ábra Egy aminosav (a) és egy peptid (b) $[MA]^+$ komplexének szerkezete

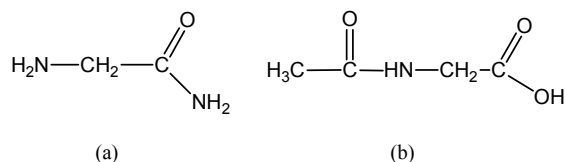
Az aminosav oldalláncában található egyéb donoratombok molekulán belüli helyzetüktől és minőségüktől függően jelentősen módosíthatják a kialakuló komplex szerkezetét, stabilitását.^{10,11} Koordinációra gyakorolt hatásukra a peptidok esetén térek ki részletesebben.

A peptidekben található amidkötés két újabb fémmegkötésre alkalmas donoratomot (amidnitrogén és karboniloxigén) tartalmaz, ami további jellegzetes koordinációs módok kialakulását teszi lehetővé. Az oldalláncbéli donoratombok pedig még tovább növelik a fémion-bioligandum kölcsönhatás sokszínűségét.

A kialakuló komplexek szerkezetét a különböző donorcsoportok sav-bázis tulajdonságai és egymáshoz viszonyított térbeli helyzete határozzák meg. A dipeptideket az aminosavakkal összevetve megállapítható, hogy az aminocsoport bázicitása ($pK_{\text{amino}} \sim 7-8$) és a karboxilcsoport savassága ($pK_{\text{karboxil}} \sim 3$) is csökken, mivel a két csoport egymástól távolabb helyezkedik el, mint az aminosavakban. A peptidlánc további növelése azonban már nem eredményez további jelentős változást a láncvégi csoportok bázicitásában.

Az amidnitrogén nemkötő elektronpárjának delokalizációja miatt nem Lewis-bázis. A szén-nitrogén kötés jelentős (40%) kettőskötés karaktere miatt az amidcsoport planáris. Ennek következtében a peptidkötés igen gyenge savként illetve bázisként viselkedik. Erősen savas közegben a karboniloxigén proton felvételre képes ($pK \sim -1$).¹² A peptidcsoport hidrogénjének eltávolítása pedig csak igen lúgos oldatokban lehetséges, ami a bázisállandó meghatározását nehezíti. Az irodalomban csak néhány adat található, pl. a GlyTyr esetén $pK=15,2$ értéket mértek.¹³ Tehát a peptidkötés (fémionok távollétében) a vizsgálatok pH-tartományában ($0 < \text{pH} < 14$) semlegesnek tekinthető.

A peptidekben az amino- és karboxilátcsoport nincs kelátképző helyzetben, a peptidlánc két végén, egymástól távol helyezkednek el, így egyidejű koordinációjuk nem valósulhat meg. A fémion karaktere határozza meg, hogy a kettő közül melyik csoport tölti be az elsődleges kötőhely szerepét. A két láncvég koordinációs kémiai viselkedésének tanulmányozására a legegyszerűbb modellvegyületek a glicinamid (N-terminus) és az N-acetil-glicin (C-terminus) (2.2. ábra).



2.2. ábra A glicinamid (a) és az N-acetil-glicin (b) szerkezeti képlete

Az N-acetil-glicin a karboxilát oxigénen keresztül egyfogú ligandumként koordinálódik¹⁴, igen kis stabilitású komplexet képez (Cu(II) ion esetén $\lg K=1,3$, más fémionok esetén még kisebb). Ez a kölcsönhatás nem képes megakadályozni a fémion hidrolízisét, hidroxidcsapadék leválása tapasztalható. A karboxilcsoporttal kelátképző helyzetben lévő peptidnitrogén koordinálódása csak deprotonálódása után következhetne be, ezt azonban eddig nem sikerült kimutatni.

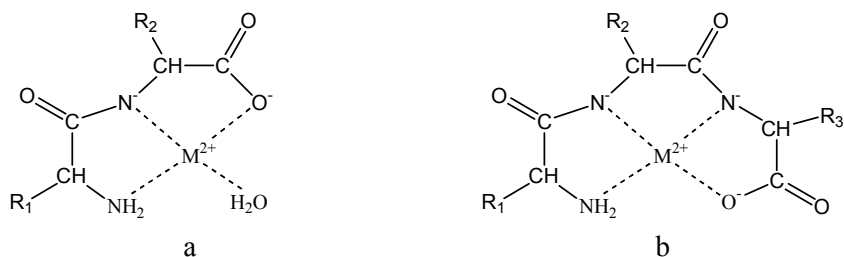
A glicinamid kétfogú ligandumként viselkedik, az aminonitrogén és a karboniloxigén részvételével öttagú kelátgyűrű alakul ki.¹⁵ Ez a kötésmód a peptidek átmenetifém-komplexeire is jellemző (2.1.b. ábra).

Ez a koordinációs mód a kétértékű 3d átmenetifém-ionok esetén képződő komplexeknek a monodentát karboxilát-koordinációnál nagyobb stabilitást kölcsönöz, így a fém-hidroxid csapadék leválása nem következik be. Ezen öttagú kelát stabilitása azonban kisebb, mint aminosavak esetén, hiszen az aminonitrogén mellett nem a negatív töltéssel rendelkező karboxilát-, hanem a semleges karboniloxigén található a fémion koordinációs szférájában. Réz(II)- és néhány egyéb fémion esetén enyhén lúgos közegben a glicinamid amidnitrogénjének deprotonálódása és koordinálódása is bekövetkezik, az amidcsoport deprotonálódását jellemző pK értéke legalább hét nagyságrenddel csökken a szabad ligandumhoz viszonyítva. A $[\text{CuA}_2\text{H}_2]$ komplexben két amino- és két deprotonálódott amidnitrogén telíti a réz(II) koordinációs szféráját. Az átmenetifém-ionok számára tehát az aminocsoport az elsődleges fémionmegkötő hely.

A peptidek esetén a glicinamidhoz hasonlóan az aminonitrogénnel kelátképző helyzetben van a peptidkötés oxigén és nitrogén donoratomja is. Az átmenetifém-ionok $[\text{MA}]^+$ komplexére az (NH_2, CO) koordináció jellemző. Ez a kölcsönhatás meglehetősen gyenge, így általában nem képes megakadályozni a fémion hidrolízisét lúgos közegben. Egyes fémionok jelentősen csökkentik az amidcsoport pK-ját, így a peptidnitrogén deprotonálódása és koordinálódása már a vizsgálható pH-tartományban bekövetkezik. A képződő $[\text{MAH}_1]$ sztöchiometriájú komplexben a fémionhoz az amino- és az amidnitrogén mellett a dipeptidek esetén a karboxiloxigén (2.3.a ábra), míg oligopeptidek esetén a következő karboniloxigén koordinálódik. Kettős kelátgyűrű alakul ki, ami nagy stabilitást kölcsönöz a komplexnek. Ennek a szerkezetnek a létezését röntgen vizsgálatok is igazolták.¹⁶

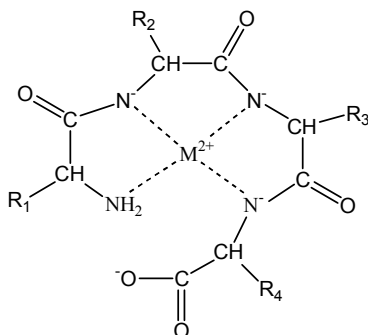
A több amidkötést tartalmazó peptidek esetén a pH-növelésével további peptidnitrogének deprotonálódása és koordinálódása is megtörténik, három öttagú

csatolt kelátgyűrűt tartalmazó komplex képződik. A 2.3.b. ábrán az $[\text{MAH}_2]^-$ komplex szerkezete látható.



2.3. ábra Egy dipeptid $[\text{MAH}_1]$ (a) és egy tripeptid $[\text{MAH}_2]^-$ (b) komplexe

Ezen három koordinált nitrogén donoratomot (egy amino- és két deprotonálódott amidnitrogént) tartalmazó komplexekben a fémion negyedik koordinációs helyét tripeptidek esetén a karboxilát- míg hosszabb peptidek esetén a karboniloxigén foglalja el. A tetrapeptidek $[\text{MAH}_3]^{2-}$ komplexe négy nitrogén donoratomot tartalmaz, a fémion koordinációs szférájában az amino- és a három amidnitrogén található (2.4. ábra).



2.4. ábra Egy tetrapeptid $[\text{MAH}_3]^{2-}$ komplexének szerkezete

Az eddigi megállapítások oldalláncban donorcsoportot nem tartalmazó, szabad terminussal rendelkező peptidekre vonatkoznak.

Az irodalomban általánosan elfogadott nézet, hogy az amidnitrogén deprotonálódása és koordinálódása csak akkor következik be, ha a ligandum szerkezete megfelelő, vagyis az amidnitrogénnel kelátképző helyzetben tartalmaz egy erősen koordinálódó, úgynevezett horgony donorcsoportot. A fémion csak ehhez a donorcsoportoz kötődve képes indukálni a deprotonálódást, a folyamatot jellemző pK értéke ebben az esetben csökken jelentősen a szabad ligandumra jellemző

értékhez képest. (A közelmúltban kimutatták az amidnitrogén deprotonálódását és koordinálódását horgony donorcsoportot nem tartalmazó, ciklikus szerkezetű ligandum esetén is, de csak erősen lúgos közegben.¹⁷⁾ A peptidekben általában a láncvégi aminocsoport tölti be a horgony szerepét, de az oldalláncbéli imidazol- illetve tiolcsoportról is kimutatták, hogy viselkedhet horgonycsoportként.¹⁸⁻²⁰

Az amidnitrogén deprotonálódását, a képződő komplexek szerkezetét alapvetően befolyásoló tényezők közül a fémion és az oldallánc hatását a következőkben részletesebben tárgyaljuk.

2.1.2. „A peptidek fémmegkötő képességének szelektivitása”

Az amid-deprotonálódás nagymértékben fémionfüggő. A legjelentősebb hatása a Pd(II)-, Cu(II)- és Ni(II)ionoknak van, hiszen valamennyi vizsgált peptid esetén elősegítik a peptidnitrogén deprotonálódását és koordinálódását. A folyamat azonban az egyes ionok esetén különböző pH-n játszódik le (Pd(II) pH~2, Cu(II) pH~4, Ni(II) pH~8). Számos egyéb fémionról kimutatták, hogy képes indukálni az amidnitrogén deprotonálódását. Ezek között vannak inert karakterűek is, mint a Pt(II)^{21,22}, Au(III)²³, Co(III)²⁴⁻²⁷ és Cr(III)²⁸. Egyes esetekben a fémion szokatlan oxidációs számmal jellemezhető a kialakuló komplexben, például leírtak Cu(III)-²⁹, Ni(III)-³⁰ és Ag(III)-oligopeptid komplexeket^{29,31-33}. A fémionok egy része pedig csak néhány speciális esetben, például az oldalláncban erősen koordinálódó donoratomot tartalmazó peptid esetén segíti elő az amidnitrogén deprotonálódását és koordinálódását. Ez utóbbi csoportba sorolható a Co(II), Zn(II), Pb(II), VO(IV)^{34,35} és a dialkilón(IV)³⁶⁻³⁹.

Általánosságban megállapítható, hogy a peptidnitrogén donoratom koordinációját előidéző fémionok komplexeit síknégyszetes (Pd(II), Pt(II) és Ni(II)) vagy torzult oktaéderes geometria (Cu(II), Co(II), Co(III) és Ni(II)) jellemzi.

A továbbiakban az általam vizsgált fémionok peptidkomplexeinek jellemzőit külön alfejezetekben ismertetem. Előljáróban kiemelném a peptidnitrogén-koordináció vonatkozásában a választott fémionok között tapasztalható jelentős eltéréseket.

Réz(II)komplexek

A réz a növények, az állatok és az ember számára egyaránt létfontosságú elem, elsősorban enzimek alkotórésze. A szervezetben többnyire fehérjéhez kötött formában található meg. Fontos szerepet játszik a molekuláris oxigén anyagcseréjében, például a puhatestűek vérében az oxigén szállítását egy réztartalmú fehérje, a hemocianin végzi. Rézproteinek emellett számos redoxifolyamat katalízisében is részt vesznek, általában oxidáz funkciójuk van. Egyes enzimekben a rézion más fémionnal együtt fordul elő, ilyenek például a citokróm-C oxidáz, melyben vas, illetve a szuperoxid-diszmutázok egy típusa, melyben cink(II)ion található a réz(II)ion mellett.

A Cu(II)ion peptidekkel tetragonálisan torzult oktaédes geometriájú komplexeket képez, az ekvatoriális helyzetben lévő donoratombok koordinációja a meghatározó, míg az axiális helyzetben lévőkkel csak igen gyenge kölcsönhatás alakul ki.

A Cu(II)-diglicin rendszerben savas közegben az (NH₂, CO) koordinációjú [CuA]⁺ komplex található az oldatban, majd pH~4-n bekövetkezik a peptidnitrogén deprotonálódása és koordinálódása, [CuAH₁] összetételű komplex (2.3.a ábra) képződik. Mivel ezen komplexben a ligandum a Cu(II)ionnak csak három koordinációs helyét foglalja el, a fém-ligandum aránytól és a pH-tól függően bisz- illetve hidroxokomplexek képződése lehetséges.⁴⁰⁻⁴² A [CuA₂H₁]⁻ összetételű biszkomplexben a második ligandum axiális-ekvatoriális helyzetben, az amino- és a karbonilcsoporton keresztül kötődik. A második ligandum amidnitrogénje tehát nem deprotonálódik, ami gyengébb kötődést eredményez. A képződő komplex viszonylag kis stabilitású, így pH~9 felett nem gátolja meg a [CuAH₁] komplex hidrolízisét. A vegyeshidroxokomplex képződésének hatására az abszorpciós spektrumban kismértékű vöröseltolódás tapasztalható és a redoxipotenciál csökken.⁴³ Nagyon nagy ligandumfelesleg esetén (százszoros ill. ezerszeres), igen lúgos oldatban megfigyelhető a biuret reakció, négy nitrogén donoratomb koordinálódásával [CuA₂H₂]²⁻ komplex képződik.^{42,44,45}

A tri- és tetraglicin Cu(II)-komplexeit is többen vizsgálták⁴⁶⁻⁴⁸, s az amidnitrogének lépcsőzetes deprotonálódásáról számoltak be. A folyamatot jellemző pK értékek nagyobbak, mint a diglicin esetén, de jóval kisebbek, mint a szabad ligandumhoz (és a glicinamidhoz) tartozó érték. A deprotonálódott peptidnitrogének koordinálódásával a réz(II) koordinációs szférája telítetté válik (a [CuAH₂]⁻ és

tetrapeptidek esetén a $[\text{CuAH}_3]^{2-}$ komplexben), így a biszkomplex képződése és a hidrolízis gátolt. A hidrolízis csak igen lúgos közegben (pH~11,9) játszódik le.

Di-, tri- illetve tetraglicin esetén igen nagy ligandumfelesleg mellett végzett ESR spektroszkópiás vizsgálatok⁴⁹ további, $[(\text{NH}_2\text{CO})(\text{COO})]$ illetve $[(\text{NH}_2\text{N}^+\text{COO})(\text{COO})]$ koordinációval jellemzett biszkomplexek létét támasztották alá. Emellett savas közegben egy illetve két ligandum karboxilátcsoporton keresztüli monodentát koordinációját is bizonyították.

Nikkel(II)komplexek

A nikkell biológiai szerepe kevésbé ismert. Újabban enzimekben azonosították, például ureázokban illetve nikkell-vas-kén proteinekben, melyek hidrogenáz hatásúak. Emellett toxikus, számos embernél allergiát (bőrkiütés, ekcéma) okoz.

A peptidek Ni(II)ionnal alkotott komplexeit sokan vizsgálták, mivel ez a fémion is képes indukálni az amiddeprotonálódást enyhén lúgos oldatban. A rendelkezésre álló irodalmi adatok száma azonban jóval kisebb, mint a Cu(II)komplexekre vonatkozó. A peptidek koordinációs kémiája e két fémionnal (Cu(II)- és Ni(II)ion) sok hasonlóságot mutat, azonban néhány jelentős különbség is megfigyelhető a képződő komplexek összetételében és szerkezetében.⁵⁰ A Cu(II)oligopeptid komplexekkel ellentétben, amelyekre minden esetben torzult oktaéderes geometria jellemző, a Ni(II)ionnal képződő komplexek sztereokémiájuk alapján két típusba sorolhatók: oktaéderesek, vagy síknégyszeteselek. Jelentős eltérés a két fémion között, hogy az amidnitrogén deprotonálódása a Ni(II)ion esetén nagyobb pH-n játszódik le, így a fémion hidrolízise egyes esetekben számottevő lehet.

Potenciometriás és spektroszkópiás vizsgálatok azt mutatják, hogy a Ni(II)-diglicin rendszerben biszkomplexek képződnek. Mindkét kötött peptidmolekula amidnitrogénjének deprotonálódása és koordinálódása pH~10-re bekövetkezik, a kialakuló $[\text{NiA}_2\text{H}_2]^{2-}$ összetételű komplex paramágneses, oktaéderes. Szilárd halmazállapotban röntgen szerkezetvizsgálattal igazolták ezen hatos koordinációs számú komplexben a peptidmolekulák háromfogú $(\text{NH}_2\text{N}^+\text{COO}^-)$ kötődését.⁵¹

A diglicinnel ellentétben a Ni(II)ion tri- és tetraglicinnel sárga színű, diamágneses komplexet képez enyhén lúgos közegben. A két, illetve három amidnitrogén deprotonálódása nem különül el. A kis pH-n az oldatban jelenlévő

zöld/kék színű, paramágneses, oktaéderes geometriájú komplexből kooperatív deprotonálódással képződik a diamágneses, síknégyzetes geometriájú komplex.⁵² A képződő komplexek szerkezetét szilárd-⁵³ és oldatfázisban⁴⁸ szerkezetvizsgáló módszerekkel alátámasztották. A Ni(II)-peptid rendszerekre a különböző deprotonált részecskék kinetikailag viszonylag lassú képződése jellemző. A komplex inertsége a peptidnitrogének számával nő.

Co(II)-, Zn(II)- és Cd(II)komplexek

A peptidekkel alkotott komplexeik alapján a Co(II)-, Zn(II)- és Cd(II)ionok egy csoportba sorolhatók, bár biológiai szerepük meglehetősen különböző. A Zn(II) biológiai jelentősége kiemelkedő, a második leggyakoribb nyomelem, s egyben a legkevésbé toxikus elem. A metalloenzimekben kétféle szerepet tölthet be: egyrészt szerkezetalakító, másrészt enzimaktivátor hatása lehet. A számos cinktartalmú metalloenzim közül példaként említeném a szénsav anhidrázt, a karboxipeptidázt és az alkohol dehidrogenázt, melyekben a fémion imidazol-, karboxilát- és tiolcsoportokhoz kötődik. A kobalt biológiai szerepe döntően a B₁₂ vitaminhoz kapcsolódik, amely egy Co(III)iont tartalmazó komplex. Ezt a vitamint emberek és állatok nem, csupán egyes mikroorganizmusok képesek szintetizálni. A kobaltion azonban enyhén mérgező, lecsökkenti a pajzsmirigy aktivitását. A Cd(II)ion pedig egyértelműen a mérgező fémionok közé sorolható. Nagyfokú hasonlóságuk következtében a Co(II)- és a Cd(II)ion egyaránt helyettesítheti a Zn(II)-t az enzimekben.

A három fémion peptidekkel szembeni affinitása jól összemérhető, komplexeik igen kis stabilitásúak, mivel a Cu(II)- és Ni(II)ionhoz hasonló mértékben nem képesek indukálni az amidnitrogén deprotonálódását. Az [MA]⁺ típusú komplexekre az (NH₂,CO) koordináció jellemző. Már enyhén lúgos közegben hidroxokomplex képződése tapasztalható, a peptid kiszorulhat a fémion koordinációs szférájából.

Az irodalomban a peptidnitrogén-koordináció lehetőségére vonatkozóan egymásnak ellentmondó adatokat találunk Co(II)- és Zn(II)ion esetén. Egyes szerzők^{54,55} a Co(II)-diglicin rendszer esetén lúgos oldatban (pH~10) a Ni(II)ionnál leírttal megegyező szerkezetű, [Co(AH₁)₂]²⁻ összetételű biszkomplex képződéséről számoltak be. Feltételezték, hogy ebben az oktaéderes komplexben (NH₂,N⁻,COO⁻) koordináció valósul meg. Az oldalláncban donoratomot nem tartalmazó peptidek

amidnitrogénjének Zn(II)ion hatására bekövetkező deprotonálódását nem mutatták ki. Ezt a különbséget a Zn(II)ion nagyobb mértékű hidrolízishajlama és a ligandumtér stabilizáció hiánya indokolhatja.

Az oldalláncbéli donorcsoport hatására jelentősen növekedhet a fémmegekötő képesség. Erre jó példa a GlyHis, hiszen ezen dipeptid amidnitrogénjének deprotonálódása Co(II) illetve Zn(II) jelenlétében már pH~7 körül bekövetkezik.⁵⁶ A Cd(II)ion hatására bekövetkező amid-deprotonálódást sem imidazololdalláncot, sem tiolcsoportot tartalmazó peptid esetén nem mutattak ki.^{19,20} Tiolkénnel (S,O) illetve (S,N) kelát képződik, ennek hatására nő a Cd(II)komplex stabilitása.

Pd(II)komplexek

Palládium az élő szervezetekben természetes körülmények között nem található meg. Bár mérgező hatású, de a természetbeli előfordulása olyan ritka, hogy biológiai szerepe nem jelentős. Komplexeinek vizsgálatát két tényező indokolja. Egyrészt elméleti szempontból érdekesek, hiszen a Pd(II)ionnal képződnek a legnagyobb stabilitású peptidkomplexek, mivel a peptidnitrogén-deprotonálódást indukáló hatása ennek a fémionnak a legnagyobb. Másrészt a platinatartalmú rákellenes készítmények hatásmechanizmusának vizsgálata során a Pd(II)- az inert karakterű Pt(II)ion modellezésére használható.^{21,57} A két ion mérete ($r_{Pd(II)}=86\text{pm}$, $r_{Pt(II)}=85\text{pm}$), kémiai sajátosságai, soft karaktere valamint komplexeinek geometriája (síknégyzetes) és összetétele hasonló, ugyanakkor a Pd(II) ligandum-szubsztitúciós reakciói öt nagyságrenddel gyorsabban játszódnak le.⁵⁸

Az irodalomban alig található palládium-peptid rendszerekre vonatkozó oldategyensúlyi vizsgálat. A Pd(II)ion peptidkomplexeinek kiemelkedően nagy stabilitása miatt a komplexképződés igen kis pH-n megy végbe (pH<2), ahol a mérés hibája jelentősen megnő és az ionerősség sem állandó értékű, így közvetlen potenciometriás módszerrel egyensúlyi állandó nem határozható meg. Az egyensúlyi vizsgálatokat a fémion hidrolízise is nehezíti. A palládium(II)ionok vizes oldatában már kis fémionkoncentráció mellett, erősen savas közegben (pH~1) is képződnek hidroxokomplexek és Pd(OH)₂ csapadék válik le. A pH>2 oldatban bonyolult, nem egyensúlyi folyamatban többmagvú részecskék képződnek.⁵⁹⁻⁶²

A képződő komplexek szerkezetét széleskörűen vizsgálták különböző spektroszkópiai módszerekkel (pl. ¹H NMR és CD spektroszkópia) és több összefoglaló közlemény is megjelent, amely a Pd(II) és Pt(II) peptidkomplexeivel

foglalkozik.⁶³⁻⁶⁶ Az oldalláncban donorcsoportot nem tartalmazó dipeptidekkel a palládium(II)ion síknégyzetes, diamágneses komplexeket képez, amelyben a ligandum amino- és deprotonálódott amidnitrogén, valamint karboxiláttoxigén donoratomja koordinálódik. A fémion fennmaradó negyedik koordinációs helyét egy vízmolekula, vagy más egyfogú ligandum foglalja el, amely enyhén lúgos közegben egy hidroxidionra cserélődik. Erősen lúgos oldatban a karboxilátcsoport is kiszorul, dihidroxokomplex képződik. Ligandumfelesleg esetén a szabad koordinációs helyre egy újabb dipeptidmolekula koordinálódhat. A $[\text{PdA}_2\text{H}_1]^-$ összetételű komplexben a második ligandum az aminocsoporton keresztül, monodentát módon kötődik. Igen nagy pH-n $[\text{PdA}_2\text{H}_2]^{2-}$ sztöchiometriájú 4N-es biszkomplex jelenlétét feltételezték, melyben mindkét peptidmolekula (NH_2, N^-) koordinációjú.⁶⁷⁻⁶⁹

A közelmúltban egy indirekt módszer segítségével kutatócsoportunkban meghatározták számos di- és tripeptid Pd(II)komplexének stabilitási állandóit.⁷⁰ A használt kompetíciós módszer során versengő ligandumként nagy feleslegben kloridiont alkalmaztak. A palládium(II)ion viszonylag nagy stabilitású komplexeket képez kloridionnal, így jelenlétében a peptidkomplexek képződése nagyobb pH-n, az egyensúlyilag jobban vizsgálható tartományban játszódik le és a fémion hidrolízise is visszaszorul. (A kloridkoncentráció növelésével azonban nő a peptidkomplex kialakulásához szükséges idő. Úgy találták, hogy $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ kloridionkoncentráció az optimális, amely mellett az egyensúly beálltához szükséges idő még nem nő olyan mértékben, hogy egyensúlyi vizsgálat nem végezhető.) Kimutatták, hogy Pd(II)ion esetén a nemkoordinálódó oldallánc komplexképződésre gyakorolt hatása jelentős. A GlyX típusú dipeptidek rendszereiben ligandumfelesleg esetén egyetlen biszkomplex, a $[\text{PdA}_2\text{H}_1]^-$ összetételű részecske képződik, amelyben a két peptidmolekula eltérő módon koordinálódik, egyfogú illetve háromfogú ligandumként ($(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{COO}^-)(\text{NH}_2)$ koordináció). Az XGly típusú dipeptidek és a diglicin esetén az azonos módon, kétfogúként kötődő ligandumokat tartalmazó $[\text{PdA}_2\text{H}_2]^{2-}$ komplex az uralkodó, amelyre a $(\text{NH}_2, \text{N}^-)(\text{NH}_2, \text{N}^-)$ koordináció a jellemző; a $[\text{PdA}_2\text{H}_1]^-$ összetételű komplex csak kis mennyiségben képződik. Tri- és tetraglicin esetén palládium(II)ionok jelenlétében az amidcsoportok szukcesszív deprotonálódása következik be. A Pd(II)-triglicin rendszerben ligandumfelesleg esetén jelentős mennyiségben képződnek biszkomplexek. A $[\text{PdA}_2\text{H}_2]^{2-}$ komplexben mindkét triglicinmolekula, a diglicinhez hasonló módon, kétfogúként koordinálódik.

Pb(II)komplexek

Az ólom mérgező hatását már az ókori görögök is ismerték. A rómaiak körében a főzéshez és tároláshoz használt ólomedények és a vízvezeték okozott mérgezést. Ma is elsősorban az étellel és a vízzel kerülhet a szervezetbe, továbbá a belélegzett levegő, illetve a por is tartalmazhat ólomvegyületeket. Gyerekek esetén nagyobb valószínűséggel fordul elő ólomfelhalmozódás.⁷¹ Biológiai jelentősége csak a Pb(II)ionnak van.⁷² Rákkeltő hatása nem jelentős, de nagyon mérgező.⁷¹ Az ólommérgezés a felnőtteknél magas vérnyomást, vérszegénységet és idegrendszeri problémákat okoz. Gyermekeknél kisebb mértékű ólomterhelés is maradandó egészségkárosodáshoz vezethet; idegrendszeri problémák és viselkedési rendellenességek mellett fejlődésbeli lemaradás is megfigyelhető körükben.⁷³

A szervezetben elraktározott ólom több mint 95%-a (gyermek esetén 70-80%) a csontban, inert formában található,⁷² a szövetekben koncentrációja csupán 0,5 ppm. A vérben az Pb(II) szinte kizárólag (94-99%) a vörösvértestekben található, ahol a leghatékonyabb kismolekulatömegű ólommegkötő a glutation.⁷¹ A szabad formában a szervezetben jelenlévő Pb(II) az idegrendszer, a vese és a csontvelő szerkezetét és működését befolyásolja, károsítja, több a hem szintézisben szerepet játszó enzimet inibiál.^{71,72}

A [Xe] 4f¹⁴5d¹⁰6s²6p² elektronszerkezetű atom 6s és 6p pályáinak hibridizációja a relativisztikus felhasadás miatt nem kedvező, ezért az ólom +2 oxidációs állapotú formája stabilabb, mint a +4. Ezt a nagyobb rendszámú elemeknél megfigyelhető jelenséget inertpár hatásnak nevezzük.

A Pb(II)komplexekben sokféle koordinációs geometria megvalósulhat, nem ritka a torzult szerkezet sem. Gyakran hídligandumok részvételével többmagvú komplexek képződnek. A koordinációs szám 2 és 12 között változhat, amelyek közül a leggyakoribb a 2, 4 és 6. Nagy koordinációs szám viszonylag ritkán fordul elő, amelyek között kéntartalmú ligandumokkal képződő komplexet egyetlen egyet sem találunk.⁷³ Számos esetben a fémion koordinációs szférájában be nem töltött helyek találhatóak. Ennek oka, hogy a fémion nemkötő elektronjai hibridorbitálok helyezkednek el, azaz "sztereokémiailag aktív nemkötő elektronpárok".^{74,75} Szimmetrikus szerkezet csupán nagy méretű ligandumok komplexei, illetve nagy koordinációs számok esetén fordul elő, ha a térbeli taszítás képes ellensúlyozni a hibridizáció energianyereségét. Ha egy ligandum nem rendelkezik megfelelő számú, koordinációra képes donorcsoporttal, a fémionhoz más ligandumok, vagy oldószer

molekulák is koordinálódnak.⁷³ Valószínűleg a sokféle koordinációs geometria és ezek könnyen bekövetkező torzulása eredményezheti, hogy az Pb(II) kölcsönhatásba léphet az élő szervezetekben található Ca(II)- és Zn(II)kötőhelyekkel,^{76,77} illetve ez a sajátossága teszi érdekessé a makrociklusos ligandumokkal alkotott komplexeinek vizsgálatát.⁷⁸

A hard-soft elmélet nem igazán alkalmazható az Pb(II)ionra, hiszen komplexei általában nem túl nagy stabilitásúak, azonban mind a tiolcsoport (soft), mind a hidroxidion (hard) preferált koordinációja jellemzi.⁷⁹ Komplexeinek stabilitását a kétszeresen pozitív 3d átmenetifém-ionok megfelelő komplexeinek stabilitásához viszonyítva, (vagyis az Irving-Williams sorba illesztve az ólom(II)iont) a koordináló ligandum függvényében az alábbi megállapításokat tehetjük: Nitrogéndonor ligandumokkal a Fe(II)-vel közel azonos erősségű kötés alakul ki, a kölcsönhatás gyengébb, mint Cd(II)- és Zn(II)ionnal. Aminosavkomplexeinek stabilitása közelebb áll a Co(II)komplexeiéhez, a Cd(II)- és Zn(II)komplexeihez tartozó értékkel megegyező. Az oxigén- és kéndonorokat olyan erősen köti, mint a Cu(II)ion, vagyis a Cd(II)- és Zn(II)ionoknál sokkal erősebben.⁷⁶

Az ólomkomplexek sajátosságai közül érdemes még megemlíteni, hogy ligandumcsere sebessége kiemelkedő, talán az összes fémion közül a legnagyobb.^{76,77}

Az Pb(II)iont nagyfokú hidrolízishajlam jellemzi. A szokásos kísérleti körülmények között oldható, többmagvú komplexek (pl. $[\text{Pb}_3(\text{OH})_4]^{2+}$, $[\text{Pb}_4(\text{OH})_4]^{4+}$ ill. $[\text{Pb}_6(\text{OH})_8]^{4+}$) vannak jelen az oldatban.⁸⁰⁻⁸²

Az ólom mérgező sajátossága indokolja bioligandumokkal való kölcsönhatásának tanulmányozását. A nukleinsavak szerkezetére és stabilitására gyakorolt hatásáról szolgáltató információt az Pb(II)ion nukleotidokkal és a nukleinsavak más építőköveivel alkotott komplexeinek vizsgálata; e terület eredményeit egy a közelmúltban megjelent összefoglaló tartalmazza.⁸³ Egyes metalloproteinekben az Pb(II)ion kiszoríthatja a Ca(II)- illetve Zn(II)iont. A Ca(II)-t Pb(II)ionra cserélve a calmodulin számos hatása megmarad,⁸⁴ ugyanakkor egyes proteineket inaktívál, például ha transzkripciós faktorok ciszteinben gazdag (Cys₄) szerkezeti Zn(II)kötőhelyeihez kötődik.⁸⁵ Ez utóbbi magyarázhatja az ólom mérgezés okozta fejlődési rendellenességeket.⁷³

Bár a toxicitás tekintetében az ólom proteinekkel való kölcsönhatásának fontos szerepe lehet, az aminosavakkal és peptidekkel alkotott komplexeit kevesen vizsgálták. A tiolcsoportozó való nagy affinitása miatt főként kéntartalmú

aminosavakra találunk adatokat az irodalomban.⁸⁶⁻⁸⁹ A Pb(II)- di- illetve triglicin rendszerben végzett polarográfiás, potenciometriás és NMR spektroszkópiás vizsgálatok alapján a peptidmolekula karboxilátcsoportján keresztül koordinálódik pH<4 oldatban, míg pH>4 kialakul az (NH₂,CO) koordináció és a karboxiláttoxigén egy másik Pb(II)ionhoz koordinálódhat.⁹⁰⁻⁹² Kisstabilitású komplexek képződnek, a peptidnitrogén deprotonálódása nem következik be. Pb(II)ion indukált amiddeprotonálódásra azonban más ligandumok esetén találunk példát. Az N-tozil- és N-szulfonil-aminosavak (N-tozil-glicin, N-tozil-β-alanin és N-benzoil-glicin) savas közegben egyszerű karboxilát-ligandumként koordinálódnak az Pb(II)ionhoz, majd semleges közegben bekövetkezik az amidnitrogén deprotonálódása, (N,O) kelát alakul ki. A ligandumok kétfogú, (COO⁻,N⁻) koordinációját az oldat NMR spektroszkópiás, illetve a szilárd formában előállított komplex röntgendiffrakciós vizsgálatával igazolták. Különösen érdekes, hogy az Pb(II)ion az egyetlen +2 oxidációs állapotú fémion, amely képes indukálni a peptidnitrogén deprotonálódását a benzoil-glicinben.⁹³

2.1.3. Az oldallánc hatása a peptidek koordinációs kémiájára

A természetben előforduló húszféle aminosav oldalláncai közül egyesek nem koordinálódnak a fémionhoz, mások tartalmaznak koordinációra képes donoratómot. Utóbbiak között vannak olyan erősen koordinálódó donorcsoportok (imidazol-, tiol- illetve foszfonsavcsoport), melyek képesek betölteni a horgonydonor szerepét is.

Nem koordinálódó oldallánc hatása

Koordinálódó donoratómot nem tartalmazó oldallánc esetén újabb koordinációs módok kialakulására nincs lehetőség, de a képződő komplexek stabilitására gyakorolt hatás kimutatható.

Alifás oldalláncot tartalmazó dipeptidek Cu(II)- és Ni(II)komplexeinek vizsgálata során az alábbi tendenciák figyelhetők meg:⁹⁴ Az aminocsoport protonálódási állandója (pK_{amino}) alig változik (a GlyGly-hez képest) a C-terminális aminosav alkil- vagy arilcsoportjának hatására, míg az aminosavakra jellemző tendenciát követi X-Gly dipeptidek esetén (X=Leu, Ile). Az [MA]⁺ komplexbeli (N,O) kelát stabilitásáról információt nyújt a pK_{amino} - logβ_{MA} értéke. Kis mértékű

stabilitásnövekedés figyelhető meg Gly-X peptidek esetén, míg az oldallánc jelentős stabilitáscsökkenést okoz X-Gly peptidek esetében. Az X-X és a GlyGly komplexének stabilitása viszont közel azonos. Az alkil-oldallánc jelenléte a Gly-X peptidben elősegíti, míg az X-Gly peptidben gátolja az amidcsoport deprotonálódását. A biszkomplexek képződésében is eltérés tapasztalható az N- illetve a C-terminális oldalláncot tartalmazó dipeptidek között. Nevezetesen a $[\text{Cu}(\text{AH}_1)_2]^{2-}$ típusú komplex képződése csak X-Gly dipeptidekkel tapasztalható az oldallánc szterikus gátlásának következtében.^{42,95} A nem koordinálódó oldallánc hatása a komplexképződésre Pd(II)ion esetén is jelentős, amelyet az előző alfejezetben (2.1.2.) már részletesen ismertettem.

Az oldallánchatást leucintartalmú tripeptidek Cu(II)- és Ni(II)komplexei esetén is vizsgálták.⁹⁶ Megállapították, hogy a kelátgyűrűn belüli α -szénatom szubsztituense csökkenti az adott kelátgyűrű stabilitását, (a LeuGlyGly $[\text{MA}]^+$ komplexének stabilitása kisebb), míg elősegíti a gyűrűhöz tartozó peptidcsoport deprotonálódását (a LeuGlyGly első, míg a GlyLeuGly második amidcsoportjára vonatkozó pK csökken).

Gyengén koordinálódó oldallánc hatása

Az oldalláncban található koordinációra képes donoratomok hatására megnőhet a képződő komplex stabilitása, illetve új koordinációs módok megjelenése tapasztalható. Gyengén koordinálódó donorcsoportoknak tekinthető a szerin alkoholos- és a treonin fenolos hidroxilcsoportja, a lizin ϵ -aminocsoportja, illetve az aszparaginsav és a glutaminsav karboxilátcsoportja. Hatásuk általában N-terminális helyzetben jelentősebb, számos esetben dimer, vagy polimer részecskék képződését okozhatják. Az előbb felsoroltak közül a legjelentősebb hatása a karboxilátcsoportnak van. Karboxilátcsoport található a két természetben előforduló aminosav, az aszparaginsav és a glutaminsav oldalláncában. Az amino- és az oldalláncbeli karboxilátcsoport részvételével 6 illetve 7-tagú kelátgyűrű alakul ki az aminosavak átmenetifém-komplexeiben, amely jelentős stabilitásnövekedést eredményez. Az aszpartil rész β -karboxilátcsoportja a peptidkomplexek esetén is jelentős stabilitásnövekedést eredményez. N-terminális helyzetben a β -alaninszerű koordináció (6-tagú $(\text{NH}_2, \text{COO}^-)$ kelát) az $[\text{MA}]^+$ és $[\text{MA}_2]$ komplex nagyobb stabilitását eredményezi, míg C-terminális és közbenső helyzetben elősegíti az

aminosavszekvenciában megelőző peptidcsoport koordinálódását és gátolja a következő peptidnitrogén deprotonálódását.^{97,98}

A 3d átmenetifém-ionokkal való kölcsönhatása alapján a tioétercsoport is a gyengén koordinálódó donorcsoportok közé sorolható. A tioéterkén soft karakteréből adódóan kifejezetten soft fémionok számára, mint az Ag(I), Pd(II) és Pt(II) esetén ugyanakkor elsődleges kötőhelynek tekinthető. Mivel munkánk fő célkitűzése a fémion-tioéterkén kölcsönhatás vizsgálata volt, így a tioétercsoportot tartalmazó aminosavak és peptidek komplexeire vonatkozó irodalmi előzményeket egy önálló alfejezetként (2.2.) foglaljuk össze.

Erősen koordinálódó oldallánc hatása

Az oligopeptidek koordinációs kémiai sajátosságait a legjelentősebb mértékben a hisztidin imidazol-oldallánca és a cisztein tiolcsoportja módosítja. Mindkét oldallánc betöltheti a horgonydonor szerepét. Ugyancsak közös e két aminosav hatásában, hogy N-terminális helyzetben meggátolják az amidcsoport deprotonálódását és koordinálódását, stabilis biszkomplexek képződése következik be, hisztaminszerű ($\text{NH}_2, \text{N}_{\text{im}}$) illetve ciszteinszerű (NH_2, S^-) koordinációval. C-terminális illetve közbenső helyzetben pedig elősegítik az aminosavszekvenciában megelőző peptidcsoport koordinálódását és megakadályozzák a következő peptidnitrogén deprotonálódását. Az egyszerű tripeptidektől eltérően ($\text{NH}_2, \text{N}, \text{N}, \text{N}_{\text{im}}$) illetve ($\text{NH}_2, \text{N}, \text{N}, \text{S}^-$) koordináció jellemző a GlyGlyHis és a GlyGlyCys $[\text{MAH}_2]^{2-}$ komplexére Pd(II) és Ni(II) esetén, ami kiemelkedően nagy stabilitást eredményez. Az amidcsoport deprotonálódását indukálni képes fémionok számára a legerősebb kötőhelyet az amino terminus és az imidazol-oldallánc együttes jelenléte eredményezi a szekvenciában 3. helyen hisztidint tartalmazó peptidek esetén.

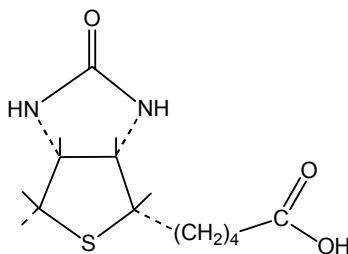
A tiolcsoport szerepével kapcsolatban fontos továbbá megjegyezni, hogy komplexeinek tanulmányozását nehezíti, hogy számos fémiont könnyen redukálni képes, ezek közé tartozik a Cu(II)ion is. Az irodalomban a legtöbb adat Ni(II)-, Pd(II)- és Zn(II)ionra vonatkozik.^{19,99} További nehézséget okoz, hogy számos esetben többmagvú komplex képződik, amelyben a tiolátkénatom tölti be a híd szerepét. A merkapto-propionil-glicin (3.2.ábra) az amidnitrogénnel kelátképző helyzetben tartalmazza a tiolátkénatomot, ami Pd(II)- és Ni(II)ion esetén horgonydonorként viselkedik, indukálja az amid-deprotonálódást. A képződő (S,N,O) kelát nem telíti a fémionok koordinációs szféráját, kénhidas többmagvú

komplex alakul ki.¹⁰⁰ Ez a ligandum azért is érdekes, mert Cu(II)ionnal nem történik redoxireakció, a képződő zöld színű komplex látható és ESR spektruma a kék rézproteinekére emlékeztet.¹⁰¹

Munkánk egyik célja a CuZnSOD enzim aktív centrumát modellező terminálisan védett HisValHis és HisValGlyAsp peptidok koordinációs kémiájának felderítése volt, ezért a több imidazol-oldalláncot tartalmazó valamint az N-terminálisan védett, hisztidintartalmú peptidok komplexeire vonatkozó irodalmi előzményeket egy különálló alfejezetben (2.3.) részletesen ismertetjük.

2.2. A tioétercsoport koordinációs kémiája

A természetben számos tioétercsoportot tartalmazó vegyület fordul elő. Találunk példát a fehérjéket felépítő aminosavak között, de vitamin, metabolit illetve számos biológiai hatással rendelkező vegyület, például antibiotikum (penicillin) is tartalmazza ezt a funkciós csoportot. Példaként említhetjük a H-vitamint, vagyis a D-biotint (2.5.ábra), amely nyomnyi mennyiségben szükséges a szervezet számára. Ezen ureido-szubsztituált aliciklikus szulfid egy koenzim, amely az enzimek lizil-oldalláncának aminocsoportjához kovalensen kötődve (amidkötés alakul ki) a biológiai karboxilezésben illetve transzkarboxilezésben játszik szerepet.



2.5.ábra A H-vitamin (D-biotin) szerkezeti képlete

Az oldalláncban tioétercsoportot tartalmaz a természetben előforduló aminosavak közül az L-metionin és az S-metil-L-cisztein. Az előbbi fehérjék alkotórésze, az emlősök azonban nem képesek szintetizálni e létfontosságú aminosavat, a táplálékkal kerül a szervezetükbe. Az S-metil-L-cisztein egyes növényekben található meg, kis peptidok építőköve.¹⁰²

A számos biokémiai folyamat katalízisében fontos szerepet játszó metalloenzimekben a fémiont a peptid oldalláncbeli funkciós csoportok kötik. A metionin tioétercsoportjának ilyen jellegű szerepét számos kék rézprotein, például a

plasztocianin esetén bizonyították.¹⁰³ Ezen réztartalmú enzimek aktív centrumában két imidazolnitrogén és egy tiolátkén mellett a tioéterkén koordinációja figyelhető meg. Fémion-tioéterkén kölcsönhatást mutattak ki a citokróm c-ben¹⁰⁴ illetve a kobalocitokróm c-ben,¹⁰⁵ melyekben a metionin tioétercsoportja axiálisan koordinálódik a vashoz, illetve a kobalthoz.

2.2.1. Sav-bázis és komplexképződési reakciók

A tioéterkénatomot sp^3 hibridizáció jellemzi, a két nemkötő elektronpárt is figyelembevéve (néhány gyűrűs szerkezetű vegyület kivételével) tetraédes geometria valósul meg. Ha csak az egyik nemkötő elektronpár alakít ki koordinatív kötést a fémionnal, a másiknak megnő a térigénye. Elvben azonban ez a második nemkötő elektronpár is részt vehet a kötésben π -donorként, ha a fémion megfelelő szimmetriájú, betöltetlen d-pályával rendelkezik. Másrészt a kénatomnak üres d pályája van, így elvben, ha a szimmetria megfelelő, fém \rightarrow kén viszontkoordináció (π -back donation) is bekövetkezhet, amely a kovalens sugarak összegénél kisebb fém-kén kötéstávolságot eredményez. Egyes esetekben a tioéterkén mindkét nemkötő elektronpárja kialakíthat koordinatív kötést egy-egy fémionnal, ílymódon többmagvú komplex alakulhat ki, melyet tioéterhíd köt össze.¹⁰⁶ Az egyszerű tioéterligandumok komplexeire vonatkozóan alig áll rendelkezésre stabilitási adat. Ennek több oka is van.¹⁰⁷ Egyrészt a tioéterkénatom monodentát koordinációja miatt a képződő komplexek stabilitása kicsi. Másrészt a stabilitási állandó pH-potenciometriás meghatározása nem lehetséges, mivel a tioétercsoport sav-bázis tulajdonságait tekintve a rendkívül gyenge bázisok közé sorolható, $pK \sim -6,8$ állandóval¹⁰⁸ jellemezhető. Az irodalomban található néhány stabilitási állandót spektrofotometriás módszerrel határozták meg.¹⁰⁹ Többnyire azonban olyan ligandumokat vizsgáltak, amelyek a tioétercsoport mellett tartalmaztak legalább egy, a vizsgálható pH-tartományban protonmegkötésre alkalmas donorcsoportot, például amino- vagy karboxilátcsoportot.

2.2.2. A közbenső jellegű átmenetifém-ionok komplexei

Az S-metil-cisztein (SMC) és a metionin aminosavakban az előbb említett donorcsoportok kelátképző helyzetben vannak, jelenlétükben a tioétercsoport gyenge koordinációja valósulhat csak meg. Az S-metil-cisztein átmenetifém

komplexeinek röntgenszerkezeti vizsgálata során kimutatták, hogy a fő kötőhelyek az amino- és a karboxilátcsoportok, a Cd(II), Zn(II)¹¹⁰ és Cu(II)¹¹¹ biszkomplexeiben a tioéterkénatom koordinációját kizárták. A stabilitási állandókat összevetve az alifás oldalláncot tartalmazó aminosavak megfelelő adataival a tioéteroldallánc kismértékű stabilitásnövelő hatása figyelhető meg. Ez a hatás az SMC komplexei esetében számottevőbb, míg a Met komplexei esetén majdnem elhanyagolható. A különbség az amino- és a tioétercsoport koordinációjával kialakuló kelátgyűrű eltérő méretéből adódik: S-metil-ciszteinnel öttagú, míg metioninnal hattagú kelátgyűrű képződhet.¹¹² Kimutatták azonban, hogy speciális kísérleti körülmények között (igen alacsony pH és hőmérséklet illetve nem vizes közeg) a metionin tioéterkénatomja is koordinálódik a Cu(II)ionhoz.¹¹³

C-terminális metionint tartalmazó dipeptid Cu(II)- és Ni(II)komplexeit vizsgálva nem tapasztaltak változást a diglicin megfelelő komplexéhez képest. N-terminális metionint tartalmazó dipeptidek (MetGly és MetHis) esetén azonban a koordinációban kismértékű módosulást figyeltek meg. Az [MAH₁] típusú komplexben az amino-, a deprotonálódott peptidnitrogén és a karboxilátoxigén koordinációja mellett gyenge axiális kén-fémion kölcsönhatás alakulhat ki, ami gátolja a második ligandum bekötődését az [MAH₁] komplex szabad koordinációs helyére, vagyis az [MA₂H₁]⁻ összetételű biszkomplex képződését. A Cu(II)-S kölcsönhatás létrejöttét támasztja alá pl. a Cu(II)-MetGly rendszer esetén az UV-látható spektrumban 328 nm hullámhossznál megjelenő töltésátviteli sáv.^{18,112,114} Hasonlóan a MetSer és a MetAlaSer Cu(II)komplexeit vizsgálva is kimutattak gyenge fém-kén kölcsönhatásra utaló sávot, a MetSer esetén $\lambda=334$ nm, a MetAlaSer-nél $\lambda=325$ nm hullámhossznál. Kén→réz(II) kölcsönhatás kialakulását valószínűsítették számos metionintartalmú peptid vizsgálata során a CD spektrumban 360 nm környékén megjelenő CT sáv alapján is, amely csak a [CuA]⁺ komplexre volt jellemző.^{115,116} Metionintartalmú dipeptidek Cu(II)komplexeinek vizsgálata során jelentős sztereoselektivitást tapasztaltak, ezt azonban a nem koordinálódó oldallánc okozta hidrofób kölcsönhatással magyarázták.¹¹⁷

Tehát a metionil- vagy S-metil-ciszteinil-oldalláncot tartalmazó peptidek 3d átmenetifém-ionokkal képezett komplexeiben a tioéterkénatom koordinációjára vonatkozóan az irodalomban ellentmondó adatok találhatók. Az azonban egyértelműen megállapítható, hogy a fő kötőhelyek a peptidekre jellemző donoratomok, vagyis az amino- és az amidnitrogén, valamint a karboxilát- és a

karboniloxigén. A tioéterkénnel kialakuló gyenge kölcsönhatás nagymértékben függ a donorcsoport térbeli helyzetétől.

Célul tűztük ki ezért a tioétercsoportot különböző helyzetben tartalmazó peptidek szisztematikus vizsgálatát. Potenciometriás és spektroszkópiás (spektrofotometria, ESR, CD) módszerrel tanulmányoztuk különböző számban és helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek Cu(II)- és Ni(II)ionnal képezett komplexeit. A 3d átmenetifém-ionok közül a Zn(II)- és a Co(II)ionok, valamint a Cd(II)ion kölcsönhatását metionintartalmú dipeptidekkel is vizsgáltuk.

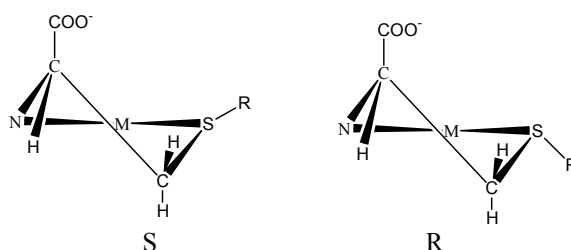
2.2.3. A soft karakterű Pd(II)ionok komplexei

Tioétercsoportot tartalmazó peptidek Pd(II)- és Pt(II)komplexei különösen érdekesek, hiszen e fémionok soft karakterének megfelelően a kénatom erősen koordinálódik és emellett a Pd(II)ion hatása a legnagyobb az amiddeprotonálódást indukálni képes fémionok közül.

Az S-metil-cisztein és a metionin aminosav komplexeinek NMR és IR spektroszkópiás vizsgálata során kimutatták, hogy a 3d átmenetifém-ionokkal ellentétben a tioéterkén a fő kötőhely, amely mellett az aminonitrogén koordinálódik. A karboxilátcsoport koordinációja kizárható a ^{13}C NMR vizsgálatok eredményei alapján¹¹⁸ illetve ezt támasztja alá az, hogy az aminosavak és az aminosavészterek analóg komplexeket képeznek.¹¹⁹ Az (NH₂,S) koordináció stabilis öt- illetve hattagú kelátgyűrű kialakulásához vezet S-metil-cisztein illetve metionin esetén.

Metionil- és S-metil-ciszteinil-oldalláncot tartalmazó dipeptidek Pd(II)- és Pt(II)komplexeinek vizsgálata során megállapították, hogy az elsődleges kötőhely szerepét a tioéterkénatom tölti be.¹²⁰⁻¹²³ A tioétercsoportot N-terminális helyzetben tartalmazó dipeptidek esetén szterikus okokból a ligandum három donoratoma (az amino- és az amidnitrogén ill. a tioéterkén) nem koordinálódhat ugyanahhoz a fémionhoz. Ezért igen savas közegben (S,N) kelát képződését feltételezték, ami a megfelelő aminosavra jellemző kötésmód. Majd a fiziológiás pH-tartományban palládium(II)indukált amid-deprotonálódásról számoltak be. Ez a folyamat a tioétercsoportot C-terminális helyzetben tartalmazó dipeptidek Pd(II)komplexei esetén savas közegben lejátszódik, (NH₂,N⁻,S) koordinációjú részecske ([PdAH₁]⁻) képződik, és a karboxilátcsoport nem vesz részt a koordinációban. A GlyMet Pd(II)komplexében az aminocsoport, a deprotonálódott amidnitrogén és a tioéterkén

koordinációját röntgendiffrakciós módszerrel igazolták.¹²⁴ A rendszer NMR spektroszkópiás vizsgálata azt mutatta, hogy a képződő komplexek koordinációs módja függ a fém-ligandum aránytól és az oldat pH-jától. Nagyobb pH-n, ligandumfelesleg esetén az oldatban a szabad peptid, a $[PdAH_1]^-$ összetételű komplex és egy 4N-es biszkomplex van egymással egyensúlyban, amelyben a ligandum az amino- és a deprotonálódott amidnitrogéneken keresztül kötődik a fémionhoz.¹²³



2.6. ábra A δ konformációjú kelátgyűrűben a kénatom konfigurációja

A tioétercsoport koordinációja következtében a kénatom kiralitáscentrummá válik, vagyis a képződő komplex két diasztereomere létezik. A Pd(II)-S-metil-cisztein rendszer NMR spektrumaiban figyelték meg először a diasztereomer komplexekhez tartozó jeleket.¹²⁵ Később valamennyi S-alkil- és aril-ciszteinszármazék és ezen oldalláncot tartalmazó peptid Pd(II)komplexe esetén kimutatták a két diasztereomer jelenlétét. Az 2.6.ábra a képződő izomereket mutatja. Látható, hogy a kénatom S abszolút konfigurációja esetén a δ konformációjú kelátgyűrűben a térbeli gátlás jelentősebb, mint R abszolút konfiguráció esetén. Kimutatták, hogy a két diasztereomer közötti egyensúlyt a kén centrum inverziója kontrollálja. Az S-metil-cisztein származékai esetén a pH illetve a hőmérséklet növelésének hatására a SCH_3 protonok szingulettjei egybeolvadnak. A metionin esetén azonban az NMR spektrumban csak egyetlen jel látható, amely a metilcsoportozhoz rendelhető.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a tioétercsoportot tartalmazó aminosavak és dipeptidek kölcsönhatását Pd(II)ionnal széleskörűen vizsgálták. A képződő komplexek szerkezetére vonatkozóan sok információ áll rendelkezésre, oldategyensúlyi vizsgálatok azonban nem, illetve alig találhatók az irodalomban. A képződő komplexek igen nagy stabilitása következtében stabilitási állandó meghatározására a pH-potenciometria nem használható közvetlenül. A közelmúltban kén tartalmú aminosavak palládium(II)komplexeire vonatkozó állandókat közöltek,

amelyeket spektrofotometriás, illetve közvetett potenciometriás módszerrel határoztak meg, versengő ligandumként egyéb, erősen koordinálódó ligandumot alkalmazva.¹²⁶

Munkánk során egyik célunk a tioétercsoportot tartalmazó peptidek Pd(II)komplexeinek oldategyensúlyi és szerkezeti vizsgálata volt. Ezen fémion esetén a vizsgált ligandumok körét a korábban még nem tanulmányozott metionintartalmú tripeptidek mellett a dipeptidekre is kiterjesztettük, mivel az egyensúlyi adatok az utóbbiak esetén is hiányoztak.

2.2.4. Pb(II)komplexek

Az Pb(II)komplexek sajátosságainak ismertetése során már utaltam a tiolcsoport preferált koordinációjára, melyet például aminosav komplexek esetén többen leírtak. Az Pb(II)-tioéterkén kölcsönhatásra azonban nem találunk adatot az irodalomban. Emellett egyéb oldalláncbeli donoratomot tartalmazó aminosavak vizsgálata is igen hiányos, a belőlük felépülő peptidek komplexeit pedig gyakorlatilag nem vizsgálták.

Emiatt céljaink között szerepelt az Pb(II)-aminosav- és peptidkomplexek széleskörű vizsgálata is. A tioéterkén szerepe mellett tanulmányoztuk más oldalláncbeli donoratomok, nevezetesen a hidroxil- és karboxiloxigén, a tiolkén és az imidazolnitrogén, komplexképződésre gyakorolt hatását is. A fémion nagyfokú hidrolízishajlama miatt a munkát a hidrolízis vizsgálatával kezdtük.

2.3. A hisztidin aminosav szerepe peptidekben

A metalloproteinekben a fémion megkötésében szerepet játszó oldalláncbeli donorcsoportok közül az egyik legfontosabb a hisztidin imidazolcsoportja. Hisztidintartalmú peptidek komplexeit ezért nagyon sokan vizsgálták, az e területre vonatkozó eredményeket egy, a közelmúltban megjelent összefoglaló is tartalmazza.¹²⁷ Ezen erősen koordinálódó donorcsoport jelenlétének hatását az egyszerű peptidekben *Az oldallánc hatása a peptidek koordinációs kémiájára* című alfejezetben (2.1.3.) röviden már ismertettem. A továbbiakban a hisztidintartalmú peptidek komplexei közül csupán a több imidazol-oldalláncot tartalmazó, valamint a védett aminocsoporttal rendelkező peptidek Cu(II)- és Zn(II)komplexeire térnék ki, mivel munkánkhoz ez kapcsolódik szorosabban.

2.3.1. Több hisztidil-oldalláncot tartalmazó peptidek

A legegyszerűbb, több imidazol-oldalláncot tartalmazó peptid a HisHis Cu(II)komplexeit sokan vizsgálták.^{56,128-130} A pH~4-n képződő $[\text{CuHA}]^{2+}$ összetételű komplexben, a HisGly-hez hasonlóan, a ligandum ($\text{NH}_2, \text{N}_{\text{Im}}$) koordinációjú. Majd a $[\text{CuA}]^+$ komplex képződésekor (pH~5-6-n) átrendeződés következik be, a GlyHis $[\text{CuAH}_1]$ komplexéhez hasonlóan, a ligandum három nitrogén donoratomja koordinálódik és az N-terminális hisztidin imidazolnitrogénje újra protonált lesz. Utóbbi donoratom enyhén lúgos oldatban bekövetkező deprotonálódása után a Cu(II)ion negyedik, szabad koordinációs helyére kötődik, $[\text{Cu}_2\text{A}_2\text{H}_2]$ összetételű dimer részecske képződik. A Zn(II)-HisHis rendszerben a peptidnitrogén deprotonálódása nem tapasztalható,¹²⁹ Zn(II)ion esetén a hisztaminszerű koordináció kedvezőbb.

Két tetrapeptid, a HisHisGlyGly és a HisGlyHisGly Cu(II)komplexeit ESR és CD spektroszkópiás módszerrel tanulmányozták.¹³¹ Előbbi esetén a HisHis-hez hasonló viselkedést tapasztaltak, míg az utóbbival a GlyGlyHis-nel megegyező koordinációs mód alakul ki. A GlyHisGlyHis ellenben meglehetősen bonyolult módon reagál a Cu(II)ionnal.¹³² A pH~4-5-n jelenlévő $[\text{CuA}]^+$ összetételű komplexben GlyHis-szerű koordináció valósul meg, amelyet tetragonális geometria jellemez. A C-terminális hisztidin imidazolcsoportjának axiális koordinációja pH~6-n négyzetes piramisos geometriájú $[\text{CuAH}_1]$ komplexet eredményez. Ezt a folyamatot pH~7-n egy további átrendeződés követi, amelynek során torzult trigonális bipiramisos szerkezetű $[\text{CuAH}_2]^-$ komplex képződik, amelynek ekvatoriális síkjában az aminonitrogén és a két deprotonálódott peptidnitrogén található, a két imidazolnitrogén donoratom pedig az axiális kötőhelyeket foglalja el.

A GlyHisGlyHisGlyHisGlyHis pH~5-n a négy imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik a Cu(II)ionhoz, míg nagyobb pH-n a peptidnitrogén deprotonálódását és koordinálódását mutatták ki.¹³³ Polihisztidin esetén is hasonló viselkedést tapasztaltak: semleges pH-n a Cu(II)ion megkötésében a ligandum imidazol- és amidnitrogén donoratomjai is részt vesznek.¹³⁴

A Cu(II)komplexek általános tulajdonságai: sokféle geometria megvalósulhat, köztük torzult szabálytalan szerkezetek is, és az axiális és ekvatoriális ligandumok, donoratomok könnyen helyet cserélhetnek.

2.3.2. N-terminálisan védett hisztidintartalmú peptidek komplexei

A védett N-terminális aminosoprotot tartalmazó peptidek esetén az oldalláncbéli imidazolcsoport horgonydonorként viselkedhet, a fémionhoz koordinálódva előidézheti a peptidnitrogén deprotonálódását.

A GlyHis, GlyGlyHis és GlyGlyGlyHis N-acetil-származékainak Cu(II)ionnal képezett komplexeit potenciometriás és spektroszkópiás módszerrel tanulmányozták.^{135,136} Azt tapasztalták, hogy a komplexképződés a C-terminális imidazolcsoport koordinációjával indul, amit a peptidnitrogén(ek lépcsőzetes) deprotonálódása követ.

A közelmúltban, csoportunkban vizsgálták olyan hisztidintartalmú peptidek (HisGly, GlyHis, GlyGlyHis) Cu(II)komplexeit, melyek aminosoprotját Z-védőcsoporttal, azaz benziloxikarbonilcsoporttal látták el.¹³⁷ Ezen N-védett peptidek enyhén savas oldatban az imidazolnitrogéneken keresztül, egyszerű monodentát ligandumként kötődnek ($[CuA]^+$ és $[CuA_2]$ összetételű komplexek), majd lúgos oldatban az amidnitrogének deprotonálódása és koordinálódása két- illetve háromfajú koordinációt eredményez. Valamennyi vizsgált ligandum $[CuAH_1]$ összetételű komplexében (N_{im}, N^-) koordinációval hattagú kelátgyűrű alakul ki, de amíg a Z-GlyHis-OH és a Z-GlyGlyHis-OH peptidnitrogénje deprotonálódik, addig a Z-His-OH és a Z-HisGly-OH esetén a Z-védőcsoporttal ellátott N-terminális aminosoprot. $[CuAH_2]$ összetételű komplex mindkét dipeptiddel képződik, de szerkezetük jelentősen eltér. A Z-HisGly-OH komplexében a fémion körül erősen torzult szerkezet jön létre: a két deprotonálódott amidnitrogén ekvatoriálisan koordinálódik, az imidazolcsoport pedig hídligandumként kötődik. Ellenben a Z-GlyHis-OH-nel monomerkomplex képződik, a ligandum három nitrogén donoratomja (az imidazol- és két deprotonálódott amidnitrogén) ugyanahhoz a fémionhoz koordinálódik ekvatoriálisan. A Cu(II) - Z-GlyGlyHis-OH rendszerben a második és harmadik amidnitrogén kooperatív deprotonálódásával $[CuAH_3]^{2-}$ összetételű komplex képződik, amelyben négy nitrogén donoratom koordinálódik a réz(II)ionhoz.

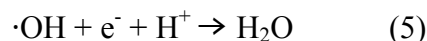
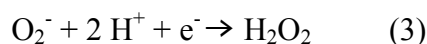
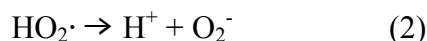
Egy, a vizsgálataink során megjelent közlemény¹³⁸ az acetyl-hisztidil-glicil-hisztidil-glicin (N-AcHisGlyHisGly-OH) Cu(II)komplexeit ismerteti. A $[CuA]^+$ komplexben mindkét imidazolnitrogén ekvatoriálisan koordinálódik a fémionhoz, majd pH~7-n bekövetkezik a peptidnitrogének deprotonálódása és koordinálódása, melynek következtében az egyik imidazolnitrogén kiszorul az ekvatoriális síkból,

axiálisan kötődik a $[\text{CuAH}_2]^-$ komplexben. Igen lúgos oldatban (pH~11) a harmadik amidnitrogén deprotonálódása is bekövetkezik, $[\text{CuAH}_3]^{2-}$ összetételű komplex képződik, melyben négy nitrogén donortom (egy imidazol- és három peptidnitrogén) koordinálódik ekvatoriálisan.

2.4. A szuperoxid-diszmutáz enzimek és lehetséges modelljeik

2.4.1. A szuperoxid anion jelentősége

Az oxigén redukciója során (1-5 reakció) a hidrogén-peroxid (H_2O_2) mellett lépcsőzetes elektron felvétellel két szabad gyök ($\text{HO}_2\cdot$, $\cdot\text{OH}$) is képződik. Fiziológias pH-n a hidroperoxil gyök ($\text{HO}_2\cdot$) (melynek savi disszociációs állandója $\text{pK}_a=4,8$) disszociál, szuperoxid gyökkanion (O_2^-) keletkezik (2 reakció).



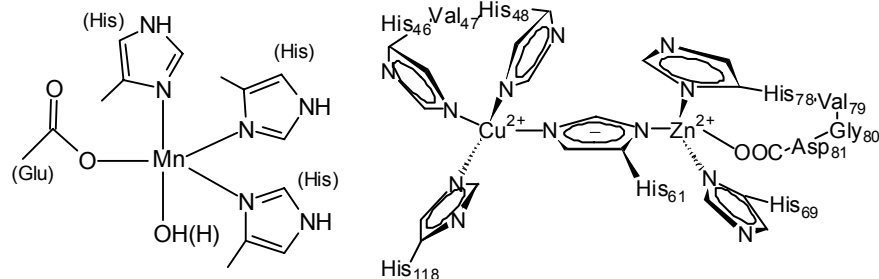
A szuperoxid anion kémiai tulajdonságai jelentősen függenek az oldószertől. Vizes oldatban gyenge oxidálószerként viselkedik, az aszkorbinsavat és a tiolokat oxidálni képes. Redukáló sajátja jelentősebb, számos vaskomplexet képes redukálni, például a citokróm c-t és a vas(III)-EDTA komplexet. Vizes oldatban könnyen diszproporcionálódik, melynek során hidrogén-peroxid és oxigén képződik. A szuperoxid anionnál (O_2^-) a protonált formája, a hidroperoxil gyök ($\text{HO}_2\cdot$) sokkal erélyesebb oxidáló- és redukálószer, de utóbbi fiziológias körülmények között igen kis mennyiségben fordul elő.¹³⁹

A szuperoxid aniont, amely az aerob légzési folyamat köztiterméke, számos enzim is előállítja (pl. xantin oxidáz). Habár az immunrendszerben egyes makrofágok felhasználják a fertőzéssel szembeni védekezés során,¹⁴⁰ alapjában véve a szervezet számára káros hatású. Mivel rövid élettartamú (öndiszproporció), a belőle képződő vegyületek, gyökök, mint a hidrogén-peroxid és a hidroxil-gyök ($\text{OH}\cdot$) oxidatív, sejtkárosító hatása jelentősebb.¹⁴¹ Ezen szabadgyökök túltermelődése olyan betegségek kialakulásához vezethet, mint a szívinfarktus, az

izületi gyulladás, a rák illetve egyes idegrendszeri rendellenességek, mint a Parkinson kór. Mindez molekuláris szinten azzal magyarázható, hogy a perhidroxilgyök ($\text{HO}_2\cdot$), vagyis a protonált szuperoxid anion, a lipidmembrán autooxidációjának szelektív inhibitora,¹⁴² másrészt mutagén hatású, a DNS helyspecifikus hasadásához vezet.¹⁴³

2.4.2. A szuperoxid-diszmutáz (SOD) enzimek típusai

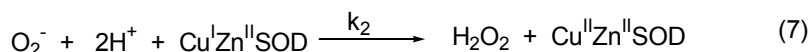
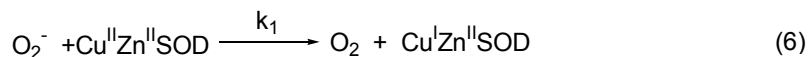
A szuperoxid-diszmutáz enzimek két csoportba sorolhatók. Az egyik csoportba tartoznak a mangánt (MnSOD) illetve vasat (FeSOD) tartalmazók. Az előbbi valamennyi aerob sejtben megtalálható, az emlősök esetén a mitokondriumokban, míg az utóbbit egyes baktériumokból és növényekből izolálták. A protein aminosavszekvenciájában és az aktív centrumban nagyfokú hasonlóság figyelhető meg: a fémionhoz három hisztidin imidazol-oldallánca és egy aszparaginsav karboxilátcsoportja mellett egy vízmolekula vagy egy hidroxidion koordinálódik, trigonális bipiramisos elrendeződés jön létre.¹⁴⁴ (2.7. ábra)



2.7. ábra A MnSOD és a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumának szerkezete

Külön csoportot képeznek a réz és cinket együttesen tartalmazó enzimek (Cu,Zn-SOD), melyek az eukarióták sejtplazmájában találhatóak. Szerkezetük jelentősen eltér az előző csoportra jellemzőtől. A Cu,Zn-SOD oxidált formájának röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálata azt mutatta, hogy ezen enzim két egyforma alegységből áll, melyeket hidrofób kölcsönhatás tart össze. Mindkét alegység egy réz(II) és egy cink(II)iont tartalmaz. A Cu(II)ionhoz négy hisztidin-oldallánc imidazolnitrogénje koordinálódik tetragonális piramisos elrendeződésben, míg a Zn(II) körül torzult tetraédes geometria alakul ki három imidazolnitrogén és egy karboxilát oxigén kötődésével. Az egyik imidazol-oldallánc mindkét fémionhoz

koordinálódik, hídligandumként köti össze őket. A két fémion távolsága $6,3\text{\AA}$.¹⁴⁵⁻¹⁴⁶ (2.7.ábra) A cinkionnak valószínűleg szerkezetalakító szerepe van, a rézion vesz részt a katalitikus ciklusban, az alábbiak szerint:



A reakció mechanizmusára vonatkozóan egymásnak ellentmondó adatokat találunk. Az imidazolato-híd felbomlását valószínűsítik a (6) reakciólépésben, bár bizonyos kísérleti körülmények között (, például nagy szuperoxid koncentráció mellett) az eredmények ennek ellentmondani látszanak.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹

Napjainkban felfedeztek nikkelt tartalmazó SOD enzimeket is.¹⁵⁰⁻¹⁵²

2.4.3. A SOD enzim modelljei

A természetes enzimfunkciót utánzó kismolekulatömegű vegyületek, szintetikus enzimek a betegségek kezelése során potenciális gyógyszerek lehetnek. A SOD aktivitással rendelkező fémkomplexek közül csak a Cu,Zn-SOD modellekre térek ki részletesebben, mivel a témánkhoz ez kapcsolódik szorosabban. A vas- és mangánkomplexek tekintetében csupán egy összefoglalót emelnék ki, amely általános szempontokat, illetve a SOD aktivitás mérés módszereit is tartalmazza.¹⁵³

A réztartalmú enzimek közül kizárólag a Cu,Zn-SOD-okra jellemző, hogy egy imidazol-oldallánc hídként köt össze két fémiont. A vizsgált lehetséges enzimmodellek egy nagy csoportjába azok a komplexek sorolhatók, amelyekben hasonló imidazolhíd található. Akkor várható nagy enzimaktivitás, ha az imidazolhidas szerkezet minél nagyobb pH-tartományban stabil, az enzim működésére jellemző pH-n is. A réz- és cinkiont tartalmazó heterodinukleáris komplexek mellett számos homodinukleáris komplexet is előállítottak, amelyben mindkét fémion réz(II) volt. A modellkomplexek egy jelentős hányadában a hídligandum szerepét egy imidazolmolekula tölti be. Ezen komplexek [LCuImMeL] formában írhatók fel, ahol Me egy Cu(II), vagy egy Zn(II)iont jelöl.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Számos olyan példát találunk az irodalomban, amelyben a két fémionhoz egyetlen, többnyire makrociklusos vagy makrobiciklusos ligandum koordinálódik.^{157,158} Az imidazolhíd lehet a koordinálódó ligandum része is.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ Emellett olyan komplex esetén is jelentős SOD aktivitásról számoltak be, amelyben a két fémioncentrumot nem

imidazolhíd köti össze, hanem a koordinálódó ligandum viszonylag merev szénlánc.¹⁶²

Számos monomer réz(II)komplex SOD aktivitását is vizsgálták. Ezen belül jelentős számú közlemény nitrogén donoratomokat tartalmazó Schiff-bázis ligandumokkal foglalkozik.¹⁶³⁻¹⁶⁷ Egy másik csoportba az aromásnitrogén donoratomot tartalmazó ligandumok komplexei sorolhatók.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰

Általánosan elmondható, hogy a kétmagvú komplexek esetén nagyobb enzimaktivitás tapasztalható, mint egymagvú komplexek esetén. Azonos koordinálódó donoratomokat tartalmazó nyíltláncú és makrociklusos szerkezetű ligandum közül az utóbbi komplexének hatása jelentősebb. A makrociklusos és makrobiciklusos vegyületeket összevetve azt tapasztalták, hogy a makrobiciklussal képződő komplex szélesebb pH-tartományban stabil. Annál nagyobb SOD aktivitást tapasztaltak, minél jobban hasonlított a komplex szerkezete az enzimbélihez.

Az eddig említett modellkomplexekben az enzimen a fémion körül kialakuló geometriát próbálták megvalósítani, de a koordinálódó donoratomok természete többnyire különbözött a Cu,Zn-SOD-ban találhatóétól. Egy másik lehetséges megközelítés a fehérjemolekula modellezése peptidek segítségével. Ugyan az egyszerű, oldalláncban koordinálódó donorcsoportot nem tartalmazó dipeptidek $[\text{CuA}]^+$ összetételű komplexei is mutatnak kismértékű szuperoxid-diszmutáz aktivitást,^{171,172} de hisztidintartalmú oligopeptidek esetén ez a hatás sokkal jelentősebb.¹⁷³

Az enzimhez hasonló szerkezetű és koordinációs módú komplex esetén jelentős enzimaktivitást várhatunk, tehát a ligandumok Cu(II) és Zn(II)ionnal képezett komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata segítségünkre lehet potenciális SOD mimetikus komplexek kiválasztása során. A 2.7. ábrán jól látható, hogy a Cu,Zn-SOD enzimben a rézhez és a cinkhez koordinálódó két-két donoratom a peptidszekvenciában egymáshoz közel elhelyezkedő aminosavak oldalláncában található, amelyek a rézkötőhely esetén egy tripeptiddel (HisValHis), míg a cinkkötőhely esetén egy tetrapeptiddel (HisValGlyAsp) modellezhetők. Ezen két peptid Cu(II)- és Zn(II)ionokkal való kölcsönhatását laboratóriumunkban Prof. Nick Hadjiliadis kutatócsoportjával való (University of Ioannina, Görögország) együttműködés keretén belül pH-potenciometriás és spektroszkópiás (spektrofotometria, ESR, NMR) módszerekkel vizsgálták.^{174,175} A Cu(II)-HisValHis rendszer esetén a $[\text{CuAH}]^{2+}$ és a $[\text{CuA}]^+$ komplexben hisztaminszerű koordináció alakul ki, az utóbbi esetén emellett mindkét imidazolnitrogén részvételével

makrokelát is képződik, az enzimmal analóg módon. Ez gátolja az amidnitrogén deprotonálódását, így az magasabb pH-n játszódik le, de fiziológias pH-n az oldatban már a $[\text{CuAH}_2]^-$ összetételű, $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}})$ koordinációjú komplex létezik. A Zn(II)-HisValGlyAsp rendszerben szintén hisztaminszerű koordinációjú részecskéket feltételeztek, az enzimhez hasonló makrokelát $(\text{N}_{\text{im}}, \text{COO}^-)$ koordinációval nem alakul ki.

Védett amino- és karboxilcsoporttal rendelkező peptid esetén várható, hogy a képződő komplexek szerkezete közelebb áll az enzim aktív centrumára jellemzőhöz, nagyobb enzimaktivitást mutat, mint a szabad terminusokkal rendelkező. Korábban például a HisGlyHisGly szabad aminocsoporttal rendelkező, illetve N-acetilezett származékának Cu(II)ionnal képződő komplexei esetén az antioxidatív sajátság vizsgálata során az N-védett peptid komplexe sokkal nagyobb szuperoxid diszmutáz aktivitást mutatott in vitro.¹⁷⁶

Ezen eredmények fényében a korábban vizsgált tri- és tetrapeptid (HisValHis és HisValGlyAsp) védett láncvégi amino- és karboxilcsoporttal rendelkező származékát állítottuk elő, majd Cu(II)- és Zn(II)komplexeiket tanulmányoztuk.

3. Kísérleti körülmények és vizsgálati módszerek

3.1. A használt vegyszerek

A munka során használt vegyszerek ismertetését a ligandumokkal kezdem az altémák szerinti csoportosításban.

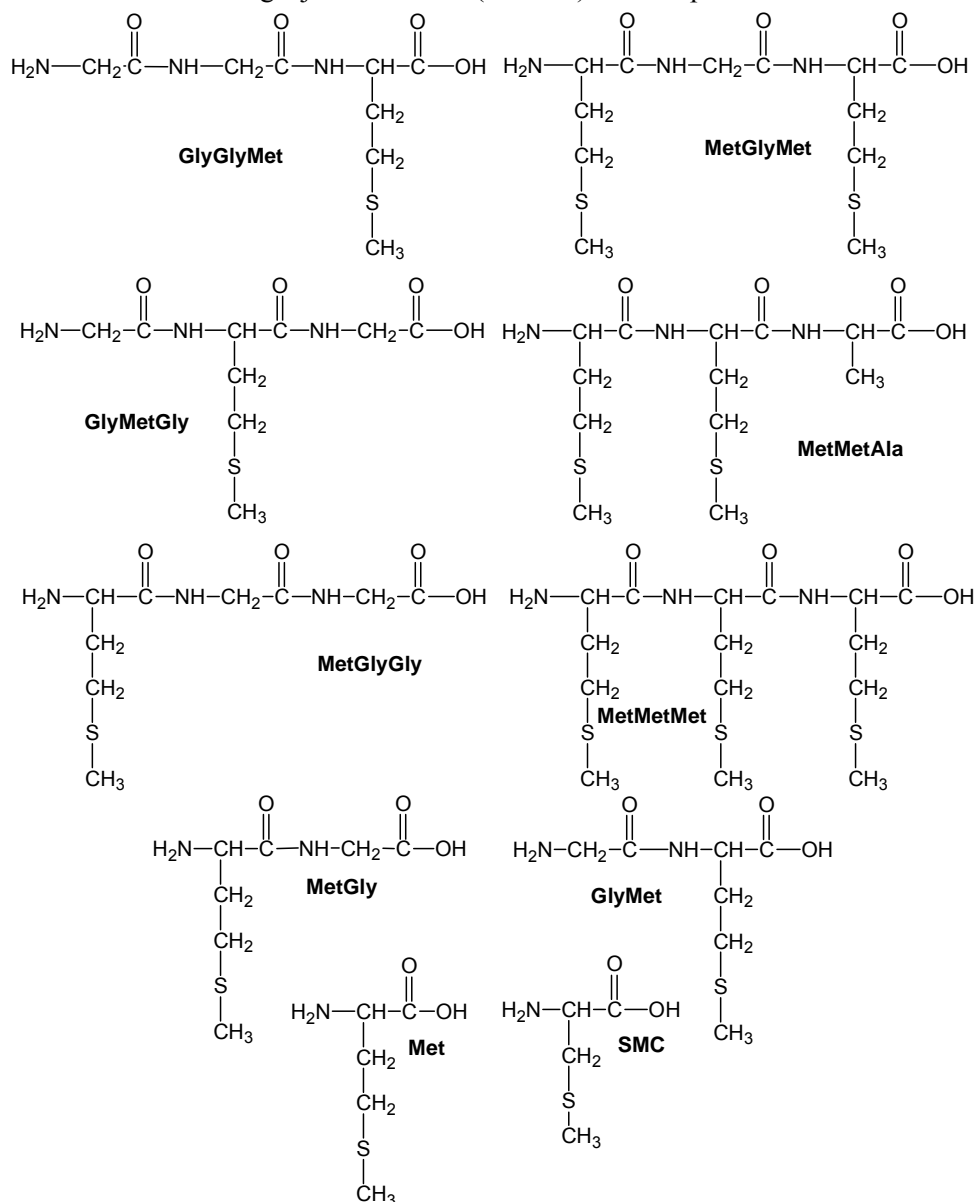
A tioétercsoport komplexkéimiai viselkedésének tanulmányozásához különböző számban és helyzetben metionint tartalmazó di- és tripeptideket (GlyMet, MetGly, MetGlyGly, GlyMetGly, GlyGlyMet, MetGlyMet, MetMetAla, MetMetMet) választottunk (3.1. ábra).

Az Pb(II)ion esetén a vizsgált ligandumok körét tioétercsoportot tartalmazó aminosavakra (metionin (Met) és S-metil-cisztein (SMC)) is kiterjesztettük. Emellett más oldalláncbeli donorcsoportok (hidroxil- és karboxiloxigén, tiolán és imidazolnitrogén) komplexképződésre gyakorolt hatását is vizsgáltuk, valamint a legegyszerűbb aminosavat és di- ill. tripeptideket (Gly, GlyGly és GlyGlyGly) is tanulmányoztuk összehasonlítás céljából (3.2. ábra). Alkoholos-hidroxil csoportot tartalmazott a szeril-glicin (SerGly). Amíg a karboxilát oxigén az aszparaginsavban (Asp) és az aszparagil-glicinben (AspGly) kelátképző helyzetben van, addig a glicil-aszparaginsav (GlyAsp), glicil-glutaminsav (GlyGlu) és glutamil-glicin (GluGly) esetén ez a stabilitásnövelő hatás kizárt. A tiolán koordinációját az α -merkaptopropionil-glicin (MPG), a ciszteinil-glicin (CysGly), és az alanil-cisztein (AlaCys) komplexein keresztül tanulmányoztuk. A hisztidin oldalláncában lévő imidazolnitrogén hatását a hisztidil-glicin (HisGly) és a glicil-hisztidin (GlyHis) dipeptidek és a hisztidin (His) aminosav esetén vizsgáltuk.

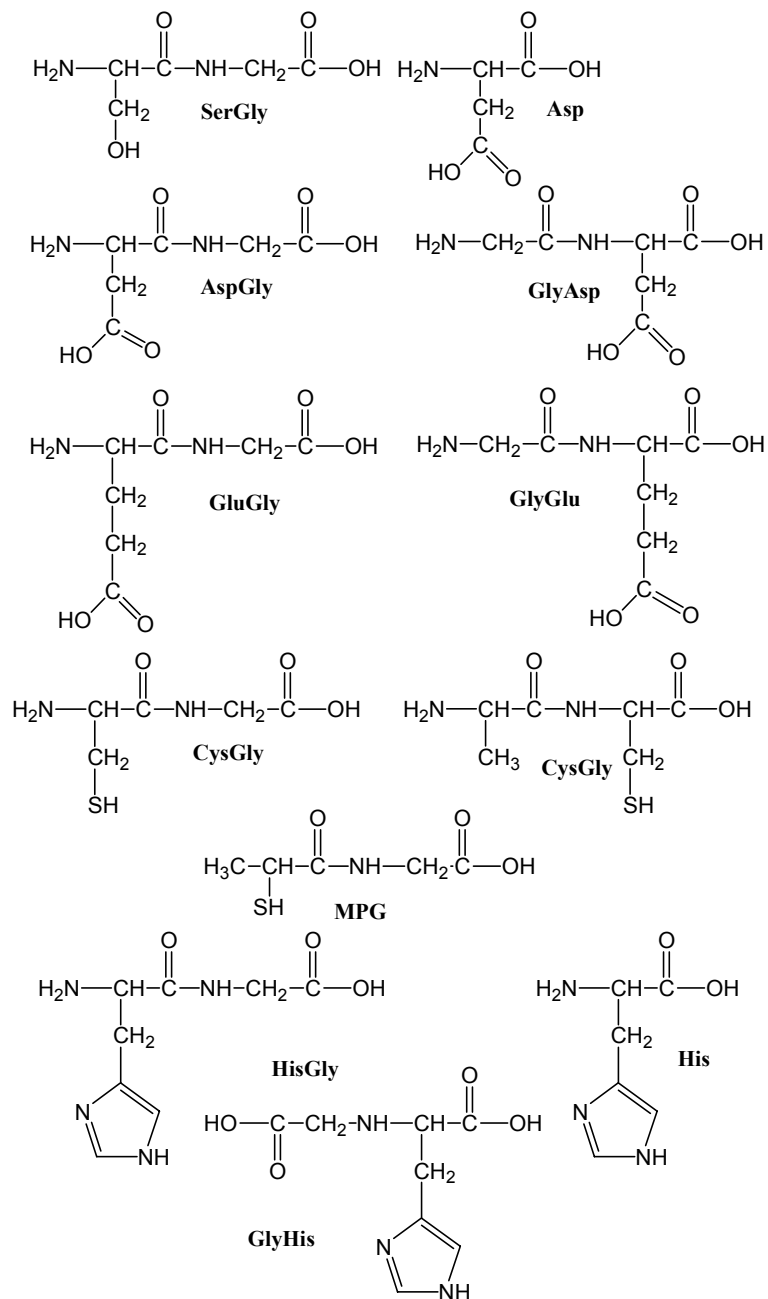
Valamennyi eddig említett peptid és aminosavszármazék kereskedelmi forgalomban hozzáférhető, mi a Bachem cégtől vásároltuk őket optikailag tiszta (L) formában. A vegyületek hatóanyagtartalmát minden esetben sav-bázis titrálással ellenőriztük.

Az SOD enzim aktív centrumát modellező peptidok témakörben két C- és N-terminálisan védett peptid (3.3. ábra), az N-acetil-hisztidil-valil-hisztidinamid (AcHVH₂NH₂) és az N-acetil-hisztidil-valil-glicil-aszparaginsavamid (AcHVGD₂NH₂) réz- és cinkkomplexeit vizsgáltuk. Ezen kereskedelmi forgalomban nem kapható vegyületeket a ioanninai (University of Ioannina, Greece) egyetemen szilárdfázisú peptidszintézissel állítottam elő. A CBL Chemicals Ltd. (Patras, Greece) szállította a szintézishez felhasznált gyantát (H-Linker-CLTR resin, azaz módosított 2-klórritil-klorid gyanta) és a védett aminosavakat (Fmoc-His(N^{im})-Mtt)-

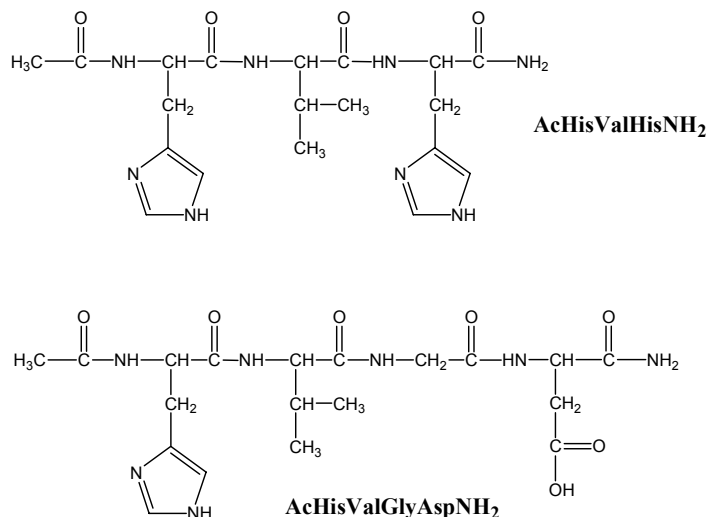
OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asp(O-Bu^t)-OH). A Fmoc rövidítés az α -aminocsoport átmeneti védésére szolgáló fluoren-9-il-metoxi-karbonilcsoportot jelöli. Az aszparaginsav oldalláncbéli karboxilcsoportját tercier-butil(Bu^t), míg a hisztidin imidazolnitrogénjét 4-metiltritol(N^{im}-Mtt) védőcsoporttal látták el.



3.1. ábra A tioétercsoportot tartalmazó ligandumok szerkezeti képletei



3.2. ábra Az Pb(II)ion esetén vizsgált ligandumok szerkezeti képletei



3.3. ábra A CuZnSOD aktív centrumát modellező peptidok szerkezeti képletei

A fém törzsoldatok közül a CuCl_2 , NiCl_2 , CoCl_2 , $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ és $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ oldat alt. minőségű vegyszerből készült, míg a ZnCl_2 törzsoldatot alt. ZnO sósavban történő oldásával kaptuk. Mivel a PdCl_2 nem vízoldható anyag, a $\text{Pd}(\text{II})$ törzsoldatot a tanszéken előállított szilárd kálium-tetrakloro-palladátból készítettük, a palládiumion hidrolízisének visszaszorítása céljából a fémionhoz képest kétszeres anyagmennyiségű savat adva az oldathoz. A szilárd K_2PdCl_4 -ot PdCl_2 (alt., Reanal) két ekvivalens KCl jelenlétében történő oldásával, majd bepárlásával nyertük, tisztaságát atomabszorpciós módszerrel ellenőriztük.¹⁷⁷

A fémion pontos koncentrációjának meghatározása a $\text{Pd}(\text{II})$ és a $\text{Pb}(\text{II})$ törzsoldat kivételével gravimetriásan, oxinát formájában történt. Az $\text{Pb}(\text{II})$ esetén komplexometriás módszert, EDTA mérőoldatot és metiltimolkék indikátort alkalmaztunk (pH~6, hexametilén-tetramin).

A ZnCl_2 oldat savtartalmát Gran szerinti kiértékelést alkalmazva, pH-potenciometriásan határoztuk meg.

3.2. Peptidszintézis¹⁷⁸

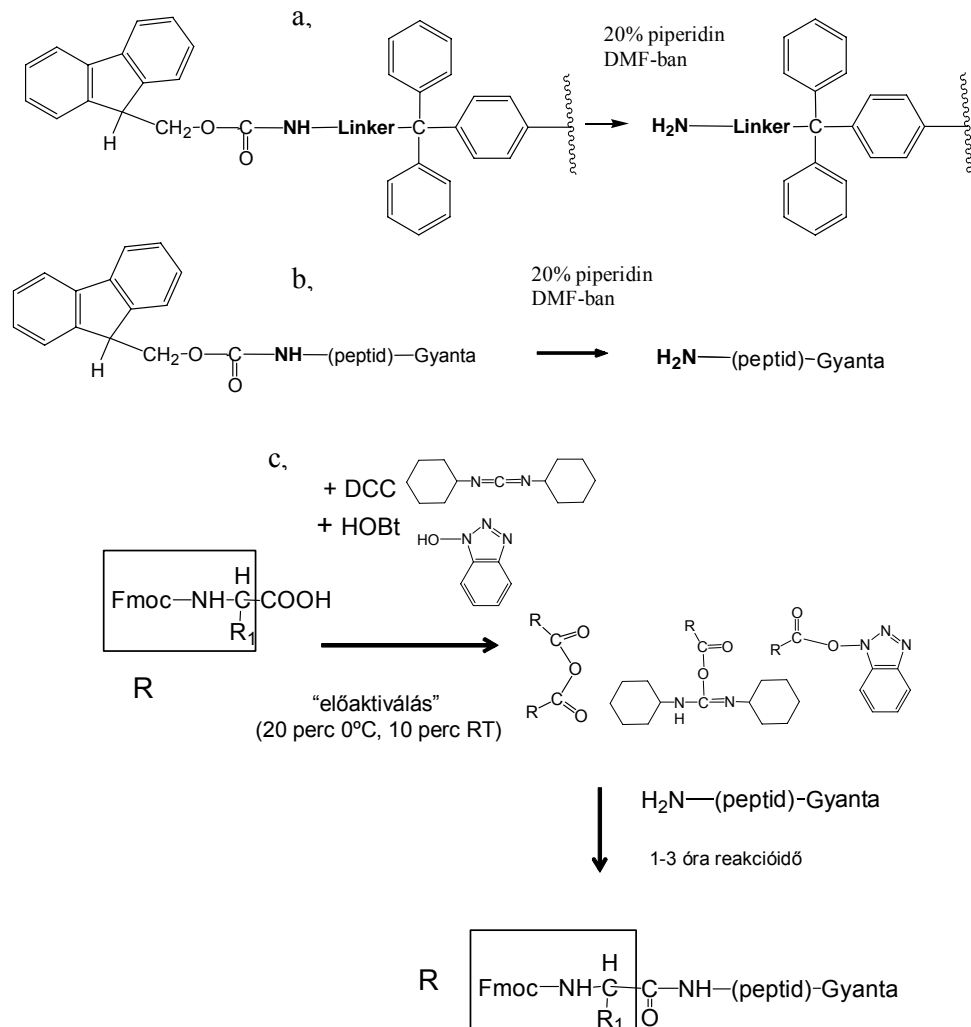
A peptidok szintézise a felépítő aminosavakból kiindulva történik, melyeknek több reaktív funkciócsoportja van (amino- és karboxilcsoport, valamint az oldalláncbéli csoportok), ennek megfelelően többféleképpen reagálhatnak. A peptidszintézis során biztosítani kell az egyértelmű reakciót, ezért azokat a

csoportokat, melyek reakciója zavarva, védeni kell. A klasszikus, oldatfázisú laboratóriumi szintézis igen időigényes, s az egyes lépések során az anyagvesztés sem elhanyagolható.

Jelentős előrelépést jelentett a Merrifield-féle szilárdfázisú peptidszintézis elterjedése, mivel lehetővé tette a klasszikus szintézis számos lépésének kiküszöbölését, a folyamat gyorsítását és hatékonyságának jelentős növelését. A módszer során a szintézis egy szilárd hordozóhoz kötötten történik, amely inkább nevezhető gélnek, mint szilárd anyagnak. Általában divinil-benzén–sztirén kopolimert használnak erre a célra. Oldószerként minden olyan, többnyire szerves oldószer használható, amelyben a gyanta jól duzzad, vagyis a reaktánsok diffúzióval bejuthatnak a szemcsékbe, illetve a melléktermékek elhagyhatják azt. Mi dimetilformamid (DMF) közeget alkalmaztunk.

A kopolimer módosításával kötőhelyeket alakítanak ki, melyekhez a szintetizálendő peptid első aminosava kapcsolható. A gyanta elnevezése erre a funkciócsoportra utal. Például a CLTR gyanta esetében a 2-klorotritil-klorid csoport és az N-védett aminosav reakciója során észterkötés alakul ki. Ezt a kötést csak a szintézis legvégén, a kész peptid lehasításakor bontjuk fel, amely így szabad karboxilcsoportot eredményez. Mivel C-terminuson (amid formában) védett peptidet akartunk előállítani, az előbb említett gyanta egy módosított változatát (H-Linker-CLTR gyanta) használtuk, amelyben aminocsoport tölti be a kötőhely szerepét. A gyanta azonban Fmoc csoporttal védve kapható, melyet a szintézis megkezdése előtt el kell távolítani (3.4.a ábra). Emiatt az első aminosav kapcsolása során is ugyanazokat a lépéseket kell elvégezni, mint a peptidlánc hosszabbításakor: vagyis a védőcsoport eltávolítása a gyanta (illetve a gyantán lévő peptid) aminocsoportjáról (3.4.b ábra), majd az N-védett és előzőleg aktivált aminosav hozzákapcsolása (3.4.c ábra).

A szilárdfázisú peptidszintézis előnyei közé tartozik, hogy a szintézis közben a reagensek feleslege és a képződött melléktermékek egyszerűen, mosással eltávolíthatók a szilárd hordozóhoz kapcsolt peptid mellől. Ez a következő módon történt: minden reakciólépés után többször felváltva DMF-al és izopropanollal mostuk a gyantát, majd megszáritottuk vákuum alatt. A száradást elősegítendő etanollal majd metanollal ámostuk a szemcséket. A reakció teljességét (a száraz szemcsékkel végzett) Kaizer teszttel ellenőriztük. A szemcsék színváltozása (sárga→kék) szabad aminocsoportra utal. Ha a teszt nem a várt eredményt hozta, megismételtük a reakciólépést.



3.4. ábra A peptidszintézis lépései

a, a gyanta előkészítése b, a védőcsoport eltávolítása c, aktiválás és csatolás

Az aminos csoport átmeneti védésére használt Fmoc-csoport egyszerűen, szekunder aminos kezeléssel eltávolítható. 20% piperidin DMF-os oldatával kb. 40 perc elegendő a reakció lejátszódásához.

A mellékreakciók elkerülése érdekében N-terminuson védett aminosavat kapcsolás előtt aktiváljuk, ellenkező esetben a reakció nagyon lassan játszódna le. Csatoló ágensként diciklohexil-karbodiimidet (DCC) és szekunder nukleofilként

hidroxi-benzotiazolt (HOBt) adunk feleslegben az aminosavhoz. A képződő aktivált köztitermékek szerkezete is látható a 3.4.c ábrán. Az előaktiváláskor az aminosav és a hidroxi-benzotriazol előzőleg 0°C-ra lehűtött oldatában oldjuk a DCC-t, s 20 percig 0°C-on, majd 10 percig szobahőmérsékleten hagyjuk állni az oldatot, végül szűrés után a gyantához adjuk. A peptidkötés kialakulásához 1-3 óra szükséges.

Ez a két lépés (vagyis a védőcsoport eltávolítása a szintetizált peptid aminocsoportjáról, majd a következő aminosav aktiválása és csatolása) annyiszor ismételendő, ahány aminosavból álló peptidet akarunk előállítani.

A szintézis utolsó lépését, vagyis a gyantáról való lehasítást megelőzően a peptid aminocsoportját védőcsoporttal láttuk el, hiszen N-acetil-peptid-amid előállításra volt a célunk. Az acetyl csoport felvitele a vegyületre két lépésből állt, először eltávolítottuk a Fmoc védőcsoportot a már ismertetett piperidines eljárással, majd az így kapott szabad aminocsoportot ecetsavanhidrid és N,N-diizopropil-etilamin (DIEA) segítségével acileztük. A reakció elősegítése céljából a reaktánsokat a peptidhez képest 1,2-szeres feleslegben alkalmaztuk, így a reakcióidő kb. 1 óra volt.

A kész peptidet 95% trifluor-ecetsav (TFA) és 5% anizol elegyével hasítottuk le a gyantáról. Ezzel egyúttal az oldalláncbeli (His, Asp) védőcsoportokat is eltávolítottuk. 1-3 óra reakcióidő elteltével a gyantát szűréssel eltávolítottuk. A gyantát a hasítókeverék kisebb mennyiségeivel még kétszer reagáltattuk, "átmostuk", hogy a peptidvesztés minél kisebb legyen, majd a szűrletet vákuum segítségével szárazra pároltuk. A kapott olajos állagú anyagból hideg éterrel egy éjszakán át kevertetve a peptid fehér por formájában kinyerhető, majd az éteres fázistól centrifugálással elválasztható. Éterrel néhányszor átmostuk, majd vákuum alatt szárítottuk az anyagot.

A tisztítást HPLC-vel végeztük. A P580 pumpával és UVD 170S/340S UV-látható detektorral felszerelt DIONEX HPLC készülékhez WATERS Delta Pak C-18 (300 Å, 15 µ, 300×19 mm) preparatív oszlopot csatlakoztattunk. A tisztítandó anyagot 1:1 víz-acetonitril elegyben oldottuk, melyhez TFA-t is adtunk. Egy injektálással kb. 10 mg peptidet juttattunk az oszlopra. Az eluensként alkalmazott oldószerekhez pufferként 0,1% TFA-t adtunk. 10 ml/perc eluensáramot és víz-acetonitril gradienst alkalmaztunk az alábbi program szerint: Kezdetben az eluens 1% acetonitrilt tartalmazott. Az eluens acetonitriltartalmát a kezdeti 1%-ról 40 perc alatt 80%-ig növeltük, majd a következő 10 percben 80%-ról 1%-ra csökkentettük. A 230 nm hullámhosszhoz tartozó abszorbanciát fotometriásan követtük.

Abszorbancianövekedést észlelve gyűjtöttük az elegyet. A nyomástól függően 12-24 perc elteltével megfigyelhető csúcshoz tartozó frakció tartalmazta a peptidet (a retenciós idő mindkét peptid esetén közel azonos volt).

A kapott oldatot vákuum segítségével bepárooltuk, s az így nyert anyagot éterrel egy éjszakán át kevertettük, majd centrifugálással izoláltuk, végül vákuum alatt szárítottuk. A kapott szilárd anyag tisztaságát $^1\text{H-NMR}$ -el ellenőriztük.

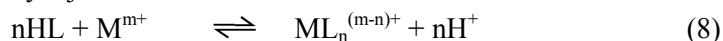
3.3. Az alkalmazott kísérleti technikák

3.3.1. pH-potenciometria

A pH-potenciometriás mérés elvi alapjai

A pH-potenciometria az oldatfázisban lejátszódó komplexképződési folyamatok egyensúlyi vizsgálata során legáltalánosabban alkalmazott kísérleti módszer. Alkalmazhatóságának feltétele, hogy a fémion koordinációja hatással legyen a ligandum protonálódási egyensúlyára, vagyis a komplexképződés pH-effektussal járjon.

A vizsgált deprotonált ligandumok gyenge bázisok, vagyis a komplexképződés kompetitív reakciót jelent a proton és a fémion között, mely az alábbi általános egyensúllyal jellemezhető:



A pH mérésével a képződő komplexek stabilitására következtethetünk. A komplexképződésre az alábbi általános egyenlet írható fel (az egyszerűség kedvéért a töltéseket nem tüntettem fel):



ahol M a fémiont (amely a vizsgált teljes pH-tartományban állandó szerkezetű, stabilis komplex is lehet), L a teljesen deprotonált ligandumot és H a hidrogéniont jelöli.

A képződő részecskék stabilitási szorzata:

$$\beta_{pqr} = \frac{[\text{M}_p\text{A}_q\text{H}_r]}{[\text{M}]^p [\text{A}]^q [\text{H}]^r} \quad (10)$$

A mérések során ún. titrálási görbéket veszünk fel, vagyis a fémiont és ligandumot tartalmazó mintákhoz kis részletekben ismert koncentrációjú lúgoldatot adagolunk, majd az egyensúly beállta után rögzítjük a mérőoldat térfogat (cm^3)-pH

adatpárokat. A titrálási adatokból a stabilitási szorzatokat a Tanszéken kifejlesztett PSEQUAD nevű számítógépes programmal¹⁷⁹ számítottuk ki. Bemenő adatként a mérőoldat térfogat–pH adatpárok mellett meg kell adnunk a komponensek és az asszociátumok (a ligandum különböző protonáltsági fokú részecskéi, $M_pA_qH_r$ komplexek ill. hidroxokomplexek) számát, az asszociátumok összetételét (vagyis a p, q, r sztöchiometriai együtthatókat), a stabilitási szorzatok ismert illetve ismeretlen (közelítő) értékeit, a komponensek kiindulási teljes koncentrációit, a titrálóoldat koncentrációját valamint különböző állandókat, mint pl. a vízionszorzat és a mérőegységre jellemző Irving-féle korrekciós tényező.¹⁸⁰ A keresett stabilitási szorzatok értékeit a komponensekre felírt anyagmérleg egyenletek (11-13) megoldásai adják (n a rendszerben képződő asszociátumok száma, p, q, r a sztöchiometriai együtthatók).

$$c_M = [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{pqr} [M]_i^p [A]_i^q [H]_i^r \quad (11)$$

$$c_A = [A] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{pqr} [M]_i^p [A]_i^q [H]_i^r \quad (12)$$

$$c_H = [H] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{pqr} [M]_i^p [A]_i^q [H]_i^r \quad (13)$$

Amennyiben vegyes ligandumú rendszereket vizsgálunk, a komponensek száma eggyel nő a második ligandum miatt, így négy komponensre írható fel az anyagmérleg.

A program a kiindulási adatokat felhasználva Newton-Raphson iterációval végzi a közelítést addig, míg a titráló oldatra nézve a $\Sigma(V_{\text{mért}} - V_{\text{számolt}})^2$ kifejezés értéke minimumot nem ér el (V a titrálóoldat térfogata). A program minden megadott pH-értéknél kiszámolja az összes képződő részecske egyensúlyi koncentrációját és a hozzátartozó standard deviáció értékét. Az iterációsorozat végén megkapjuk a finomított stabilitási szorzatokat és azok hibáját, valamint az un. illesztési paramétert, amely a $|V_{\text{mért}} - V_{\text{számolt}}|$ átlaga, s a közelítés jóságát jellemzi. (A stabilitási állandók közlésekor az utolsó tizedesjegy hibáját zárójelben tüntetjük fel.) A program egy adott komponensre vonatkozóan megadja az asszociátumok koncentrációeloszlási görbéit a pH függvényében. A koncentrációeloszlás számolására a SED nevű program is használható a képződő komplexek összetétele és stabilitási állandója, valamint a komponensek teljes koncentrációjának ismeretében.¹⁸¹ Egy adott rendszer modelljének a feltételezett asszociátumok

összességét nevezzük. Azt a modellt tekintjük helyesnek, mely kémiai megfontolások alapján értelmezhető, és amelynél az illesztési paraméter a legkisebb.

A pH-potenciometria az egyik legfontosabb komplexkémiai vizsgálati módszer, de vannak hiányosságai. A mért paraméter (pH) a rendszer egésze, valamennyi részecske által befolyásolt mennyiség. Ha két részecske képződése azonos pH-effektussal jár, akkor azok nem különböztethetők meg ezzel a módszerrel. Egyes esetekben egy rendszer többféle, kémiaiailag reális modellel is leírható, ilyenkor más, szerkezeti információkat nyújtó vizsgálatokat (pl. spektrofotometria, NMR, ESR) is végzünk a kérdés tisztázására.

A pH-potenciometriás méréseknél alkalmazott eszközök, kísérleti körülmények

Valamennyi vizsgált ligandum és komplexeik vízoldhatók, ezért a vizsgálatokat vizes közegben végeztük. A ligandumtörzsoldatokat a szilárd vegyszerek bemérésével készítettük. A ligandumok tisztaságát és savi disszociációs állandóit független méréssel, csak ligandumot tartalmazó mintákban határoztuk meg. A kiértékeléshez a SUPERQUAD nevű programot¹⁸² használtuk, mely a stabilitási szorzatok mellett a kiindulási ligandum- és protonkoncentrációk finomítására is alkalmas.

A méréshez $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ koncentrációjú, karbonátmentes KOH-oldatot használtunk, melynek pontos koncentrációját $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ koncentrációjú káliumhidrogén-ftalát (alt., Reanal) oldat titrálásával határoztuk meg. A vizsgálatokhoz használt $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ koncentrációjú HCl és HNO₃-oldatokat koncentrált savból (alt., Reanal) hígítással készítettük, pontos koncentrációjukat a már ismert töménységű lúgoldattal mértük. A lúg- és a savkoncentráció meghatározása a titrálási görbék Gran-féle linearizálásával¹⁸³ történt.

A mérések során a hőmérséklet állandó $25\pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tartását ultratermosztát segítségével valósítottuk meg. A minták keverése valamint a széndioxid és az oxigén távoltartása céljából katalitikusan tisztított argongázt buborékoltattunk át a mintákon. Az ionerősséget minden mintában $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ -re állítottuk be a fémiontól függően KCl és/vagy KNO₃ oldattal.

A Pd(II) esetén a pH-potenciometriás vizsgálatokhoz számítógép (PC) vezérelte Radiometer ABU91 automata burettát és a Russel cég által gyártott CWR/320/757 típusú kombinált üvegelektrodot használtunk. A többi fém esetén a KOH titrálóoldatot METROHM 715 DOSIMAT típusú automata burettával adagoltuk. Az Pb(II) fémionnal végzett vizsgálatok során METROHM 6.0219.100 double-junction

típusú elektródát és RADIOMETER PHM93 pH-mérőt alkalmaztunk. A double-junction elektróda külső elektrolitja telített KNO_3 volt, így kiküszöbölhetővé vált a kloridionok zavaró hatása. A többi esetben RADIOMETER PHM84 pH-mérőt és METROHM 62104130 kombinált üvegelektrodát használtunk.

A mérőrendszert $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldatra ($t=25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH}=4,005$) és a vízionszorzat értékére ($t=25 \text{ }^\circ\text{C}$, $I=0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl, $\text{pK}_w=13,756\pm 0,01$, ill. $I=0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KNO_3 , $\text{pK}_w=13,772\pm 0,01$) kalibráltuk. A pH-mérő által kijelzett értékek $\text{p}[\text{H}^+]$ -ra való átváltása az Irving¹⁸⁰ és munkatársai által kidolgozott módszerrel történt.

A méréseket 1:1, 1:2 és 1:3 fém-ligandum arány mellett végeztük. Többnyire a ligandum koncentráció volt állandó, $4\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. A Pd(II)-peptid rendszerek esetén azonban a fémion kiindulási koncentrációja volt azonos, minden mintában $2,5\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. A minták térfogata a legtöbb esetben 10 cm^3 volt. Mivel az AcHVHNH_2 és az AcHVGDNH_2 -ből kis mennyiség állt rendelkezésre a mintatérfigotat 5 cm^3 -re csökkentettük. Ezen védett peptidok rosszabb oldhatósága miatt a ligandum koncentrációja is kisebb (kb. $2\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) volt.

3.3.2. Spektrofotometria

A vizsgált fémionok közül a Cu(II) és a Ni(II) komplexeit tanulmányoztuk részletesen UV-látható spektrofotometriás módszerrel. Néhány esetben Pd(II)komplexeik esetén is történtek fotometriás vizsgálatok.

A spektrumokat Hewlett Packard 8453 típusú egysugaras, diódasoros spektrofotométerrel vettük fel $250\text{-}1000 \text{ nm}$ hullámhossz-tartományban. Az alkalmazott kűvetta úthossza 1 cm volt. A mintákban a ligandum koncentrációja $1,0\text{-}5,0\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ volt, míg a fém-ligandum arány 1:1 és 1:3 között változott. A vizsgálatokat általában a stabilitási állandók ismeretében szerkesztett eloszlásgörbék maximumainak megfelelő pH-értékeken végeztük. A kapott spektrumok elemzése a gyártó cég által biztosított kezelő- és kiértékelő szoftverrel történt. Néhány rendszer spektrofotometriás vizsgálatát Görögországban végeztem, itt JENWAY 6400 típusú készülék állt rendelkezésre.

A spektrumok elemzésével a képződött komplexek szerkezetére, geometriájára, valamint a koordinálódó donoratomok számára és minőségére következtethetünk.

A tetragonálisan torzult oktaédes szerkezetű réz(II)komplexek esetén az 2E_g alap- és a ${}^2T_{2g}$ gerjesztett állapotú energiaszintek felhasadnak és az így létrejött szintek között háromféle d-d átmenet lehetséges. Ezek az átmenetek gyakran egyetlen sávva olvadnak össze, s az energiájuk illetve intenzitásuk nagymértékben függ a koordinálódó donoratomok számától és minőségétől. Ha nincs axiális koordináció az általános környezeti szabály alapján Sigel és Martin által felírt empirikus egyenletek jól használhatók a λ_{\max} közelítő értékének számítására.² (14. egyenlet) Nagyszámú spektrofotometriás mérés alapján számos aminosav és peptid jellemző donoratomjainak adták meg az ún. hozzájárulási tényezőit (x_i)^{184,2} (pl. víz illetve karboniloxigén esetén 0,294, karboxilát oxigén esetén 0,346, amino-, amid- és imidazolnitrogén esetén pedig rendre 0,460, 0,494 illetve 0,434).

$$\lambda_{\max} = \frac{1000}{\sum_{i=1}^4 x_i} (nm) \quad (14)$$

A nikkell(II)komplexek leggyakoribb koordinációs száma 4 és 6. Az oktaédes komplexekhez három viszonylag kis intenzitású d-d átmenet tartozik (${}^3A_2 \rightarrow {}^3T_2$ 1430-770 nm, ${}^3A_2 \rightarrow {}^3T_1$ (F) 910-500 nm, ${}^3A_2 \rightarrow {}^3T_1$ (P) 520-370 nm). A 4-es koordinációs számú, síknégyzetes geometriájú komplexek spektrumában nagyobb intenzitású ($\epsilon_{\max} \sim 50-500 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) sávok találhatóak 400-550 nm és 430 nm hullámhosszknál. Az utóbbi töltésátviteli eredetű. Ezen síknégyzetes komplexek diamágneses sajátosságúak, s könnyen alakulnak ki más geometriájú komplexekből.

A metionintartalmú tripeptidek Cu(II)- és Ni(II)komplexeinek tanulmányozása során részletes pH-függő spektrofotometriás vizsgálatot végeztünk a képződő komplexek koordinációs módjának meghatározása céljából. Abban az esetben ugyanis, ha a tioéterkén koordinálódik a fémionhoz, egy töltésátviteli sáv megjelenése tapasztalható. A torzult oktaédes réz(II)komplexek esetén a 290-320 nm hullámhossztartományban jelentkezik a S→Cu CT sáv, míg oktaédes nikkell(II)komplexek esetén kb. 250 nm-nél figyelhető meg a S→Ni CT sáv.

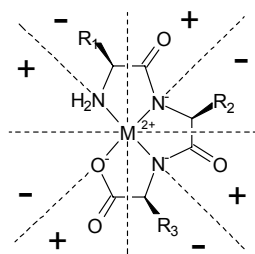
3.3.3. CD spektroszkópia

A síkban polarizált fény egy balra és egy jobbra cirkulárisan polarizált fénysugár összegének tekinthető. Az optikailag aktív anyagok, mint az aminosavak és peptidek a síkban polarizált fény ezen két összetevőjével különbözőképpen lépnek kölcsönhatásba (eltérő törésmutatók és különböző abszorpciós koefficiensek

rendelhetők az összetevőkhöz), a kilépő fény eliptikusan polarizált lesz. A cirkuláris dikroizmus, vagy másnéven Cotton-effektus a síkban polarizált fény két összetevőjének különböző abszorpciója. Az abszorpcióban mutatkozó különbség a teljes abszorpcióhoz viszonyítva igen kicsi, annak kb. 1%-a. A cirkuláris dikroizmus (CD) görbe a hullámhossz (λ) függvényében ábrázolja a két összetevő eltérő abszorpcióját, pontosabban a $\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$ értékét. A CD görbe minimumai illetve maximumai az elektrongerjesztési spektrum maximumainál, illetve ahhoz igen közeli hullámhosszaknál figyelhetők meg. A CD spektroszkópia előnyei közé tartozik, hogy keskeny sávjai között jóval ritkábban fordul elő átfedés, mint a spektrofotometria esetén, továbbá a Cotton effektus előjele további információkat szolgáltat a komplex szerkezetéről.¹⁸⁵

A fémkomplexek optikai aktivitását okozhatja egyrészt az, hogy aszimmetrikus ligandumot tartalmaznak, másrészt a ligandum koordinációja is eredményezhet aszimmetrikus szerkezetet. Utóbbi a központi atom körüli aszimmetrikus elrendeződés következménye lehet (például vegyes komplexek cisz-izomerjei esetén) illetve a komplexképződés hatására a ligandum donoratomja vagy az egész ligandum optikailag aktívvá válhat, ekkor a két izomer racém elegye képződik. A két izomer Cotton effektusa ellentétes előjelű, azonos abszolútértékű, tehát kioltja egymást.

A CD spektroszkópia peptidek Cu(II)-, Ni(II)- és Pd(II)komplexeinek vizsgálata során elterjedten használt szerkezetvizsgáló módszer.^{186,187} Az egyszerű di- és tripeptidekre vonatkozó eredményeket¹⁸⁸⁻¹⁹² Sigel és Martin² foglalta össze. Mivel az általam vizsgált ligandumok szinte kivétel nélkül tripeptidek voltak, a továbbiakban a legfontosabb tapasztalatokat, összefüggéseket a nem koordinálódó oldalláncot tartalmazó tripeptidek Cu(II)-, Ni(II)- és Pd(II)ionokkal képezett $[\text{MAH}_2]$ összetételű komplexei esetén ismertetem részletesebben.



3.5. ábra

Ezen $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{COO}^-)$ koordinációjú komplexek merev szerkezetűek, az oldalláncok és a hidrogénatomok kivételével valamennyi atom egy síkban helyezkedik el. A CD spektrumaik értelmezése az úgynevezett hexadekán, vagy másnéven dupla-oktán szabály segítségével lehetséges. A 3.5. ábrának megfelelően a komplex koordinációs síkja feletti és alatti teret 8-8 szektorra osztjuk, az ábrán az előjel az adott szektorban található

optikailag aktív csoport hatására bekövetkező Cotton effektus előjelét adja meg. Két szomszédos szektorban az előjel mindig ellentétes.

A szabály segítségével magyarázható a kísérleti tapasztalat, hogy valamennyi L-aminosavakból felépülő tripeptid [MAH₂] összetételű komplexe esetén a d-d átmenethez negatív Cotton effektus tartozik, hiszen az oldalláncok minden esetben olyan térrészbe esnek, amelyhez negatív előjel rendelhető.

Ezen komplexek CD spektrumának egy másik jellegzetessége a jelek intenzitásának additivitása, azaz az egyes (nem koordinálódó) oldalláncok hatása összeadódik. Például a trialanin komplexének CD intenzitása egy adott hullámhosszon egyenlő a háromféle, csak egy metil-oldalláncot tartalmazó tripeptid esetén tapasztalt intenzitások összegével. Általánosan megfogalmazva egy XYZ tripeptid komplexének Cotton effektusa egy adott hullámhosszon a következőképpen számítható:

$$\Delta\epsilon_{\lambda}^{XYZ} = \Delta\epsilon_{\lambda}^{XGG} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{GYG} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{GGZ}$$

Ugyanazon oldallánc a peptiden belül különböző (C- illetve N-terminális, valamint közbelső) helyzetben eltérő nagyságú Cotton effektust eredményez, nevezetesen: $\Delta\epsilon_{\lambda}^{GXG} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{GGX} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{XGG}$. Ennek oka, hogy a fémionhoz koordinálódó donorcsoportok különböző mértékben képesek továbbítani a királis információt. Hatásuk alapján a következő sorrend állítható fel: aminonitrogén < karboxiláttoxigén < deprotonálódott amidnitrogén. Utóbbi esetén a hatás nagyobb, ha a fémionhoz koordinálódó amidnitrogén a királis α -szénatom mellett található.

A CD méréseket a JASCO-810 spektrométeren végeztük. 0,1 és 1 cm-es úthosszúságú küvettákat használtunk. A minták koncentrációját úgy választottuk, hogy az abszorbancia 0,6-1,0 tartományon belül legyen. Különböző pH-kon és fém-ligandum arányok mellett, szobahőmérsékleten tanulmányoztuk az egyes rendszerek CD sajátosságait. A kapott CD spektrumok kiértékeléséhez a spektrométer saját szoftverét használtuk. Az egyes komplexek spektrumának meghatározásához többnyire szükségünk volt a kapott spektrumok felbontására, mivel nem tudtunk olyan körülményeket (pH, fém-ligandum arány) biztosítani, amelyek mellett az adott komplex 100%-ban van jelen az oldatban. A komplexek spektrumának számításához a PSEQUAD nevű programot használtuk.¹⁷⁹ A CD vizsgálatok kivitelezése és a kapott spektrumok értelmezése során Dr. Kurtán Tibor és Prof. Antus Sándor (Debreceni Egyetem, Szerves Kémia Tanszék) volt segítségünkre.

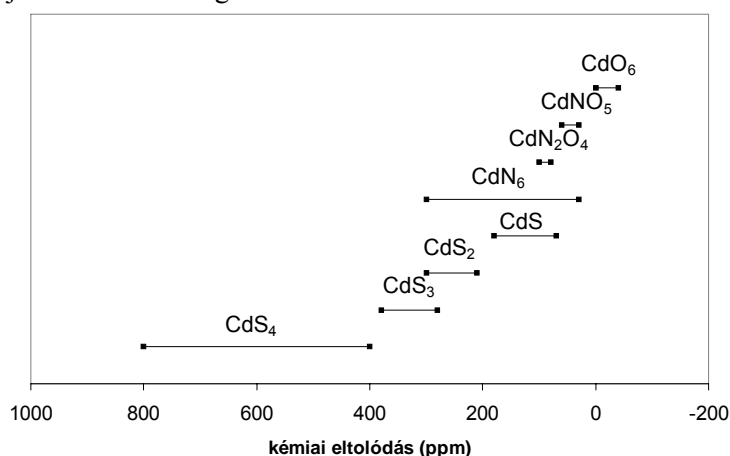
3.3.4. NMR spektroszkópia

Diamágneses komplexek oldatbeli szerkezetének vizsgálatára is alkalmas módszer az NMR spektroszkópia. Az általunk kiválasztott fémek közül ebbe a csoportba sorolhatók az Pb(II), Zn(II), Pd(II) és Cd(II) valamint a Ni(II) síknégyszetes geometriájú komplexei. ^1H NMR technikát alkalmazva a Pd(II)- és Ni(II)komplexek esetén a ligandum cseresebessége az NMR időskálához viszonyítva többnyire lassú, a szabad és a koordinált ligandum jelei elkülönülve jelennek meg, így a spektrum integrálásával arányuk meghatározható, mennyiségi meghatározás végezhető. A kémiai eltolódás (δ) értékének változása (a szabad ligandumhoz viszonyítva), a jelek száma, valamint felhasadása információt nyújt a komplexek koordinációs módjáról, a mintában jelenlévő asszociátumok számáról és az esetleges izomerekről.

Pb(II)-, Zn(II)- és Cd(II)-peptid rendszerek vizsgálata során a gyors ligandumcsere miatt az egyes részecskék jelei nem különülnek el, átlagjeleket kapunk, a ^1H NMR spektrum kevés információt szolgáltat, hiszen a kismértékű komplexképződés miatt a kapott jel kémiai eltolódása a legtöbb esetben igen közel áll a szabad ligandum esetén mérthez.

A három fémion közül a Cd(II)ion esetén rendelkezésünkre állt egy újabb kísérleti technika, a ^{113}Cd NMR.¹⁹³ A kadmiumnak két diamágneses izotópja létezik: a ^{111}Cd 12,75%, míg a ^{113}Cd 12,26% gyakorisággal fordul elő a természetben. Mindkét izotóp $\frac{1}{2}$ -es spinű és negatív mágneses momentumú. A gyakorlatban csak a ^{113}Cd magot használják NMR vizsgálatok során. A legközismertebb NMR aktív magokhoz viszonyítva a ^{113}Cd mag érzékenysége a ^1H 1%-a, míg a ^{13}C 70%-a. Ha a természetes izotópgyakoriságot is figyelembe vesszük a ^{113}Cd NMR technika a ^{13}C NMR-nél 7,5-szer érzékenyebb. A technikát cadmiumorganikus vegyületek, valamint metalloenzimek vizsgálata során széleskörűen használják.¹⁹⁴ A Cd(II)ion metalloenzimek aktív centrumában helyettesítheti a Ca(II)iont, mivel ionméretük jó közelítéssel megegyezik (0,99 illetve 0,97Å), valamint a Zn(II)iont, hiszen koordinációs kémiai tulajdonságaik hasonlóak. A Cd szubsztituált metalloenzim esetén kapott kémiai eltolódás, a relaxációs tulajdonságok (vonalszélesség, T_1) és más $\frac{1}{2}$ -es magokkal (pl. ^1H , ^{13}C) való csatolás a protein fémmegkötő helyéről szolgáltat információt. Az eddigi irodalmi adatok alapján elmondható, hogy a ^{113}Cd NMR kémiai eltolódás skálája igen széles (-100 – +760 ppm), s a koordinálódó donoratomok típusa és a komplexek geometriája között szoros összefüggés van. Az

oxigéndonor ligandumok oktaéderes komplexei esetén kapjuk a legkisebb, míg tiolkén donorok tetraéderes komplexei esetén a legnagyobb kémiai eltolódás értékeket. Általánosan elmondható, hogy az oxigén-koordináció hatására a nagyobb, míg nitrogén- és főként (tiolát)kén-koordináció hatására a kisebb terek irányába tolódik el a jel. (3.6. ábra) Meg kell említeni azonban, hogy nem áll rendelkezésre tiéterkén-koordinációra vonatkozó irodalmi adat, valamennyi esetben tiolátkén koordinációjának hatását vizsgálták.



3.6. ábra Különböző koordinációs módú komplexek jellemző ^{113}Cd NMR kémiai eltolódásai

A ^1H NMR mérésekhez készített 1:1 és 1:2 fém-ligandum arányú minták ligandumra nézve $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ koncentrációjúak voltak. Valamennyi ligandum pD-függő NMR spektrumát is felvettük összehasonlítás és jelazonosítás céljából. Oldószerként 99,8%-os izotóptisztaságú D_2O -t (ISOTEC INC.) használtunk. Az oldat pH-ját DCl és NaOD oldatokkal állítottuk be a kívánt értékre. A pD értékét Radiometer típusú pH-mérő és Russel CWR/320/757 típusú kombinált üvegelektrod segítségével mértük, a leolvasott értékhez 0,4-et adva.

A ^1H NMR spektrumokat BRUKER AM360 MHz FT-NMR készüléken vettük fel, belső standardként nátrium-3-trimetil-szillil-propánszulfonátot (TSP, $\delta_{\text{TSP}}=0$), illetve palládiumtartalmú minták esetén tetrametil-ammónium-tetrafluoroborátot (TSP-hez viszonyított kémiai eltolódása 3,18 ppm) használtunk. A kiértékelést a spektrométer saját szoftverével illetve az $^1\text{DWIN-NMR}$ programmal végeztük.

A ^{113}Cd NMR méréseknél oldószerként 10% D_2O , 90% H_2O elegyet, külső standardként pedig $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ koncentrációjú $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ -ot használtunk. A mintákban a Cd(II) koncentrációja $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ volt. A Bruker $\Delta\text{RX} 500 \text{ FT-NMR}$

készüléken felvett spektrumok kiértékeléséhez a spektrométer saját szoftverét használtuk.

3.3.5. ESR spektroszkópia

Az elektronspin-rezonancia spektroszkópia fontos vizsgálati módszer olyan molekulák és ionok tanulmányozására, melyek párosítatlan elektronokat tartalmaznak, azaz paramágneses sajátságúak. Ebbe a csoportba tartoznak az általunk vizsgált tetragonálisan torzult oktaéderes Cu(II)komplexek is.

Az SOD enzim aktív centrumát modellező védett peptidek (AcHisValHisNH₂ és AcHisValGlyAspNH₂) vizsgálata Görögországban történt. Ezen rendszerek ESR spektrumait Oxford Instrument kriosztáttal felszerelt Bruker EP-200D készülékkel vették fel a folyékony hélium hőmérsékletén.

A tioétercsoportot tartalmazó ligandumok Cu(II)komplexeinek ESR spektroszkópiás vizsgálata Olaszországban történt Prof. Giovanni Micera laboratóriumában (University of Sassari), Dr. Daniele Sanna segítségével. Az etilén-glikol hozzáadása után 120 K hőmérsékletűre lefagyasztott minták spektrumait Varian E-9 spektrométeren (9,15 GHz) vettük fel. A méréseket különböző pH-kon és fém-ligandum arányok mellett végeztük. Valamennyi mintában a Cu(II) koncentrációja 0,05 mol·dm⁻³ volt. A mérésekhez használt fémtörzsoldat ⁶³Cu izotópot tartalmazott, míg a görögországi mérések során a minták a természetes eloszlásnak megfelelően tartalmazták a réz különböző izotópjait. Külső standardként difenil-pikril-hidrazint használtunk, melyre $g_{\parallel}^0 = 2,0028$.

A komplex ESR paramétereit az alábbi összefüggések alapján számoltuk:

$$g_{\parallel} = g_{\parallel}^0 \cdot \frac{H_0}{H_{\parallel}} \quad (15)$$

$$A_{\parallel}[\text{cm}^{-1}] = \frac{g_{\parallel} \cdot \mu_B \cdot a_{\parallel}}{h \cdot c} \quad (16)$$

ahol H_{\parallel} a mintában mért mágneses térerő [Gauss]
 H_0 a standard esetén kapott mágneses térerő érték [Gauss]
 a_{\parallel} a csatolási állandó [Gauss]
 c a fénysebesség ($=2,99792458 \cdot 10^{10}$ cm·s⁻¹)

Az ESR spektrumok spektrális paramétereit (A_{\parallel} és g_{\parallel}) már ismert szerkezetű komplexek paramétereivel összevetve a fémion körül kialakuló koordinációs módra, a koordinálódó donatoratomok kémiai minőségére következtethetünk. Többmagvú komplexek esetén, ha a réz(II)ionok egymáshoz eléggé közel kerülnek, a komplexek diamágnesessé válnak, ESR csendesek lesznek.

4. Kísérleti eredmények és értékelésük

4.1. A tioéterkén donoratom koordinációjának fémionfüggése

A tioétercsoportot nagyfokú fémionszelektivitás jellemzi, a vizsgálatainkba ezért a fémionok minél szélesebb körét igyekeztünk bevonni. A kiválasztott fémionok eltérő hard-soft karakterrel rendelkeztek és a peptidekhez való affinitásuk is jelentősen különbözött. Elsődleges célunk különböző helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek vizsgálata volt, egyes fémionok esetén azonban – az irodalmi adatok hiányossága miatt – a dipeptidek viselkedését is tanulmányoztuk. Eredményeinket a továbbiakban fémionok szerint csoportosítva tárgyaljuk.

4.1.1. Metionintartalmú tripeptidek Cu(II)komplexei

A 4.1. táblázat a vizsgált metionintartalmú tripeptidek protonálódási állandóit és Cu(II)ionnal képezett komplexeik stabilitási állandóit foglalja össze. Összehasonlításként a triglicin megfelelő adatait is feltüntettem.

Látható, hogy a pK értékeket nem befolyásolja jelentősen a metionil-oldallánc molekulán belüli helyzete és száma. Kivételt képeznek az N-terminális helyzetben metionint tartalmazó peptidek, melyekre a láncvégi aminocsoport csökkent bázicitása jellemző.

Valamennyi ligandum Cu(II)ionnal azonos összetételű ($[\text{CuL}]^+$, $[\text{CuLH}_1]$, $[\text{CuLH}_2]^+$ és $[\text{CuL}_2\text{H}_1]$) komplexek képződése közben reagál, melyek stabilitási állandóiban sem tapasztalható jelentős eltérés. A komplexek termodinamikai paraméterei közötti kis eltéréseket a legjobban a $[\text{CuL}]^+$ komplex relatív stabilitását jellemző $\text{pK}_2\text{-lgK}_1$ ($\text{lg}\beta_{011}\text{-lg}\beta_{110}$) értékeket illetve az amiddeprotonálódást jellemző állandókat ($\text{pK}_{1(\text{amid})}=\text{lg}\beta_{110}\text{-lg}\beta_{11-1}$, $\text{pK}_{2(\text{amid})}=\text{lg}\beta_{11-1}\text{-lg}\beta_{11-2}$) összehasonlítva figyelhetjük meg.

Az irodalmi előzmények tárgyalása során részletesen ismertettem a nem koordinálódó oldallánc hatását a ligandum protonálódási állandóira, valamint a képződő komplexek stabilitására (3.1.3. alfejezet). Korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy az α -szénatom nagykiterjedésű szubsztituense csökkenti azon kelátgyűrű stabilitását, amelyben elhelyezkedik. Billo leucintartalmú tripeptidek vizsgálata során⁹⁶ azt tapasztalta, hogy a $[\text{CuL}]^+$ komplexre jellemző logK_1 értéke

4.1. táblázat Metionintartalmú tripeptidok protonálódási állandói és Cu(II)komplexeinek stabilitási állandói
(I=0,2 mol·dm⁻³ (KCl), T=298 K)

Igβ	GlyGlyGly ⁴⁹	MetGlyGly	GlyMetGly	GlyGlyMet	MetMetAla	MetGlyMet	MetMetMet
HL	7,93	7,31(1)	7,98(1)	7,93(1)	7,24(1)	7,31(1)	7,23(1)
[H ₂ L] ⁺	11,25	10,50(1)	11,28(1)	11,01(1)	10,68(1)	10,48(1)	10,57(1)
[CuL] ⁺	5,25	4,42(3)	5,06(1)	5,09(1)	4,39(3)	4,18(7)	3,90(13)
[CuLH ₂]	-0,16	-0,29(1)	-0,10(1)	-0,12(1)	0,00(1)	-0,40(1)	-0,26(1)
[CuLH ₂] ⁻	-7,02	-7,06(1)	-6,58(1)	-6,67(1)	-6,01(1)	-7,01(1)	-6,17(1)
[CuL ₂ H ₂] ⁻	3,23	2,71(7)	3,82(3)	3,71(3)	3,23(3)	2,95(10)	3,17(16)
pK ₂ -lgK ₁	2,68	2,89	2,92	2,84	2,85	3,13	3,33
pK ₁ (amid)	5,41	4,71	5,16	5,21	4,39	4,58	4,16
pK ₂ (amid)	6,86	6,77	6,48	6,55	6,01	6,61	5,91

lényegesen kisebb LeuGlyGly esetén, mint GlyGlyGly, GlyLeuGly és GlyGlyLeu esetében.

A metionin aminosav is tartalmaz egy nagyméretű, hidrofób oldalláncot, de az előbb említett hatás tripeptidjei esetén nem figyelhető meg. Ellenben, valószínűleg szterikus okokból, kismértékű stabilitás csökkenés jellemző valamennyi ligandumra, amely különösen a MetMetMet esetén jelentős.

Az alkil-oldallánc másik, az irodalomból ismert hatása, hogy elősegíti azon peptidnitrogén deprotonálódását, amellyel egy kelátgyűrűben található.⁹⁶ Ezzel összhangban az N-terminális helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek, különösen a MetMetAla és a MetMetMet esetén, az első amidnitrogén koordinációja kedvezményezett. A közbenső helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek (GlyMetGly, MetMetAla és MetMetMet) második amidnitrogénjének deprotonálódására gyakorolt hatás még nagyobb.

A $[\text{CuL}_2\text{H}_1]^-$ összetételű biszkomplex minden vizsgált peptiddel képződik. Ez azonban nem egy meghatározó részecske, koncentrációja még ligandumfelesleg esetén is igen kicsi. A Cu(II)-GlyGlyGly rendszerben szintén közölték hasonló részecske képződését, amelyben a két ligandum ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{CO}$) illetve (NH_2, CO) koordinációjú.

A Cu(II)komplexek stabilitási állandói tehát arra utalnak, hogy valamennyi metionintartalmú tripeptid esetén a fő koordinációs helyek a láncvégi amino-, a két deprotonálódott amidnitrogén és a karboxiláttoxigén, a tioétercsoport kismértékű módosító hatása figyelhető csak meg.

A spektroszkópiás vizsgálatok (spektrofotometria, ESR, CD) eredményei azonban a Cu(II)-kén kölcsönhatás kialakulását bizonyítják egyes jól meghatározott sztöchiometriai összetételek esetén, a peptidek aminosavszekvenciájával szoros összefüggésben.

Spektrofotometriás vizsgálatok

A fő részecske, a két peptidnitrogén deprotonálódásával és koordinálódásával képződő $[\text{CuLH}_2]^-$ összetételű komplex spektrális paraméterei nagyon hasonlóak, s jó egyezésben vannak a triglicinhez tartozó adatokkal (4.2. táblázat), ami a ligandumok ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{COO}^-$) koordinációját támasztja alá. A 250-750 nm hullámhossztartományban felvett abszorpciós spektrumokban a ~550 nm-es d-d átmenethez tartozó sáv mellett valamennyi vizsgált ligandum esetén, a

triglicintől eltérően, a 290-330 nm-es hullámhossztartományban egy töltésátviteli sáv megjelenését tapasztaltuk (4.2. táblázat), amely a Cu(II)-S kölcsönhatásnak tulajdonítható. Ezen sávhoz tartozó abszorbancia a pH függvényében általában maximum, vagy telítési görbe szerint változik. A pH-tartomány, amelyen belül maximális abszorbancia tapasztalható, a metionil-oldalláncok számától és a tripeptiden belüli helyzetétől függ.

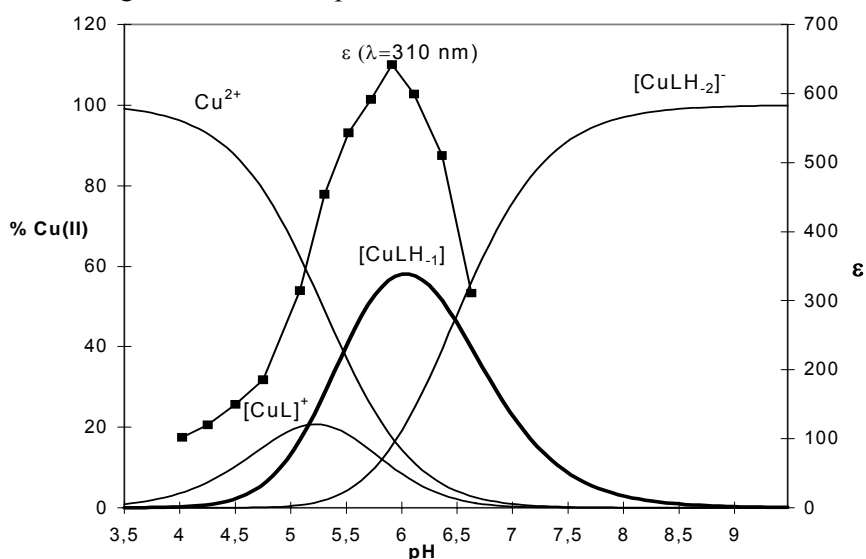
4.2. táblázat A ligandumok Cu(II)komplexeinek fotometriás adatai

ligandum	komplex	koordináció	d-d λ_{\max} (ε)	Cu-S sáv λ_{\max} (ε)
GlyGlyGly ⁴⁹	[CuAH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,COO ⁻)	553 (150)	-
MetGlyGly	[CuA] ⁺	(NH ₂ ,CO,S _{ax})	a	327 (1007)
	[CuAH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,COO ⁻)	552 (148)	-
GlyMetGly	[CuAH ₁]	(NH ₂ ,N ⁻ ,S)	a	310 (1039)
	[CuAH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,COO ⁻)	551 (135)	-
GlyGlyMet	[CuAH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,S/COO ⁻)	546 (157)	296 (1100)
MetGlyMet	[CuA] ⁺	(NH ₂ ,CO,S _{ax})	a	326 (480)
	[CuAH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,S/COO ⁻)	544 (194)	292 (1308)
MetMetAla	[CuA] ⁺	(NH ₂ ,CO,S _{ax})	a	320
	[CuAH ₁]	(NH ₂ ,N ⁻ ,S)	a	320 (757)
	[CuAH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,COO ⁻)	544 (167)	-
MetMetMet	[CuA] ⁺	(NH ₂ ,CO,S _{ax})	a	317 (265)
	[CuAH ₁]	(NH ₂ ,N ⁻ ,S)	a	308 (610)
	[CuAH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,S/COO ⁻)	538 (193)	291 (1104)

a = rossz felbontású spektrum

A teljes rézkoncentráció alapján számolt moláris abszorbancia értéke az egyes metionintartalmú tripeptidek esetén más-más komplex koncentrációjával párhuzamosan változik. A 4.1. ábrán a Cu(II)-GlyMetGly rendszerben 1:1 fém-ligandum arány mellett képződő komplexek koncentrációeloszlási görbéi, valamint a 310 nm-es hullámhosszhoz tartozó moláris abszorbancia értéke látható a pH függvényében. Ez az ábrázolásmód jól szemlélteti, hogy ezen hullámhosszon az abszorbancia értéke a [CuLH₁] komplex koncentrációjával párhuzamosan,

maximumgörbe szerint változik, vagyis a CT átmenet a $[\text{CuLH}_1]$ komplexhez rendelhető, e ligandum ezen komplexében alakul ki Cu-S kölcsönhatás.



4.1. ábra A Cu(II)-GlyMetGly rendszerben képződő komplexek koncentrációeloszlási görbéi és a 310 nm-es hullámhosszhoz tartozó moláris abszorbancia értéke a pH függvényében ($c_{\text{Cu(II)}}=c_{\text{L}}=4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

A metionint N-terminális helyzetben tartalmazó tripeptidek esetén ellenben a $[\text{CuL}]^+$, míg C-terminális helyzetben tartalmazóknál a $[\text{CuLH}_2]^-$ összetételű komplex jelenlétekor figyelhető meg a Cu-S kölcsönhatásra utaló töltésátviteli sáv.

Több metionint tartalmazó tripeptidek Cu(II)komplexeinek abszorpciós spektruma összetettebb, a töltésátviteli sáv több komplex jelenlétekor is megfigyelhető az előbb ismertetettel analóg módon. Nevezetesen a MetMetAla esetén a CT sáv a $[\text{CuL}]^+$ és a $[\text{CuLH}_1]$ komplex koncentrációjával átfedésben jelentkezik, nagyobb pH-n, ahol a $[\text{CuLH}_2]^-$ az egyedüli részecske az oldatban, eltűnik. A Cu(II)-MetGlyMet rendszerben két eltérő CT sáv megjelenése tapasztalható. Az első CT sáv (326 nm) kis pH-n, a $[\text{CuL}]^+$ komplex képződésével párhuzamosan fejlődik ki, de a $[\text{CuLH}_1]$ komplex képződésekor eltűnik. Nagyobb pH-n egy új, intenzívebb CT sáv figyelhető meg, amely a $[\text{CuLH}_2]^-$ komplexhez rendelhető. Ellenben a Cu(II)-MetMetMet rendszerben a CT sáv a teljes vizsgált pH-tartományban észlelhető. E sáv abszorpciós maximuma azonban a nagyobb energiák felé tolódik el és a moláris abszorbancia is nő a pH növelésével, ami azt támasztja alá, hogy a $[\text{CuL}]^+$ komplexben az első, a $[\text{CuLH}_1]$ komplexben a második, míg a

[CuLH₂] komplexben a harmadik metionil-oldalláncbéli kénatom koordinálódik a fémionhoz.

Az abszorpciós spektrum alapján nem lehet egyértelműen eldönteni, hogy a tioétercsoportot tartalmazó oldallánc axiális, vagy ekvatoriális helyzetben koordinálódik a fémionhoz. A képződő komplexek szerkezetéről azonban további információ nyerhető ESR és CD spektroszkópiás vizsgálatok segítségével.

ESR spektroszkópiás vizsgálatok

A különböző komplexek lefagyasztott oldatokban felvett ESR spektrumai a párhuzamos tartományban jól elkülönülnek, így a legtöbb esetben az $A_{||}$ és $g_{||}$ értékek könnyen számíthatók. A így kapott adatokat a 4.3. táblázatban tüntettem fel.

A [CuL]⁺ komplexek ESR paraméterei gyakorlatilag megegyeznek a triglicin megfelelő komplexéhez tartozó értékekkel. Az N-terminális helyzetben metionint tartalmazó tripeptid, a MetGlyGly esetén azonban a hiperfinom csatolási állandó ($A_{||}$) kismértékű növekedése és a $g_{||}$ értékének csökkenése figyelhető meg, amely a kénatom koordinálódását jelzi.

Közbenső helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek (GlyMetGly, MetMetAla, MetMetMet) [CuLH₁] komplexének ESR paramétereit a triglicin megfelelő komplexének adataival összevetve a hiperfinom csatolási állandó ($A_{||}$) kismértékű növekedése és a $g_{||}$ értékének csökkenése látható. Ez a tapasztalat az abszorpciós spektrumbeli intenzív CT sávval együtt arra utalhat, hogy a kénatom ekvatoriálisan koordinálódik, illetve (NH₂,N⁻,CO,S_{ax}) és (NH₂,N⁻,S,CO_{ax}) koordinációs módú komplexek vannak egymással egyensúlyban.

A C-terminális helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek (GlyGlyMet, MetGlyMet, MetMetMet) [CuLH₂] összetételű komplexeiben a Cu(II) koordinációs szférájában az amino- és a két deprotonálódott peptidnitrogén mellett a negyedik ekvatoriális helyet a karboxilátóxiogén vagy a tioéterkén foglalhatja el. Előbbi koordinációs mód jellemző a C-terminális helyzetben glicint (vagy alanint) tartalmazó peptidek komplexére, míg ha az aminosavszekvenciában ugyanezen a helyen metionin található, akkor mind a kétféle koordináció megvalósulhat. Ezzel egyezésben a GlyMetGly, a MetGlyGly és a MetMetAla [CuLH₂] komplexének ESR paraméterei megegyeznek a triglicin analóg komplexét jellemző értékekkel. A C-terminális helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek esetén ellenben a vizsgálat körülményei mellett a kétféle koordinációs módú komplex keveréke képződik. Az

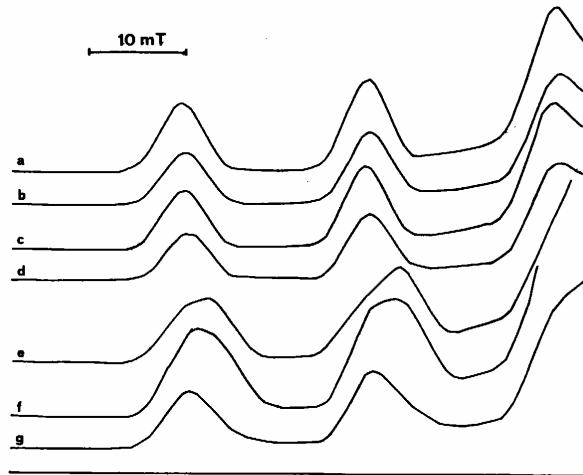
(NH₂,N⁻,N⁻,COO⁻) és a (NH₂,N⁻,N⁻,S) koordinációjú izomer ESR paraméterei különbözőek, így oldatbeli arányuk az egyes ligandumok esetén meghatározható volt. A csak egy metionil-oldalláncot tartalmazó GlyGlyMet esetén 60%, míg a MetGlyMet esetén 50%, a három metionin aminosavból felépülő tripeptid esetén pedig csupán 10% a [CuLH₂] összetételű részecskék közül, amelyben a tioéterkén koordinálódik a Cu(II)ionhoz.

4.3. táblázat A vizsgált tripeptidok Cu(II)komplexeinek ESR paraméterei

ligandum	komplex	koordináció	g	A (·10 ⁴ cm ⁻¹)
GlyGlyGly ⁴⁹	[CuL] ⁺	(NH ₂ ,CO)	2,330	161
	[CuLH ₁]	(NH ₂ ,N ⁻ ,CO)	2,256	181
	[CuLH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,COO ⁻)	2,202	201
MetGlyGly	[CuL] ⁺	(NH ₂ ,CO) / (NH ₂ ,S)	2,324	163
	[CuLH ₁]	(NH ₂ ,N ⁻ ,CO)	2,257	179
	[CuLH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,COO ⁻)	2,202	202
GlyMetGly	[CuL] ⁺	(NH ₂ ,CO)	2,330	162
	[CuLH ₁]	(NH ₂ ,N ⁻ ,S)	2,253	186
	[CuLH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,COO ⁻)	2,205	202
GlyGlyMet	[CuL] ⁺	(NH ₂ ,CO)	2,330	162
	[CuLH ₁]	(NH ₂ ,N ⁻ ,CO)	2,255	180
	[CuLH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,COO ⁻)	a	a
	[CuLH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,S)	2,174	207
MetMetAla	[CuL] ⁺	(NH ₂ ,CO) / (NH ₂ ,S)	a	a
	[CuLH ₁]	(NH ₂ ,N ⁻ ,S)	2,250	187
	[CuLH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,COO ⁻)	2,201	201
MetGlyMet	[CuL] ⁺	(NH ₂ ,CO) / (NH ₂ ,S)	a	a
	[CuLH ₁]	(NH ₂ ,N ⁻ ,CO)	2,249	177
	[CuLH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,COO ⁻)	a	a
	[CuLH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,S)	a	a
MetMetMet	[CuL] ⁺	(NH ₂ ,CO) / (NH ₂ ,S)	a	a
	[CuLH ₁]	(NH ₂ ,N ⁻ ,S)	2,249	187
	[CuLH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,COO ⁻)	2,192	199
	[CuLH ₂] ⁻	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,S)	a	a

a = rossz felbontású spektrum

Az előző bekezdésben elmondottak jól láthatók a 4.2. ábrán, amelyen a vizsgált ligandumok [CuLH₂]⁻ összetételű komplexeinek ESR spektrumai láthatók.

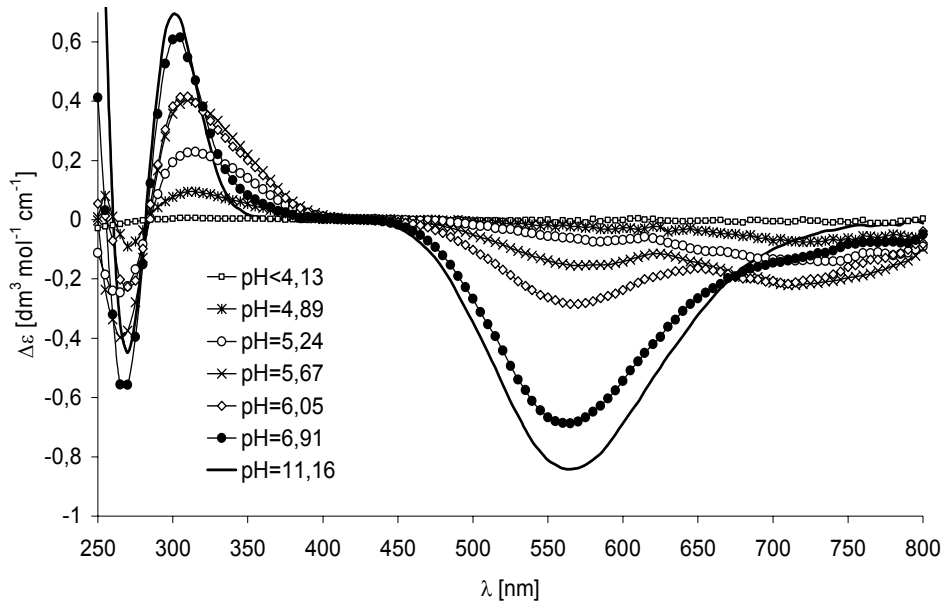


4.2. ábra A $[CuLH_2]$ összetételű komplexek ESR spektrumai
a, GlyGlyGly b, MetGlyGly c, GlyMetGly d, MetMetAla e, GlyGlyMet
f, MetGlyMet g, MetMetMet

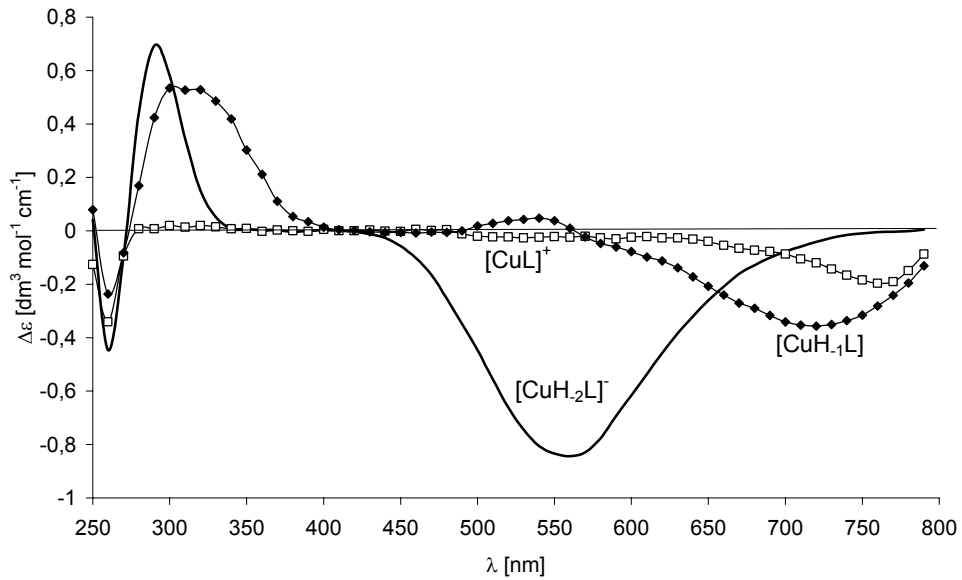
CD spektroszkópiás vizsgálatok

A 4.3. ábrán jellemző példaként a Cu(II)-GlyMetGly rendszerben 1:1 fém-ligandum arány mellett, különböző pH-kon felvett CD spektrumok láthatók. A mért spektrum a legtöbb esetben különböző komplexek keverékétől származik, de a PSEQUAD nevű program segítségével az eredő spektrumból az egyedi részecskék spektruma számítható, amely az előbb említett rendszerre a 4.4. ábrán látható.

A vizsgált peptidekkel képződő komplexek számított spektrumainak fontosabb CD paramétereit a 4.4. táblázat foglalja össze. A vizsgált hullámhossz tartományban (280-800 nm) az észlelt Cotton effektusok (a továbbiakban CE) valamennyi ligandum komplexei esetén az alábbi három átmenettípushoz rendelhetők: d-d (500-800 nm), N⁻ (amid) → Cu(II) (280-310 nm) és S (tioéter) → Cu(II) (320-360 nm). Az NH₂ → Cu(II) CT sávok általában a 250-280 nm tartományban figyelhetők meg, de a ligandum átmeneteivel átfednek, így a hozzájuk tartozó paramétereket nem lehet pontosan meghatározni. Emellett az aminos csoport valamennyi komplexben koordinálódik a fémionhoz, így az NH₂ → Cu(II) átmenet változása csak kevés információt szolgáltat a komplexek koordinációs módjáról.



4.3. ábra A Cu(II)-GlyMetGly rendszer CD spektruma
 $c_{\text{lig}} = c_{\text{Cu(II)}} = 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

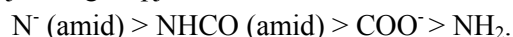


4.4 ábra A GlyMetGly Cu(II)komplexeinek CD spektruma

4.4. táblázat Az egyes ligandumok Cu(II)komplexeinek CD paraméterei

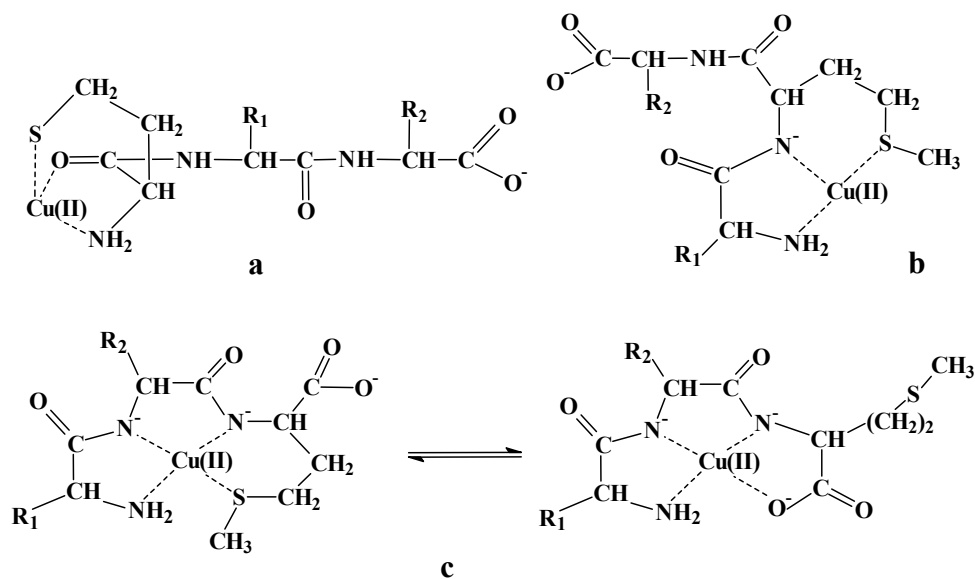
	ligandum	N ⁻ →Cu(II)	S→Cu(II)	d-d
[CuL] ⁺	GlyAlaGly	–	–	610(+0,04); 760(-0,08)
	GlyMetGly	–	–	768(-0,23)
	GlyGlyMet	–	–	590(-0,12)
	MetGlyGly	–	331(-0,77)	720(-0,26)
	MetGlyMet	–	330(-0,98)	540(+0,10); 710(-0,27)
	MetMetAla	–	330(-0,85)	566(-0,32); 790(-0,27)
	MetMetMet	–	325(-0,95)	560(-0,56); 755(-0,55)
[CuLH ₋₁]	GlyAlaGly	305(+0,72)	–	560(-0,11); 730(-0,27)
	GlyMetGly	310 ^{váll} (+0,54)	350 ^{váll} (+0,42)	544(+0,05); 720(-0,34)
	GlyGlyMet	290(+0,29)	–	569(+0,19); 722(-0,13)
	MetGlyGly	302(+0,09)	–	560(-0,03)
	MetGlyMet	310(+0,12)	–	556(+0,07); 720(-0,09)
	MetMetAla	310 ^{váll} (+0,47)	340 ^{váll} (+0,45)	540(+0,07); 700(-0,63)
	MetMetMet	310 ^{váll}	356 ^{váll} (+0,36)	544(+0,28); 716(-0,45)
[CuLH ₋₂]	GlyAlaGly	302(+0,50)	–	559(-0,85)
	GlyMetGly	301(+0,69)	–	562(-0,86)
	GlyGlyMet	296(-0,69)	347(+0,06)	563(-0,69)
	MetGlyGly	297(+0,38)	–	485(+0,03); 545(-0,02); 612(+0,04)
	MetGlyMet	300(-0,26)	350(+0,04)	558(-0,61)
	MetMetAla	304(+0,52)	–	557(-1,28)
	MetMetMet	283(-0,49)	335(+0,46)	548(-1,65)

Valamennyi ligandum [CuL]⁺ komplexéhez igen kis intenzitású, negatív Cotton effektusú d-d átmenet tartozik. Ezen átmenet kis intenzitása magyarázható Sigel és Martin korábbi megállapításai ismeretében.² A fémionhoz koordinálódó donorcsoportok ugyanis eltérő mértékben képesek továbbítani a közeli oldallánc asszimetriáját. E tulajdonság alapján a következő sorrend állítható fel:



A látható tartománybeli CE-k kis intenzitása és az N⁻(amid)→Cu(II) CT átmenetek hiánya azt támasztja alá, hogy valamennyi peptid [CuL]⁺ komplexét (NH₂,CO) koordináció jellemzi. Az N-terminális metionint tartalmazó tripeptidek esetén, a többi vizsgált ligandumtól eltérően, 330 nm körül egy közepes intenzitású, negatív Cotton effektusú CT sáv jelenik meg, melynek intenzitása a pH függvényében maximum görbe szerint változik. A maximális effektus azon a pH-n tapasztalható,

ahol a $[\text{CuL}]^+$ komplex koncentrációja a legnagyobb. Az említett töltésátviteli sáv a $\text{S}(\text{tioéter}) \rightarrow \text{Cu}(\text{II})$ átmenethez rendelhető és a tioéter oldallánc *axiális* koordinációját jelzi (4.5.a ábra).

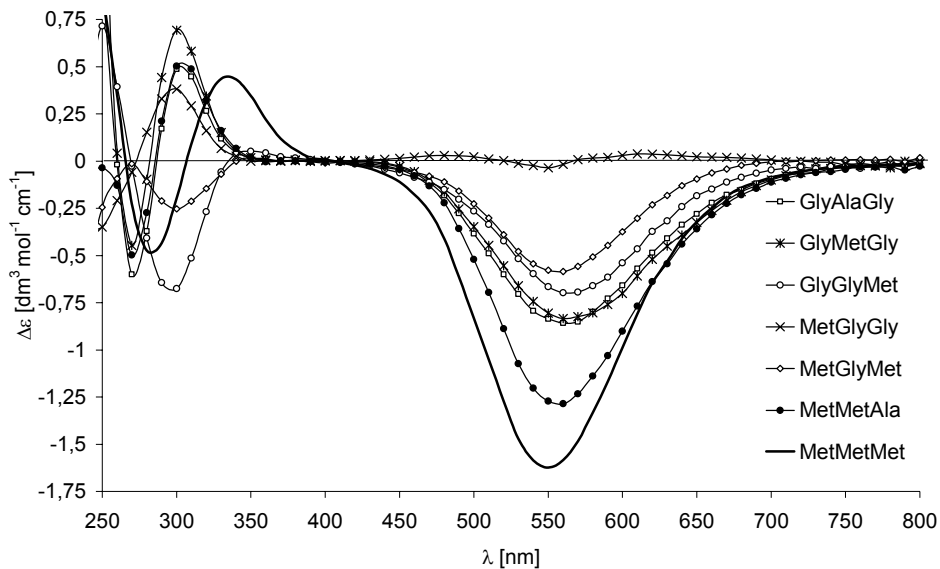


4.5. ábra A Cu(II)komplexek feltételezett szerkezete

a, a MGG, MMA, MGM és MMM $[\text{CuL}]^+$ komplexe, b, a GMG, MMA és MMM $[\text{CuLH}_1]$ komplexe, c, a GGM, MGM és MMM $[\text{CuLH}_2]$ komplexe

A 4,5-8 pH-tartományban képződő, $[\text{CuLH}_1]$ összetételű komplex abszorpciós spektrumában egy széles sáv megjelenése tapasztalható 630-650 nm hullámhossznál, összhangban a két nitrogén donoratom (a láncvégi amino- és az azt követő deprotonálódott peptidnitrogén) koordinációjával. Ellenben a CD spektrumban a d-d átmenet többnyire felhasad: egy kis intenzitású, negatív előjelű (700-730 nm) és egy még kisebb intenzitású, pozitív előjelű (540-570 nm) CE-ra. A CD átmenet intenzitása közbelső helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek Cu(II)komplexei esetén a legnagyobb, hiszen a királis információt továbbító képessége a deprotonálódott és koordinálódott amidnitrogénnek a legnagyobb. Az $\text{N}^-(\text{amid}) \rightarrow \text{Cu}(\text{II})$ átmenet valamennyi rendszerben megfigyelhető, s ezek intenzitása is hasonlóan változik. A $\text{S}(\text{tioéter}) \rightarrow \text{Cu}(\text{II})$ CT átmenet azonban csak a közbelső helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek $[\text{CuLH}_1]$ komplexeiben jelenik meg. Ebben az esetben a pozitív Cotton effektusú $\text{S}(\text{tioéter}) \rightarrow \text{Cu}(\text{II})$ átmenet az $\text{N}^-(\text{amid}) \rightarrow \text{Cu}(\text{II})$ CT sávon vöröseltolódású vállat eredményez. A CE előjelének

változása eltérő kötésmód kialakulására, a tioéter-oldallánc *ekvatoriális* koordinációjára utal (4.5.b ábra). Ezen átmenet a Cu(II)-GlyAlaGly [CuLH₁] komplexének spektrumában nem található meg, amely további bizonyítékként szolgál arra, hogy a közbenső helyzetben metionint tartalmazó tripeptid analóg komplexében a tioéterkén donoratom koordinálódik.



4.6. ábra A vizsgált tripeptidek [CuLH₂]⁻ összetételű komplexeinek CD spektrumai

Az összes vizsgált ligandum [CuLH₂]⁻ összetételű komplexének stabilitási állandója, UV-látható és ESR paramétere nagyon hasonló, CD spektrumukban (4.6. ábra) azonban jelentős eltérés tapasztalható. E komplexek CD adatait (4.4. táblázat és 4.6. ábra) összehasonlítva a következő megállapítások tehetők:

- A d-d és az N(amid)→Cu(II) CT átmenetek intenzitása jelentősen függ az oldallánc helyzetétől, az egy metionil-oldalláncot tartalmazó tripeptidek esetén az alábbi sorrendben csökken: GlyMetGly > GlyGlyMet >> MetGlyGly.

Az oldallánc kiralitását eltérő sajátságú koordinálódó donoratomok továbbítják, különböző hatásfokkal: az első esetben két deprotonálódott amidnitrogén, a második esetben a metionin peptidnitrogénje (N(amid)) mellett egy karboxilátóxiogén, a legkisebb intenzitásúban pedig egy aminonitrogén koordinálódik az amidnitrogén mellett.

- A több optikailag aktív oldalláncot tartalmazó peptidek esetén érvényes az additivitási szabály. Korábban leucint illetve alanint tartalmazó tripeptidek esetén

tapasztaltak hasonló szabályszerűséget.¹⁹⁰ Mivel az összefüggés egy adott hullámhosszhoz tartozó értékek esetén alkalmazható, ezért a 4.5. táblázatban valamennyi vizsgált ligandum [CuLH₂] összetételű komplexének 560 valamint 300 nm hullámhosszon tapasztalt CD intenzitását tüntettem fel; előbbi a d-d, míg utóbbi a N(amid)→Cu(II) CT sávhoz tartozik. A MetGlyMet, MetMetAla és MetMetMet esetén a d-d átmenetre jellemző mért és számított értékek jó egyezésben vannak. (A MetMetAla esetén a GlyGlyAla irodalmi adatát² használtuk a számítás során.)

4.5. táblázat A vizsgált tripeptidek [CuLH₂] összetételű komplexeinek két kiválasztott hullámhosszon tapasztalt CD intenzitásai

ligandum	300 nm		560 nm	
	mért	számított ^a	mért	számított ^a
GlyAlaGly	+0,49		-0,84	
GlyMetGly	+0,69		-0,86	
GlyGlyAla ²	nincs adat		-0,42	
GlyGlyMet	-0,67		-0,68	
MetGlyGly	+0,37		-0,01	
MetGlyMet	-0,26	-0,30	-0,61	-0,69
MetMetAla	+0,50		-1,27	-1,29
MetMetMet	-0,20	+0,38	-1,60	-1,55

^a Additivitást feltételezve.

- A CD spektrumok közeli UV-tartományában jelentős eltérés tapasztalható az átmenetek előjelében és intenzitásában is. N-terminális és/vagy közbenső helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek (GlyMetGly, MetGlyGly és MetMetAla) spektrumában csak az N(amid)→Cu(II) átmenet figyelhető meg, melyekre jelentős pozitív Cotton-effektus jellemző és az additivitás is érvényes. C-terminális helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek (GlyGlyMet, MetGlyMet, MetMetMet) esetén ellenben az N(amid)→Cu(II) és a S(tioéter)→Cu(II) átmenet egymással átfedésben észlelhető, ami az adatok értelmezését igen megnehezíti. Korábban C-terminális helyzetben alanint és leucint tartalmazó tripeptidek Cu(II)komplexeit vizsgálták, melyek során azt tapasztalták, hogy érvényesül az additivitás és az N(amid)→Cu(II) CT átmenethez negatív előjelű Cotton-effektus tartozik.¹⁸⁹ GlyGlyMet és MetGlyMet esetén az irodalmihoz hasonló viselkedés tapasztalható, míg MetMetMet esetén a mért és az additivitás feltételezésével

számított érték jelentősen eltér egymástól. Ez az eltérés valószínűleg abból adódik, hogy a tioétercsoportot tartalmazó oldallánc eltérő módon koordinálódik az egyes ligandumok komplexeiben.

Azaz a 4.4. táblázat adatai alapján valószínűsíthetjük, hogy az oldalláncbeli tioétercsoport **axiális** koordinációját jelentős **negatív**, míg **ekvatoriális** koordinációját kevésbé intenzív **pozitív** előjelű Cotton-effektus kíséri.

Megállapíthatjuk tehát, hogy Cu(II)-ionnal való komplexképződés során a peptidláncnak van meghatározó szerepe, emellett azonban a tioétercsoport térbeli helyzetétől függően a kénatom koordinációja is megvalósulhat egyes komplexekben, melyek összetétele és a peptid aminosavszevenciája között szoros összefüggés figyelhető meg. Nevezetesen a Cu-S kölcsönhatás a $[CuL]^+$, $[CuLH_1]$ illetve $[CuLH_2]$ összetételű komplexekben mutatható ki N-terminális, közbenső helyzetű illetve C-terminális metionint tartalmazó tripeptidek esetén.

4.1.2. Metionintartalmú tripeptidek Ni(II)komplexei

A Ni(II)ion a vizsgált metionintartalmú peptidekkel a tripeptidekre általánosan jellemző módon, stabil monomer komplexek képződése közben reagál. A fő részecske, a $[NiLH_2]$ összetételű komplex, a két peptidnitrogén kooperatív deprotonálódásával jön létre. A 4.6. táblázat a vizsgált ligandumok Ni(II)komplexeinek stabilitási állandóit foglalja össze.

Valamennyi Ni(II)-tripeptid rendszer titrálási görbéje két részecske, a $[NiL]^+$ és a $[NiLH_2]$ összetételű komplexek feltételezésével illeszthető. Előbbire a (NH_2, CO) koordinációs mód és oktaédes geometria jellemző, míg utóbbiban a ligandum (NH_2, N^-, N^-, COO^-) koordinációjával síknégyszetes geometria valósul meg.

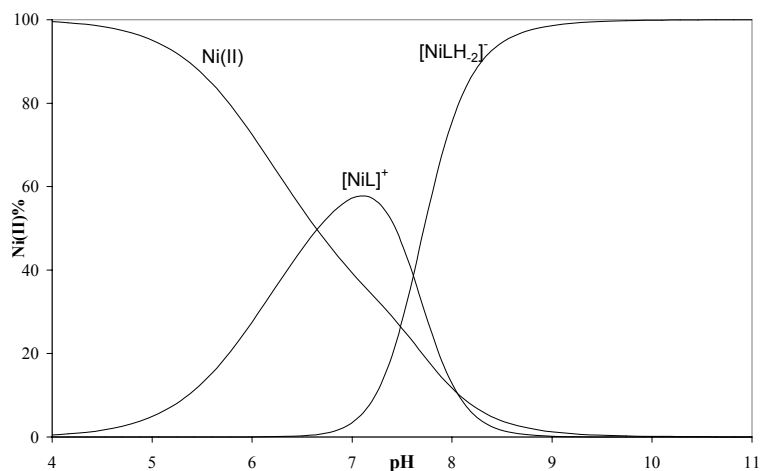
A $pK_2 - \lg K_1$ ($\lg \beta_{011} - \lg \beta_{110}$) értékeket a triglicin megfelelő adatával összevetve a $[NiL]^+$ komplexek stabilitásának kismértékű növekedésére következtethetünk MetGlyGly és MetGlyMet esetén. A leucintartalmú tripeptidek vizsgálata során ellenben a $[NiL]^+$ komplexek kismértékű stabilitáscsökkenését tapasztalták, amit az N-terminális helyzetben lévő aminosav nagy térkitöltésű oldalláncának sztérikus hatásával magyaráztak.⁹⁶ Tehát a MetGlyGly és MetGlyMet komplexének megnövekedett stabilitása csak a tioéterkén donoratom koordinációjának következménye lehet, ezt támasztják alá a spektrofotometriás és a CD spektroszkópiás vizsgálatok eredményei is.

4.6. táblázat A metionintartalmú tripeptidek Ni(II)komplexeinek stabilitási állandói
($I=0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (KCl), $T=298 \text{ K}$)

ligandum	$[\text{NiL}]^+$	$[\text{NiLH}_2]^-$	$\text{pK}_2 - \lg\text{K}_1$	$\text{pK}_{(\text{amid})}^a$
GlyGlyGly ⁵²	3,71	-12,82	4,22	8,27
MetGlyGly	3,45(5)	-12,35(4)	3,86	7,90
GlyMetGly	3,91(6)	-12,22(5)	4,07	8,07
GlyGlyMet	3,87(5)	-12,46(5)	4,06	8,17
MetMetAla	2,88(9)	-11,76(3)	4,36	7,32
MetGlyMet	3,46(5)	-11,63(4)	3,85	7,54
MetMetMet	2,47(14)	-11,61(3)	4,76	7,04

^a A két protonhoz tartozó átlagérték, a deprotonálódás lépcsői nem különülnek el.

Spektrofotometriás vizsgálatok



4.7. ábra A Ni(II)-MetGlyGly rendszerben képződő komplexek koncentrációeloszlási görbéi
($c_{\text{Ni(II)}} = c_{\text{MGG}} = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)

A 4.7. ábrán a Ni(II)-MetGlyGly rendszerben 1:1 fém-ligandum arány mellett képződő komplexek koncentrációeloszlási görbéi láthatók a pH függvényében. Bár a Ni(II)-triglicin rendszer koncentrációeloszlása nagyon hasonló, a savas pH-tartományban abszorpciós spektrumukban jelentős eltérés tapasztalható. A Ni(II)-MetGlyGly rendszer spektrumában ugyanis a $[\text{NiL}]^+$ összetételű komplex

képződésével párhuzamosan a 258 nm-es hullámhosszon egy intenzív CT sáv jelenik meg. Ez a sáv valamennyi N-terminális helyzetben metionint tartalmazó tripeptid esetén megfigyelhető; triglicin, GlyGlyMet és GlyMetGly esetén azonban nem található a spektrumban. A sáv léte arra utal, hogy az N-terminális helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek $[\text{NiL}]^+$ összetételű, oktaéderes komplexében gyenge S(tioéter) \rightarrow Ni(II) kölcsönhatás alakul ki.

A sáv a pH növelésével eltűnik, a fő részecskére, a $[\text{NiLH}_2]^-$ összetételű komplexre jellemző, ~ 270 nm hullámhossznál jelentkező, N(amid) \rightarrow Ni(II) átmenet váltja fel. Utóbbi sáv valamennyi vizsgált ligandum $[\text{NiLH}_2]^-$ összetételű komplexére jellemző. Ezen síknégyszetes geometriájú komplexek d-d átmenetéhez tartozó sáv abszorpciós maximuma egy igen szűk intervallumban helyezkedik el: 429 ± 2 nm. Ezek a spektrális paraméterek tehát azt jelzik, hogy a metionin oldalláncában található tioéterkén donoratom nem koordinálódik a síknégyszetes, diamágneses komplexekben.

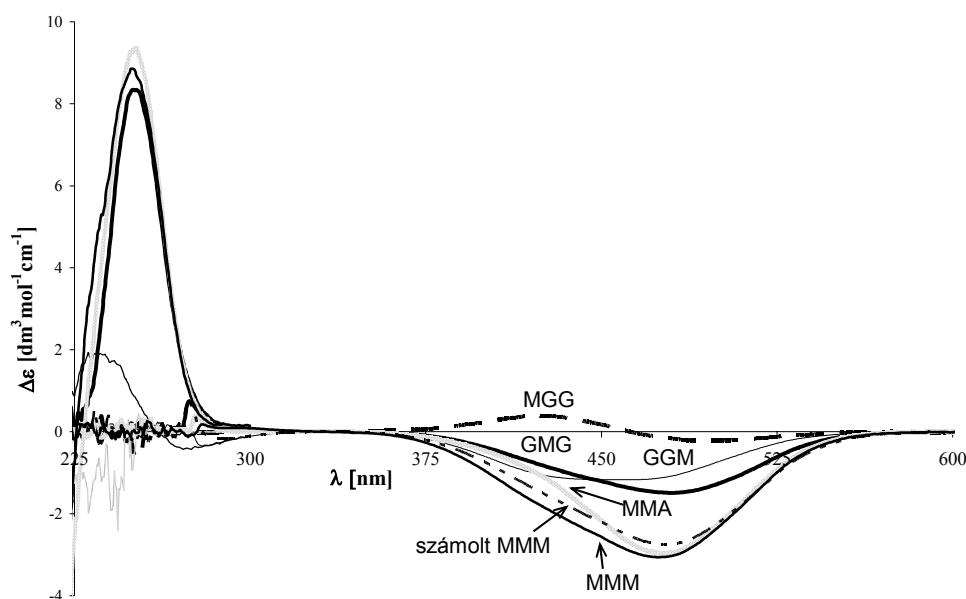
CD spektroszkópiás vizsgálatok

A CD spektrumok alátámasztották a pH-potenciometriás és spektroszkópiás vizsgálatok eredményei alapján feltételezett szerkezeteket, emellett további információkat szolgáltatottak a ligandumok komplexképző sajátosságairól. A vizsgált tripeptidek Ni(II)komplexeinek CD spektrumában jelentős eltérések tapasztalhatók, paramétereiket a 4.7. táblázat foglalja össze.

4.7. táblázat A vizsgált tripeptidek Ni(II)komplexeinek CD paramétereinek

ligandum	komplex	N ⁻ \rightarrow Ni(II)	S \rightarrow Ni(II)	d-d
MetGlyGly	$[\text{NiL}]^+$ $[\text{NiLH}_2]^-$	237(-2,45)	261(+0,13)	495(-0,22); 424(+0,38)
GlyMetGly	$[\text{NiLH}_2]^-$	250(+8,35)		479(-1,50)
GlyGlyMet	$[\text{NiLH}_2]^-$	236(+1,89)		454(-1,27)
MetMetAla	$[\text{NiL}]^+$ $[\text{NiLH}_2]^-$	250(+9,30)	257(+0,23)	475(-2,96)
MetMetMet	$[\text{NiL}]^+$ $[\text{NiLH}_2]^-$	248(+8,77)	253(+0,60)	474(-3,06)

A S(tioéter) \rightarrow Ni(II) CT átmenet csak az N-terminális helyzetben metionint tartalmazó tripeptidok $[\text{NiL}]^+$ komplexeire jellemző. Ezen CD átmenet intenzitása az oldallánc számának növekedésével nő (MetMetMet > MetMetAla > MetGlyGly), ami jelzi, hogy az N-terminális helyzetben lévő metionin oldalláncában található tioéterkén donortom koordinációja elősegíti további tioétercsoportok kötődését. Mivel az oktaéderez $[\text{NiL}]^+$ komplexben igen nagyszámú szabad koordinációs hely található, lehetőség van egynél több kénatom koordinálására is.



4.8. ábra A vizsgált tripeptidok $[\text{NiLH}_2]^-$ összetételű komplexeinek CD spektrumai

Valamennyi vizsgált rendszerben $\text{pH} > 9$ esetén egyetlen részecske, a $[\text{NiLH}_2]^-$ összetételű komplex, található az oldatban, melyek abszorpciós spektruma valamennyi peptid esetén szinte teljesen megegyezik, CD spektrumuk is minden esetben tartalmaz 470 nm körül egy d-d és 250 nm körül egy N(amid) \rightarrow Ni(II) CT átmenethez tartozó sávot, ezek intenzitása azonban jelentősen eltér az oldallánc számától és helyzetétől függően (4.8. ábra). A $[\text{NiLH}_2]^-$ összetételű komplex N(amid) \rightarrow Ni(II) átmenetét igen jelentős Cotton-effektus jellemzi, ha a tripeptid közbenső helyzetben tartalmaz metionint, ellentétes esetben az átmenet intenzitása sokkal kisebb. Korábban nem koordinálódó oldalláncot tartalmazó tripeptidok Ni(II)komplexeit vizsgálva tapasztaltak hasonló tendenciát: az optikailag aktív

oldalláncot közbenső helyzetben tartalmazó ligandum komplexének CD intenzitása volt a legnagyobb.¹⁸⁹

A síknégyszetes geometriájú, $[\text{NiLH}_2]^-$ összetételű komplexek és a megfelelő, tetragonális Cu(II)komplexek d-d átmeneteire vonatkozó eredmények nagyon hasonlóak.

- Az optikailag aktív oldallánc aszimmetriájának terjedése alapján az alábbi sorrend állítható fel: GlyMetGly > GlyGlyMet >> MetGlyGly. Ez a d-d átmenet intenzitásának csökkenésében nyilvánul meg.

- A három optikailag aktív aminosavból felépülő peptidek (MetMetAla és MetMetMet) komplexei esetén a d-d átmenethez igen intenzív CE tartozik, amelyre a CD intenzitások additivitásának feltételezésével számított (475 nm (+2,81)) és a mért érték jó egyezésben van.

A Ni(II)ionokkal való kölcsönhatás során tehát az oldalláncban található tioétercsoport csak másodlagos szerepet játszik. Valamennyi vizsgált tripeptid esetén a fő részecskében, a $[\text{NiLH}_2]^-$ összetételű komplexben, a peptidekre általánosan jellemző koordinációs mód ((NH₂,N,N,COO)) valósul meg. A tioétercsoport gyenge koordinációja csak az N-terminális helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek $[\text{NiL}]^+$ összetételű, oktaéderez komplexében mutatható ki.

4.1.3. Metionintartalmú di- és tripeptidek Zn(II)-, Co(II)- és Cd(II)komplexei

A vizsgált fémionok közül a Zn(II)-, a Co(II)- és a Cd(II)ionok egyszerű, oldalláncban donoratomot nem tartalmazó peptidekkel hasonlóan reagálnak: kis-stabilitású komplexek képződnek, az amidnitrogén deprotonálódása nem következik be. A választott metionintartalmú peptidek vizsgálata során is hasonló viselkedést tapasztaltunk a fémionok e csoportja esetében, ezért a kapott eredményeket együtt tárgyaljuk.

A 4.8. táblázat a dipeptidek komplexeinek stabilitási állandói tartalmazza. A tioétercsoportot tartalmazó két dipeptid mellett összehasonlításként vizsgáltuk a GlyVal-t is, amely hasonló méretű, nem koordinálódó, alifás oldalláncot tartalmaz. A kapott adatok alapján a következőket állapíthatjuk meg:

- Valamennyi vizsgált ligandummal azonos összetételű komplexek képződnek, melyek stabilitási állandója kisebb, mint a megfelelő Cu(II)- és Ni(II)komplex esetén.

- Az amidnitrogén deprotonálódása nem következik be, a képződő [MLH₁] összetételű komplexek hidroxokomplexek.
- A pK₂-lgK₁ értékek ezen fémionok esetén sem utalnak a tioéterkén donoratom koordinációjára, a metionintartalmú peptidek esetén a nem koordinálódó oldalláncnak a komplex stabilitására gyakorolt hatása figyelhető meg.

4.8. táblázat A vizsgálat dipeptidek komplexeinek stabilitási állandói
(I=0,2 mol·dm⁻³ (KCl / KNO₃), T=298 K)

	peptid	MA	MA ₂	MAH ₁	logK ₁ /K ₂	pK _{NH2} -log K ₁
Zn(II)	GlyVal	3,49(3)	6,23(0,3)	-4,93(0,6)	0,75	4,66
	GlyMet	3,49(3)	6,37(4)	-4,52(4)	0,61	4,61
	MetGly	2,51(2)	-	-5,15(1)	-	4,98
Co(II)	GlyVal	3,12(2)	5,41(6)	-6,27(5)	0,83	5,03
	GlyMet	2,99(1)	5,42(3)	-6,43(6)	0,56	5,11
	MetGly	2,45(4)	-	-6,28(5)	-	5,04
Cd(II)	GlyGly	3,05(2)	5,27(4)	-6,19(3)	0,83	5,04
	GlyMet	2,94(3)	5,46(4)	-6,63(7)	0,42	5,18
	MetGly	2,44(3)	4,39(10)	-6,63(3)	0,49	5,07

A komplexek stabilitási állandói Cu(II)- és Ni(II)ion esetén sem minden esetben utaltak a tioétercsoport és a fémion között kialakuló kölcsönhatásra, spektroszkópiás módszerekkel azonban kimutatható volt ennek léte. A Zn(II)-, Co(II)- és Cd(II)ionok peptidekkel való kölcsönhatása kismértékű, ezért a szerkezetvizsgáló módszerek is kevés információt nyújthatnak. Ezen fémionokra gyors ligandumcsere jellemző, a ¹H NMR spektrumokban átlagjeleket kapunk, így a jelek kismértékű eltolódását várhatjuk csupán.

A három fémion közül a Cd(II) esetén vártuk leginkább, hogy a kénatom koordinációja megvalósul, hiszen e 4d fémion soft karakterű, az irodalomból ismert, hogy tiolokhoz való affinitása meglehetősen nagy. Ezen fémion esetén rendelkezésünkre állt egy érzékeny kísérleti technika, a ¹¹³Cd NMR is.

Az irodalmi adatok hiányossága miatt (tioéterkén donoratomot tartalmazó ligandumok Cd(II)komplexeit ¹¹³Cd NMR technikával nem vizsgálták korábban) a metionintartalmú dipeptid (MetGly) mellett összehasonlításként a GlyGly

komplexét is vizsgáltuk azonos kísérleti körülmények között (azonos fém-ligandum arány (1:3), koncentráció ($c_{\text{Cd(II)}}=0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) és pH mellett). Mindkét esetben kb. 60 ppm kémiai eltolódásnál kaptunk egy, a gyors ligandumcsere miatt kiszélesedett jelet. A ^{113}Cd NMR kémiai eltolódás értéke igen érzékeny arra, hogy milyen donoratomok koordinálnak (3.6. ábra). A tiolcsoportot tartalmazó ligandumok komplexei esetén a kénatom koordinációjának hatására a jel nagymértékben eltolódott a nagyobb kémiai eltolódások irányába, ezért feltételezésünk szerint a Cd(II)-tioéterkén kölcsönhatás kialakulása is jelentős eltérést eredményezne. A GlyGly és a MetGly esetén közel azonos kémiai eltolódásnál kapott jel arra enged következtetni, hogy mindkét peptid azonos módon koordinálódik. A glicin és az általunk vizsgált peptidok esetén is (N,O) koordináció valósul meg, ami hasonló kémiai eltolódást eredményez. Ezzel összhangban a legegyszerűbb aminosav kadmium(II)komplexeinek vizsgálata során a $[\text{CdL}]^+$ összetételű komplexre korábban 53,6 ppm kémiai eltolódást kaptak.¹⁹⁵

A kapott eredmények alapján tehát a Zn(II)-, Co(II)- és Cd(II)komplexekben a tioéterkén donoratom koordinációját gyakorlatilag kizárhatjuk. A metionintartalmú peptidok mindhárom fémionnal $[\text{ML}]^+$ összetételű komplexképződése közben reagálnak, melyben a peptid (NH_2, CO) koordinációjú.

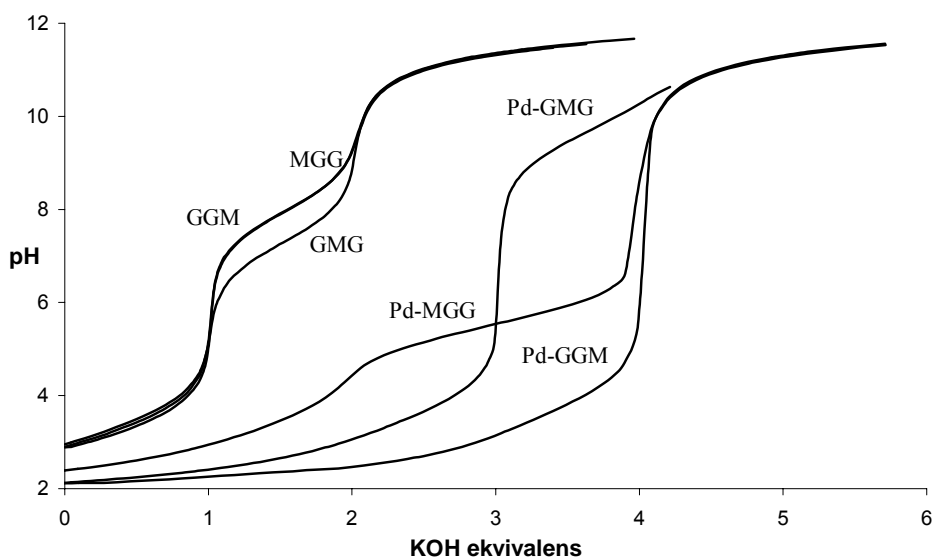
4.1.4. Metionintartalmú di- és tripeptidok Pd(II)komplexei

A Pd(II)ion soft karakterének megfelelően erősen köti a kén donoratomot, emellett az amidkötés deprotonálódását és koordinálódását is elősegíti, így peptidkomplexei igen nagy stabilitásúak. Mivel a metionintartalmú dipeptidekkel képezett komplexeit oldategyensúlyi szempontból korábban nem vizsgálták, így a vizsgált ligandumok körét, a tripeptidek mellett két dipeptidre (GlyMet és a MetGly) is kiterjesztettük.

A potenciometriás, NMR és CD spektroszkópiás vizsgálatok egyaránt alátámasztják, hogy e fémionnal a tioétercsoport az elsődleges fémionmegkötő hely. Ez a komplexek kiemelkedően nagy termodinamikai stabilitását és a szokásostól számottevően eltérő szerkezetek kialakulását eredményezi. A korábbi tárgyalásmódtól eltérően, az egyes ligandumok eredményeit külön-külön ismertetem, mivel a Pd(II)ionnal az egyes peptidok viselkedése jelentősen eltér.

A 4.9. ábrán jellemző példaként a három egy tioétercsoportot tartalmazó tripeptid 1:1 fém-ligandum arányhoz tartozó titrálási görbéje látható. A korábban

ismertetett fémionokkal (Cu(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Co(II)) ellentétben, amelyek esetén a különböző ligandumokhoz tartozó görbék gyakorlatilag együtt futnak, a Pd(II)ion esetében nagymértékben eltérnek egymástól, ami azt jelzi, hogy a Pd(II)ion a három ligandummal eltérő összetételű és stabilitású komplexeket képez.



4.9. ábra Pd(II)-egy tioétercsoportot tartalmazó tripeptid rendszerek titrálási görbéi
1:1 fémion-ligandum arány, $c_{\text{Pd(II)}} = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

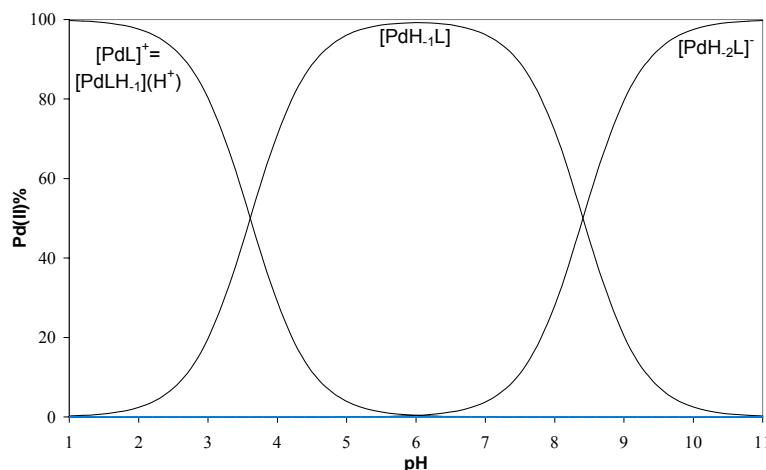
GlyMetGly és GlyMet

A komplexképződési reakciók nagyon hasonlók GlyMet és GlyMetGly esetén. A tripeptidnek csak az egyik amidcsoportja deprotonálódik, dipeptidszerűen viselkedik. A másik peptidnitrogén nem koordinálódik a fémionhoz egyetlen pH-n és fém-ligandum arány mellett sem.

Potenciometriás titrálást állandó ionerősség ($0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) mellett, de különböző kloridion-koncentrációk ($0,01\text{-}0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) esetében is végeztünk. Megállapítottuk, hogy a kloridion-koncentráció változtatásának nincs hatása a komplexképződési folyamatokra. A savas pH-tartományban egyszerű sav-bázis titrálásként kezelhetők a kapott titrálási görbék: három ekvivalens lúgfogyás tapasztalható, ami megfelel az amino- és az amidnitrogén mellett a karboxilcsoport deprotonálódásának. Az egyszerű dipeptidek esetén korábban tapasztaltakkal⁷⁰ ellentétben a kloridion nem képes visszaszorítani a komplexképződést a vizsgálható

pH-tartományba, a $(\text{NH}_2, \text{N}^+, \text{S})$ koordináció $([\text{PdL}]^+)$ komplex) $\text{pH} < 2$ -re kialakul. Ezen a pH-n a peptid karboxilátcsoportja még protonált, a deprotonálódás a 2-5 pH-tartományban következik be. A 7-10 pH-tartományban egy újabb, extra deprotonálódás tapasztalható, ami hidroxokomplex képződésnek felel meg. Ennek pontos pH-tartománya függ a kloridkoncentrációtól, hiszen a klorid- és a hidroxidion verseng a komplex szabad koordinációs helyéért, és a kloridion nagy feleslege részben visszazorítja a hidrolízist. A különböző kloridkoncentrációk mellett felvett titrálási görbék számítógépes kiértékelésével a kloro- és a hidroxokomplexek stabilitási állandói számíthatók.

A 4.10. ábrán a Pd(II)-GlyMet rendszerben 1:1 fém-ligandum arány mellett képződő komplexek koncentráció-eloszlási görbéi láthatók. GlyMetGly esetén, hasonló módon, ekvimoláris oldatban $[\text{PdL}]^+$, $[\text{PdLH}_1]$, $[\text{PdLH}_2]$, $[\text{PdLCl}]$ és $[\text{PdLH}_1\text{Cl}]$ összetételű komplexek képződnek.



4.10. ábra A Pd(II)-GlyMet rendszerben képződő komplexek koncentrációelozslási görbéi
 $c_{\text{Pd(II)}} = c_{\text{GM}} = 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

A 4.9. táblázat a két ligandum és a $[\text{PdL}]^+$ komplexeik protonálódási állandóit, valamint a kloro- és hidroxokomplexek stabilitási állandóit foglalja össze. Összehasonlításként a diglicin és a triglicin Pd(II)komplexeinek egyensúlyi adatait is feltüntettem. Egyes esetekben a pK értékében jelentős eltérés tapasztalható a metionintartalmú peptid és a megfelelő oligoglicin között. Míg a Pd-GlyMet illetve GlyMetGly rendszerben az (első) amidnitrogén deprotonálódása erősen savas közegben következik be, az oligoglicin esetén a folyamat a karboxilcsoport deprotonálódásával átfedésben játszódik le. Másrészt a $[\text{PdLH}_2]$ komplex

képződése során GlyGly, GlyMet és GlyMetGly esetén hidrolízis, míg triglicin esetén a második amidcsoport deprotonálódása és koordinálódása következik be.

4.9. táblázat A GlyMet és a GlyMetGly protonálódási állandói és Pd(II)komplexeik egyensúlyi paraméterei (I=0,2 mol dm⁻³ (KCl+KNO₃), T=298 K)

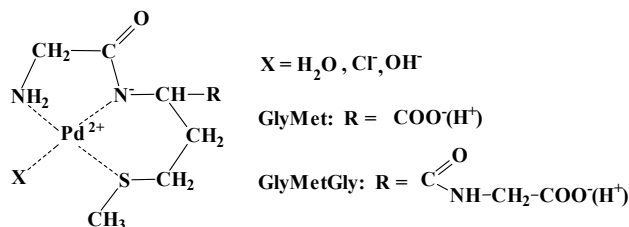
	GlyMet	GlyGly ²³	GlyMetGly	GlyGlyGly ²³
pK(COOH)	3,03(1)	3,10	3,41(1)	3,32
pK(NH ₃ ⁺)	8,15(1)	8,11	7,98(1)	7,93
pK ([PdL] ⁺ → [PdH ₁ L])	3,61(4)	2,52	3,65(5)	3,27
logK ([PdH ₁ L] → [PdH ₁ LCl] ⁻)	2,03(3)	1,99	2,21(5)	–
logK ([PdH ₁ L] → [PdH ₂ L] ⁻)	5,34(2) ^a	5,07 ^a	5,57(4) ^a	3,58 ^b

^a Hidroxokomplex képződése.

^b A második amidnitrogén deprotonálódása.

A 4.9. táblázat nem tartalmazza a [PdLH₁] összetételű komplexek stabilitási állandóit, mivel a tioétercsoportot tartalmazó peptidek ezen adatát potenciometriás módszerrel nem lehet meghatározni. A GlyGly megfelelő komplexének állandóját figyelembe véve, (amely lgβ([PdLH₁]) = 13,57⁷⁰) a GlyMet komplexének stabilitási állandója legalább 15 logaritmusos egység. A Pd(II)ion és GlyMet ekvimoláris oldata pH~2-n ennél kisebb állandó esetén ugyanis tartalmazna szabad ligandumot, ami ellentétben áll a kísérleti tapasztalattal.

A [PdL]⁺ és a [PdLH₁] összetételű komplex kötésmódja azonos, (NH₂, N, S), csak a nem koordinálódó karboxilátcsoport protonáltságában különböznek (a [PdL]⁺-ban protonált). A fémion negyedik koordinációs helyét a 4.11. ábrának megfelelően egy vízmolekula ([PdL]⁺ és [PdLH₁]), kloridion ([PdLCl] és [PdLH₁Cl]⁻) vagy hidroxidion ([PdLH₂]⁻) foglalhatja el.



4.11. ábra A GlyMet és a GlyMetGly [PdL]⁺ és [PdLH₁] összetételű komplexei

4.10. táblázat A Pd(II)-GlyMet rendszer NMR spektrumában különböző pD-ken és fém-ligandum arányok mellett detektálható jelek kémiai eltolódásai (ppm)

arány/pD	részecske	kötésmód	CH ₂ (Gly)	CH ₃ (S)	CH
0/1,8	[H ₂ L] ⁺	[NH ₃ -COOH] ⁺	3,873	2,105	>4,50
0/6,0	[HL]	[NH ₃ -COO]	3,855	2,118	4,326
0/10,7	[L] ⁻	[NH ₂ -COO] ⁻	3,360	2,114	4,328
1/1,8	[PdL] ⁺	[NH ₂ ,N ⁻ ,S](COOH)	3,502	2,495	4,240
1/5,5	[PdH ₁ L]	[NH ₂ ,N ⁻ ,S](COO ⁻)	3,499	2,495	4,030
1/10,6	[PdH ₂ L] ⁻	[NH ₂ ,N ⁻ ,S](COO ⁻)(OH)	3,517	2,456	3,960
0,5/2,0	[PdH ₂ L ₂] ²⁺	[NH ₂ ,N ⁻ ,S](COOH)	3,501	2,469	*
		[-S-(NH ₃ -COOH)]	3,880	2,585	
0,5/5,0	[PdL ₂]	[NH ₂ ,N ⁻ ,S](COO ⁻)	3,495	2,457	*
		[-S-(NH ₃ -COO ⁻)]	3,875	2,573	
0,5/9,3	[PdH ₁ L ₂] ⁻	[NH ₂ ,N ⁻ ,S](COO ⁻)	3,533	2,548	*
		[-NH ₂ -(S-COO ⁻)]	3,50	2,12	

* nem határozható meg

4.11. táblázat A Pd(II)-GlyMetGly rendszer NMR spektrumában különböző pD-ken és fém-ligandum arányok mellett detektálható jelek kémiai eltolódásai (ppm)

arány/ pD	részecske	kötésmód	CH ₂ (N)		CH ₂ (C)		CH ₃ (S)	CH
			A	B	A	B		
0/1,8	[H ₂ L] ⁺	[NH ₃ -COOH] ⁺	3,873	3,975	4,038	2,105	4,56	
0/6,6	[HL]	[NH ₃ -COO]	3,885	3,750	3,807	2,121	4,56	
0/10,7	[L] ⁻	[NH ₂ -COO] ⁻	3,393	3,741	3,804	2,120	4,56	
1/1,8	[PdL] ⁺	[NH ₂ ,N ⁻ ,S](COOH)	3,484	3,539	3,930	4,100	2,512	4,24
1/4,8	[PdH ₁ L]	[NH ₂ ,N ⁻ ,S](COO ⁻)	3,500	3,553	3,713	3,869	2,514	4,23
1/10,6	[PdH ₂ L] ⁻	[NH ₂ ,N ⁻ ,S](COO ⁻)(OH)	3,546	3,701	3,860	2,476	4,23	
0,5/2,0	[PdH ₂ L ₂] ²⁺	[NH ₂ ,N ⁻ ,S](COOH)	3,483	3,536	*	2,472	4,24	
		[-S-(NH ₃ -COOH)]	3,876			2,596	4,55	
0,5/4,9	[PdL ₂]	[NH ₂ ,N ⁻ ,S](COO ⁻)	3,520		*	2,478	4,24	
		[-S-(NH ₃ -COO ⁻)]	3,916			2,598	4,55	
0,5/8,7	[PdH ₁ L ₂] ⁻	[NH ₂ ,N ⁻ ,S](COO ⁻)	3,569		*	2,566	4,24	
		[-NH ₂ -(S-COO ⁻)]	3,587			2,121	4,55	

* nem határozható meg

A képződő komplexek szerkezetét NMR és CD spektroszkópiás módszerrel igazoltuk. A 4.10. táblázat a GlyMet, míg a 4.11. táblázat a GlyMetGly és Pd(II)komplexeik NMR paramétereit tartalmazza.

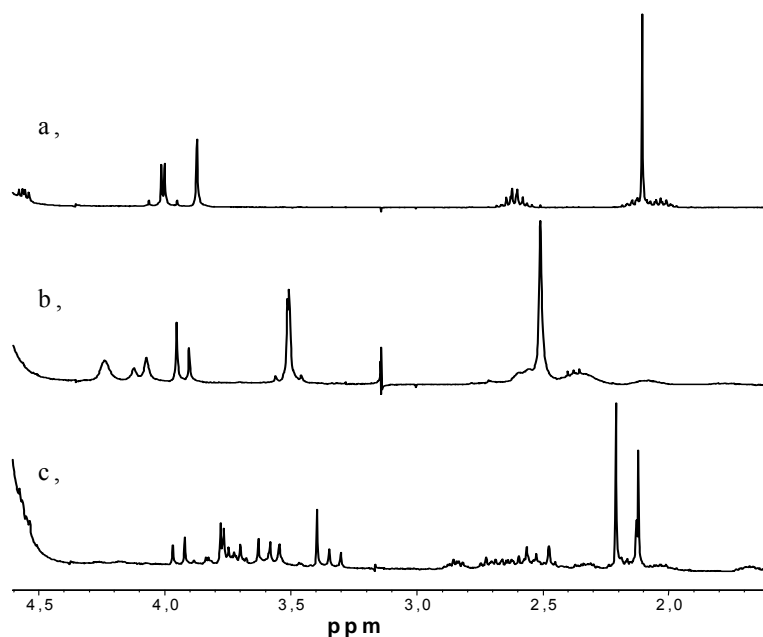
A metionin oldalláncában a tioéterkén donoratom melletti metilcsoport kémiai eltolódása gyakorlatilag független a ligandum protonáltsági állapotától, jelentősen megváltozik azonban, ha a tioétercsoport a Pd(II)ionhoz koordinálódik (0,3-0,4 ppm). Tehát a metilprotonok jele a tioéterkén koordinációjának kimutatására jól használható.

A kloridion jelenlétének gyakorlatilag nincs hatása az NMR paraméterekre, így a $[\text{PdLCl}]$ és a $[\text{PdL}]^+$, illetve a $[\text{PdLH}_1\text{Cl}]^-$ és a $[\text{PdLH}_1]$ nem különböztethető meg ezzel a módszerrel.

A Pd-GlyMet ekvimoláris oldatának NMR spektrumában még igen savas közeg esetén (pD~1,8) sem láthatók a szabad ligandum csúcsai az (NH₂,N⁺,S) koordinációjú $[\text{PdL}]^+$ komplex jelei mellett. A pD növelésének hatására pD~5-ig csak a metionil rész CH-protonjának kémiai eltolódása változik, a nem koordinálódó karboxilcsoport deprotonálódása következtében (a folyamatot jellemző pK 3,61 GlyMet, míg 3,65 GlyMetGly esetén), majd pD>7 tartományban az NMR paraméterek újabb kismértékű változása tapasztalható, ami a $[\text{PdLH}_2]$ összetételű hidroxokomplex képződésével magyarázható. A GlyMet N-terminális metilénprotonjai ekvivalensek a teljes vizsgált pH-tartományban (1,8-11), ami a ligandum háromfogú koordinációját igazolja.^{123,196}

Hasonló következtetések vonhatók le a Pd-GlyMetGly rendszerre is (4.11. táblázat), bár a jelek azonosítása e ligandum esetén sokkal bonyolultabb. Az N-terminális glicil CH₂-protonok (CH₂(N)) jele szingulett, míg a C-terminális helyzetűeké ((CH₂(C)) AB-típusú multipllett (4.12. ábra). A pH-potenciometriás vizsgálat eredményét alátámasztják az NMR spektrumok is: a Pd(II)iont és GlyMetGly-t azonos mennyiségben tartalmazó mintában a teljes vizsgált pH-tartományban a szabad ligandum jelenléte nem mutatható ki. A $[\text{PdL}]^+$ és a $[\text{PdLH}_1]$ komplexekben a CH₂(N) protonok jele felhasad, és a CH₂(C) protonok AB multipllettjét jellemző csatolási állandó is jelentősen megnő ($\Delta\nu_{\text{AB}}=0,06$ ppm szabad ligandum, míg 0,16 ppm a komplex esetén). Az NMR paraméterek ilyen jellegű változása annak a következménye, hogy az amino- és az amidnitrogén, valamint a tioéterkén koordinálódásával enyhén torzult síknégyzetes elrendeződés jön létre, amelyben a kötött tioéterkén donoratom és a peptidnek a fémion megkötésében részt nem vevő, nagy térkitöltésű része egy-egy kiralitáscentrumot eredményez.^{122,68} A

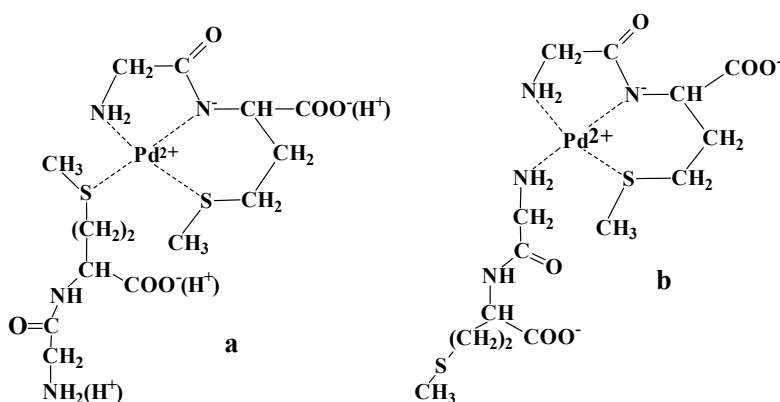
$\text{CH}_2(\text{C})$ jelének vonalszélessége függ a hőmérséklettől, ami a konformációban bekövetkező változásra utal. Az NMR spektrumok bizonyítják, hogy a GlyMetGly tioéterkén donoratomja kötött marad és a második amidnitrogén nem koordinálódik még enyhén lúgos közegben sem.



4.12. ábra A Pd(II)-GlyMetGly rendszer NMR spektruma
a, szabad ligandum pD=1,80 b, 1:1 fém-ligandum arány pD=1,80
c, 1:2 fém-ligandum arány pD=10,80

A Pd(II)iont és GlyMet-t illetve GlyMetGly-t azonos mennyiségben tartalmazó rendszerben széles pH-tartományban a peptid ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}$) koordinációja valósul meg, a fémion negyedik koordinációs helyét pedig vízmolekula, klorid-, vagy hidroxidion foglalhatja el. Ligandumfelesleg jelenlétében azonban egy második peptidmolekula is betöltheti ezt a helyet. Korábban GlyGly és más egyszerű dipeptidek Pd(II)komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata során mutatták ki, hogy $[\text{PdL}_2\text{H}_1]$ összetételű biszkomplexek képződnek, melyekben az egyik ligandum háromfogúként ($(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{COO}^-)$ koordináció), míg a másik egyfogúként, az aminosoporton keresztül kötődik. Nagyobb pH-n azonban mindkét peptidmolekula kétfogúként ($(\text{NH}_2, \text{N}^-)_2$) koordinálódik.⁷⁰ Más szerzők a GlyMet esetén is feltételezték, hogy az utóbbi kötésmód megvalósul, de csak erősen lúgos közegben ($\text{pH} > 13$).¹²³ A második GlyMet vagy GlyMetGly molekula egyfogú

koordinációja kétféleképpen is megvalósulhat, a tioéter- vagy az aminocsoporton keresztül. A tioétercsoport koordinációja pH-tól függetlenül megvalósulhat, potenciometriás módszerrel nem követhető. Az aminocsoporttal ellenben csak deprotonálódását követően alakulhat ki kölcsönhatás, ami monofunkciós Pd(II)komplexek esetén pH>4-6 valósul meg¹⁹⁷ és ebben az esetben a potenciometria is alkalmazható. A képződő kötési izomerek (tioéter/amino-koordináció) azonosíthatók az NMR spektrumok alapján.



4.13. ábra A GlyMet biszkomplexeinek szerkezete
a, $[\text{PdL}_2\text{H}_2]^{2+}$, $[\text{PdL}_2\text{H}]^+$ és $[\text{PdL}_2]$, b, $[\text{PdL}_2\text{H}_1]^-$ összetételű biszkomplex

A 4.10. és a 4.11. táblázat a Pd(II)-GlyMet illetve GlyMetGly rendszerben képződő biszkomplexek NMR paramétereit is tartalmazza. Látható, hogy mindkét ligandum esetén a $[\text{PdL}_2\text{H}_2]^{2+}$ ($=[\text{Pd}(\text{LH}_1)(\text{H})(\text{LH}_2)]$) és a $[\text{PdL}_2]$ ($=[\text{Pd}(\text{LH}_1)(\text{LH})]$) összetételű komplexek adatai nagyon hasonlóak, ami abból adódik, hogy koordinációs módjuk azonos, csak a nem koordinálódó karboxilcsoport protonáltsági állapotában különböznek. A 4.13.a ábrának megfelelően az előbb említett (illetve a külön nem azonosítható $[\text{PdL}_2\text{H}]^+$) biszkomplexeiben a második ligandum a tioéterkén donoratomon keresztül kötődik. A $[\text{PdL}_2\text{H}_2]^{2+}$ összetételű komplexben minden szabad donorcsoport protonált, míg a $[\text{PdL}_2]$ -ben csak az aminocsoportok. A kémiai eltolódásban tapasztalható kis eltérések a változatlan kötőmód mellett folytonosan változó protonáltsági állapotból adódnak.

Semleges illetve enyhén lúgos közegben az NMR spektrumokban két tendencia figyelhető meg. Egyrészt a Pd(II)ionhoz nem koordinálódó metionil-oldallánc jelének relatív intenzitása nő, másrészt a szabad ligandum mennyisége kismértékben csökken. Ez a változás azt jelzi, hogy a monodentát peptidmolekula nem a tioéter-, hanem az aminocsoportján keresztül kötődik a $[\text{PdL}_2\text{H}_1]^-$ összetételű

komplexben (4.13.b ábra). Ezen komplex képződésének hatására a háromfogúként koordinálódó peptid jelei kismértékben eltolódnak a nagyobb kémiai eltolódások irányába (downfield shift).

4.12. táblázat A GlyMet és GlyMetGly bisz- illetve GlyGly-nel képezett vegyesligandumú komplexeinek egyensúlyi állandói ($T=298\text{ K}$, $I=0,2\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)
($M=[\text{PdH}_1\text{L}]$, $L=\text{GlyMet}$ illetve GlyMetGly , $L'=\text{GlyGly}$)

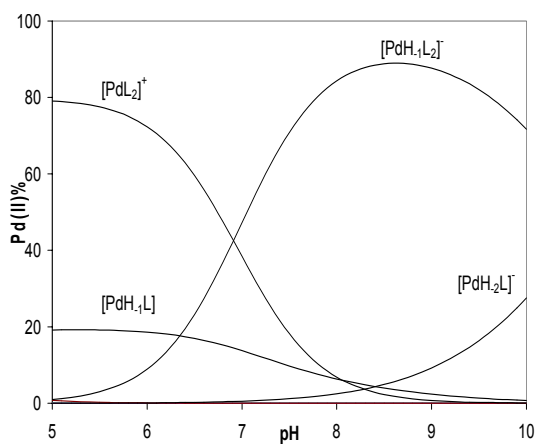
[reakció] (komplex)	GlyMet	GlyMetGly
$[\text{M} + \text{H} + \text{L}] ([\text{PdL}_2])$	11,47(5)	11,49(13)
$[\text{M} + \text{L}] ([\text{PdH}_1\text{L}_2]^-)$	4,56(2)	4,71(8)
$[\text{M} + \text{H}_1 + \text{L}] ([\text{PdH}_2\text{L}_2]^{2-})$	–	–4,99(2)
$[\text{M} + \text{L}'] ([\text{PdH}_1\text{LL}']^-)$	4,72(2)	4,50(2)

A $[\text{PdL}_2]$, $[\text{PdL}_2\text{H}_1]^-$ és $[\text{PdL}_2\text{H}_2]^{2-}$ összetételű komplexekben a második ligandum egyfogú koordinációját jellemző stabilitási állandók potenciometriás módszerrel meghatározhatók. A számítás során a fő részecske, a $[\text{PdLH}_1]$ komplex, monofunkciós fémionnak (M) tekinthető, amely a peptiddel (HL) $[\text{MHL}] (= [\text{PdL}_2])$, $[\text{ML}]^- (= [\text{PdL}_2\text{H}_1]^-)$ valamint $[\text{MLH}_1] (= [\text{PdL}_2\text{H}_2]^{2-})$ komplexek képződése közben reagál. Az íly módon számolt stabilitási állandókat tartalmazza a 4.12. táblázat.

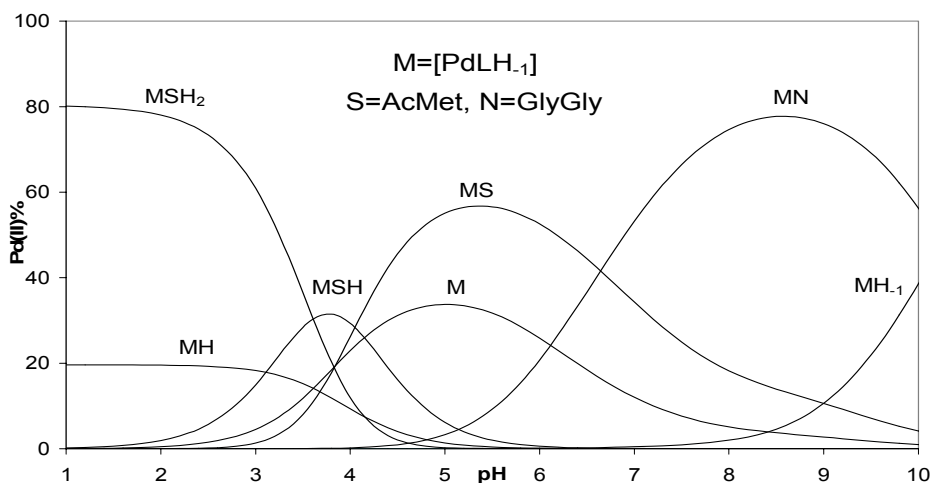
A biszkomplexekre kapott adatok realitását modellrendszerek vizsgálatával ellenőriztük. E célból potenciometriás módszerrel tanulmányoztuk a GlyMet illetve GlyMetGly $[\text{PdLH}_1]$ komplexét és GlyGly-t azonos mennyiségben tartalmazó rendszert. A GlyGly (L') csak az aminocsoporton keresztül kötődhet a Pd(II)komplex szabad koordinációs helyére, ami a $[\text{Pd}(\text{LH}_1)(L')]$ összetételű vegyesligandumú komplex képződését eredményezi. A folyamat során természetesen a metionintartalmú peptid helyett, a GlyGly háromfogú koordinációja is megvalósulhatna, de az NMR spektrumok alapján ez a reakció kizárható. A GlyMet Pd(II)komplexéhez $\text{pH}<5$ -n GlyGly-t adva az NMR spektrumban nem figyelhető meg változás, a GlyMet monokomplexe mellett a szabad GlyGly jelei láthatók. A pH-t növelve azonban, ($\text{pH}>5$) egy új jelcsoport észlelhető, amely az egyfogúként kötődő GlyGly-hez rendelhető, míg szabad GlyMet egyetlen pH-n sem detektálható. Ez az eredmény egy további bizonyítéka annak, hogy a GlyMet Pd(II)komplexe kiemelkedő termodinamikai stabilitással rendelkezik. A 4.12. táblázat a képződő vegyesligandumú komplexek stabilitási állandóit is tartalmazza. Az értékek jó egyezésben vannak a megfelelő biszkomplexek állandóival, ami azt

támasztja alá, hogy a $[\text{PdL}_2\text{H}_{-1}]^-$ összetételű biszkomplekre az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S})(\text{NH}_2)$ koordináció a jellemző. Ez a részecske a $[\text{PdL}_2]$ komplexben nem koordinálódó aminos csoport deprotonálódásával képződik. A folyamatot jellemző pK értéke 6,91 GlyMet, míg 6,78 GlyMetGly esetében. Ezek az értékek a szabad ligandum adatánál egy kicsivel kisebbek és alátámasztják az NMR vizsgálatok tapasztalatait, miszerint az aminos csoport deprotonálódása

átrendeződéssel jár együtt, vagyis a Pd(II)ion a tioéterkénről az aminonitrogén donortomra vándorol. Ezt a feltételezést támasztja alá a 4.14. és 4.15. ábrák közötti hasonlóság is. Előbbin a Pd(II)-GlyMet rendszerben 1:2 fém-ligandum arány mellett képződő komplexek koncentrációeloszlási görbéi láthatók, míg utóbbi egy modellszámítás eredménye a Pd(II)iont, GlyMet-t, N-acetilmetionint (AcMet) és GlyGly-t azonos mennyiségben tartalmazó oldatra.



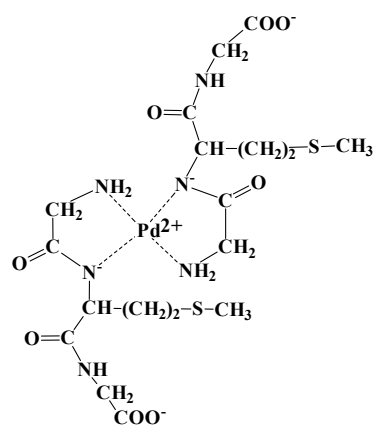
4.14. ábra A Pd(II)-GlyMet rendszerben 1:2 fém-ligandum arány mellett képződő komplexek koncentrációeloszlási görbéi ($c_{\text{Pd(II)}}=0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)



4.15. ábra A Pd(II):GlyMet:AcMet:GlyGly=1:1:1:1 modellszámításban képződő komplexek koncentrációeloszlási görbéi

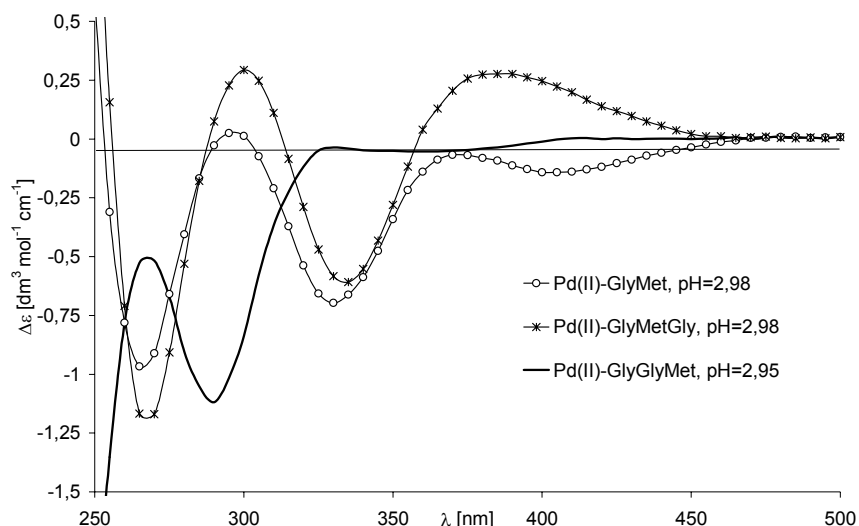
Kutatócsoportunkban korábban meghatározták az AcMet egyfogú koordinációját jellemző egyensúlyi állandót különböző, egy szabad koordinációs helyet tartalmazó Pd(II)komplexek esetén, melynek során a GlyMet [PdLH₁] komplexére lgK= 3,24 értéket kaptak.¹⁹⁸ A számítás során ezt az értéket, illetve a 4.12. táblázat adatait használtuk fel. A 4.15. ábrán M jelöli a GlyMet [PdLH₁] összetételű komplexét, N a nitrogéndonor GlyGly-t, míg S az AcMet-t, amely a tioéterkénen keresztüli egyfogú koordináció modellje. Az NMR vizsgálatok eredménye alátámasztja, hogy az M egység, vagyis a GlyMet háromfogú koordinációjával képződő komplex, a 4.15. ábra teljes pH-tartományában változatlan szerkezetű marad. A két ábrát összevetve arra következtethetünk, hogy a második, egyfogúként kötődő peptidmolekula a [PdL₂] komplexben az MS részecskével megegyező módon, a tioétercsoporton, míg a [PdL₂H₁] összetételű részecskében, az MN vegyeskomplexhez hasonlóan, az aminocsoporton keresztül koordinálódik. A 4.15. ábra legfőbb előnye, hogy lehetővé teszi a biszkomplexek azonosítását savas közegben (pH<5), ami pH-potenciometriás módszerrel nem lehetséges. Az MH részecske a [PdL]⁺ komplexet jelöli, amelyre a peptidmolekula (NH₂,N,S) koordinációja és protonált karboxilcsoport jellemző, az MSH₂ pedig a [PdL₂H₂]²⁺ komplexszel analóg, amelyben minden nem koordinálódó donoresoport protonált és a második ligandum a tioétercsoporton keresztül kötődik. Az is látható a két ábrát összevetve, hogy a nitrogén donoratomon keresztüli koordinációval képződő biszkomplexek mennyisége nagyobb, egyezésben az NMR vizsgálat tapasztalataival, miszerint enyhén lúgos közegben a nitrogéndonorok kiszorítják a kéndonorokat a fémion koordinációs szférájából és ez a folyamat a szabad ligandum koncentrációjának kismértékű csökkenésével jár.

A GlyMet és a GlyMetGly Pd(II)ionnal nagyon hasonlóan reagál, a komplexképződési reakcióik csupán egy ponton térnek el, nevezetesen [PdL₂H₂]²⁺ komplex képződése csak a Pd(II)-GlyMetGly rendszerben következik be pH>9-n. Ez az extra lúgfogyasztó folyamat a GlyMetGly háromfogú koordinációjának felbomlását eredményezi, az NMR spektrumban a pH növelésével a koordinált tioétercsoporthoz rendelhető csúcs jelentősen csökken, és ahogy az a 4.12. ábrán is látszik, pD=11-re szinte teljesen eltűnik. Ezzel egyidőben két új jel (2,120 és 2,209



4.16. ábra A GlyMetGly [PdL₂H₂]²⁺ összetételű komplexének szerkezete

ppm) fejlődik ki és mindkét CH_2 -csoport jele AB típusú multipletté válik. Ez a változás azt jelzi, hogy a képződő biszkomplexben négy nitrogén donoratom koordinálódik a fémionhoz, vagyis a peptid kétfogú ligandumként kötődik és a tioétercsoport szabaddá válik (4.16. ábra). Hasonló szerkezetű komplex képződését GlyMet esetén korábban is feltételezték, de a GlyMetGly-re jellemzőnél sokkal nagyobb pH-n ($\text{pH} > 13$). A $[\text{PdL}_2\text{H}_2]^{2-}$ komplex képződésében tapasztalható eltérés talán azzal magyarázható, hogy a tripeptid C-terminális része, amely nem koordinálódik a fémionhoz, nagymértékben torzítja a ligandum háromfogú kötődésével kialakuló komplex szerkezetét, míg a dipeptid esetén a karboxilátcsoportnak ilyen jellegű hatása jóval kisebb mértékű.



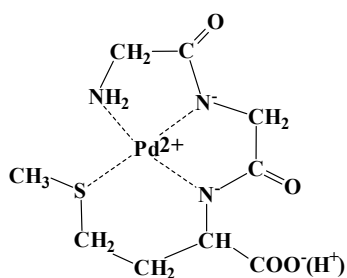
4.17. ábra A Pd(II)-peptid rendszerek CD spektruma 1:1 fémion-ligandum arány mellett GlyMet, GlyMetGly és a GlyGlyMet esetén ($c_{\text{Pd(II)}} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

A CD spektroszkópiás vizsgálatok eredményei is igazolják, hogy a ligandum koordinációs módja a GlyMet és a GlyMetGly Pd(II)komplexeiben megegyezik. A 4.17. ábrán jellemző példaként a $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ -ot és GlyMet-t illetve GlyMetGly-t azonos mennyiségben tartalmazó oldatok savas közegben ($\text{pH} \sim 3$) felvett CD spektrumait tüntettem fel. Közöttük a 370 nm-nél kisebb hullámhosszakon a hasonlóság igen szembevetendő. A komplexek paraméterei jelentősen eltérnek a GlyAla analóg komplexére Wilson és Martin által kapott értékektől (375 nm (-0,8); 320 nm (+0,25)),¹⁹² ami az egyszerű, nem koordinálódó oldalláncot tartalmazó dipeptidektől eltérő koordinációs mód kialakulását bizonyítja.

A Pd(II)-GlyMet/GlyMetGly rendszer CD spektrumának alakja nem változik és a maximumai és minimumai sem tolódnak el jelentős mértékben a pH, vagy a kloridion-koncentráció növelésének hatására. Emellett a peptidet feleslegben tartalmazó minták esetén is csak kis módosulás észlelhető, hiszen a második ligandum egyfogúként koordinálódik, ami nem eredményez mérhető változást a spektrumban.

GlyGlyMet

A GlyGlyMet komplexképződési reakciói jelentősen eltérnek az előbbiektől, a GlyMet és GlyMetGly esetén leírtaktól. Ahogyan az 1:1 fém-ligandum arány esetén kapott titrálási görbéből (4.9. ábra) látható, a savas pH-



4.18. ábra A GlyGlyMet [PdLH₂]⁺ összetételű komplexének szerkezete

tartományban két ekvivalens extra lúgfogyás tapasztalható, vagyis mindkét amidnitrogén deprotonálódása és koordinálódása bekövetkezik. Az NMR (4.13. táblázat) és CD spektroszkópiás vizsgálatok eredményei bizonyítják, hogy pH~2,5-re a ligandum négyfogúként, az amino-, a két deprotonálódott amidnitrogén és a tioéterkén donoratomokon keresztül koordinálódik, és telíti a Pd(II)ion koordinációs szféráját. A képződő komplex szerkezete a 4.18. ábrán látható.

4.13. táblázat A Pd(II)-GlyMet rendszer NMR spektrumában különböző pD-ken és fém-ligandum arányok mellett detektálható jelek kémiai eltolódásai (ppm)

részecske	arány/ pD	kötésmód	CH ₂ (N)	CH ₂ (közb)		CH ₃ (S)	CH
				A	B		
[H ₂ L] ⁺	0/1,7	[NH ₃ ⁺ -COOH]	3,890	4,040		2,101	4,58
[HL]	0/5,0	[NH ₃ ⁺ -COO ⁻]	3,917	4,037		2,114	4,33
[L] ⁻	0/10,6	[NH ₂ -COO ⁻]	3,410	3,990		2,113	4,33
[PdH ₂ L] ³⁺	1/1,5	[S](NH ₃ ⁺ -COOH)	3,914	4,069		2,275	4,33
[PdH ₁ L]	1/3,2	[NH ₂ N ⁻ N ⁻ S](COOH)	3,597	3,842	3,902	2,449	4,27
[PdH ₂ L] ⁻	1/10,4	[NH ₂ N ⁻ N ⁻ S](COO ⁻)	3,609	3,872		2,459	4,14

A Pd(II)-GlyGlyMet rendszer CD spektrumában (4.17. ábra) egy eléggé intenzív negatív Cotton-effektusú sáv található 290 nm hullámhossznál ($\Delta\epsilon=-1,15$), míg korábban a Pd(II)-GlyGlyAla rendszer esetén az alábbi paramétereket közölték: 335 nm (-1,00) és 290 nm (+0,37).¹⁹² A CD spektrumban tapasztalt jelentős eltérés alátámasztja, hogy a két peptid eltérő módon koordinálódik a $[\text{PdLH}_2]$ összetételű komplexben, a GlyGlyMet esetén tehát az egyszerű tripeptidektől eltérően nem $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{COO}^-)$, hanem $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S})$ koordináció valósul meg.

A komplex NMR spektrumában az N-terminális glicin metilén protonjai ($\text{CH}_2(\text{N})$) a teljes vizsgált pH-tartományban szingulett jelet adnak. Ellenben a közbenső helyzetűek ($\text{CH}_2(\text{közb.})$) jele, ami szingulett a szabad ligandum esetén, AB típusú multiplétté válik a nagyon savas közegben képződő komplexben, majd pH~5 felett újra szingulett. Ezzel párhuzamosan a C-terminális metionin CH-protonjának jele a kisebb kémiai eltolódások irányában tolódik el, a nem koordinálódó karboxilcsoport 3-5 pH-tartományban lejátszódó deprotonálódása következtében. Potenciometriás módszerrel $\text{pK}=4,16(3)$ értéket kaptunk erre a deprotonálódásra, ami a szabad ligandum megfelelő adatánál ($\text{pK}(\text{COOH})=3,08$, $\text{pK}(\text{NH}_3^+)=7,93$) sokkal nagyobb. Korábban a karboxilcsoport deprotonálódását jellemző pK értékének növekedését a GlyHis Pd(II)komplexében figyelték meg ($\text{pK}\sim 4,0$), amit a deprotonálódott amidcsoport okozta extra negatív töltéssel magyaráztak.¹⁹⁹ A karboxil pK értéke a GlyMet (3,61) és a GlyMetGly (3,65) Pd(II)komplexe esetén is nagyobb, mint a szabad ligandumé. A két utóbbi peptid esetén a karboxilátcsoport bázicitásának kisebb mértékű növekedése azzal magyarázható, hogy komplexeikben a fémion koordinációs szférájában csak egy deprotonálódott peptidnitrogén található, míg a GlyGlyMet komplexében kettő. A metilén protonok jelének AB-típusú felhasadása pH~5-re megszűnik, vagyis a $[\text{PdLH}_2]$ részecskét szabályos geometria jellemzi, míg a nem koordinálódó karboxilátcsoport protonálódása a sík szerkezet torzulását eredményezi a $[\text{PdLH}_1]$ komplexben.

Az NMR és a CD spektrumban sem a pH további növelése, sem a ligandum feleslege nem eredményez újabb változást, ami alátámasztja az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S})$ koordinációs módú, síknégyzetes komplex kiemelkedő termodinamikai stabilitását. A komplex nagy stabilitása miatt a titrálási görbék kvantitatív kiértékelése e peptid esetén sem lehetséges.

Az NMR spektrumokban azonban pD~1,5-n egy újabb jelcsoport megjelenése tapasztalható. A tioéterkén melletti metilcsoport protonjainak kémiai eltolódása ebben a komplexben kevésbé tér el (~0,17 ppm-el) a szabad

ligandumétól, mint a $[\text{PdLH}_2]$ komplexben. Ennek a jelnek a kémiai eltolódása nem változik, csak intenzitása csökken a pD növelésével, majd pD=2,5-re eltűnik. A spektrum ilyen jellegű változását a peptidmolekula C-terminális oldalláncának egyfogú, tioéterkén donoratomon keresztüli koordinációja, vagy (S,O) kelát képződése okozhatja. Ha az AcMet a tioétercsoportján keresztül a $[\text{Pd}(\text{dien})]^{2+}$ szabad koordinációs helyére kötődik, az a tioéterkén melletti metilcsoport jelének kémiai eltolódásában 0,268 ppm változást okoz,¹⁹⁸ míg $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ -al reagálva csak 0,157 ppm-mel nő. Ez arra utal tehát, hogy a 2,273 ppm kémiai eltolódású CH_3 jel koordinatív telítetlen fémionhoz kötődő tioétercsoportnak felel meg. Ezen komplex összetétele $[\text{PdLH}_2]^{3+}$ kell legyen (kötött tioéter- és protonált aminocsoport). Mivel a tioétercsoport kötődése nem jár pH-változással, így potenciometriás módszerrel e részecske nem detektálható és stabilitási állandója nem számítható.

Az NMR vizsgálat bizonyítja, hogy a tioétercsoport horgonydonorként viselkedik, a nitrogén donoratomok (egy amino- és két amidnitrogén) deprotonálódását és koordinálódását elősegíti, melyek így kooperatív módon játszódnak le, hiszen csupán a 4.13. táblázatban összefoglalt jelcsoportok láthatók az NMR spektrumokban. Emellett fontos megemlíteni, hogy a nem koordinált tioétercsoportoz rendelhető jel nem figyelhető meg egyetlen pH-n sem 1:1 fém-ligandum arányú minta esetében.

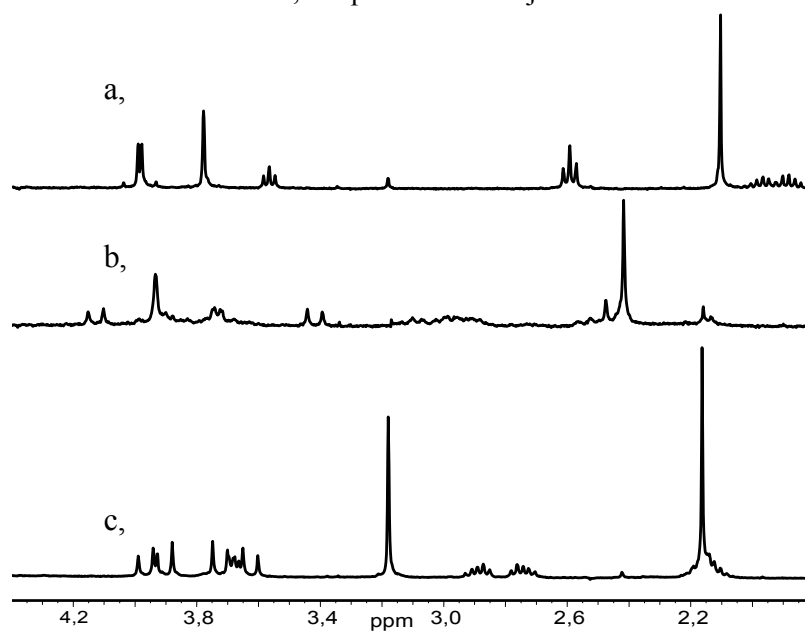
A $[\text{PdLH}_2]$ komplex kiemelkedő termodinamikai stabilitása kis reaktivitással jár együtt. A $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S})$ koordináció nem bomlik fel, hidroxó-, vagy biszkomplex nem képződik. Másrészt a kis reakciókészség a komplex kémiai inertségére utal. $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ és GlyGlyMet összekeverése után az egyfogú tioéterkoordinációra jellemző NMR spektrum szinte azonnal kialakul. Ellenben, ha a $[\text{PdLH}_1]$ vagy a $[\text{PdLH}_2]$ komplexet, amelyekben a peptid $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S})$ koordinációjú, állítjuk elő először és ezután savanyítjuk vissza az oldatot, a $[\text{PdLH}_2]^{3+}$ részecske csak lassú reakcióban képződik, a felezési idő szobahőmérsékleten kb. 20 perc.

MetGly és MetGlyGly

Az N-terminális helyzetben metionint tartalmazó, di- és tripeptid (MetGly és MetGlyGly) Pd(II)ionnal képezett komplexeinek vizsgálata során hasonló viselkedést tapasztaltunk, ezért e két peptidre vonatkozó eredményeinket együtt tárgyaljuk.

A képződő komplexek nagy stabilitása következtében e két peptid esetén sem tudtuk a stabilitási állandók értékét meghatározni. A MetGly esetében a potenciometriás és NMR méréseket korlátozta az is, hogy a vizsgálati körülmények mellett az 1:1 fém-ligandum arányú mintákban már $\text{pH} < 3$ -n csapadék képződik, ami a pH növelésével sem oldódik fel. A tripeptid vizsgálata során azonban csapadékképződés nem zavarta a vizsgálatainkat.

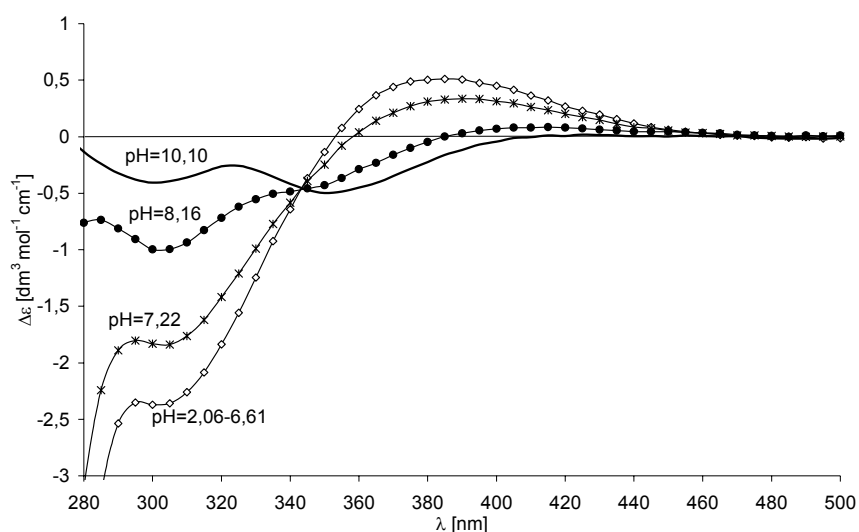
A 4.9. ábrán az egy tioétercsoportot különböző helyzetben tartalmazó tripeptidek között a MetGlyGly ekvimoláris oldatának titrálási görbéje is szerepel. A görbéből jól látható, hogy az amidnitrogének deprotonálódását és koordinálódását kísérő extra lúgfogyás csak $\text{pH} \sim 5$ -n tapasztalható. A két peptidcsoport deprotonálódása nem különül el, kooperatív módon játszódik le.



4.19 ábra A Pd(II)-MetGlyGly rendszer NMR spektruma
 a, szabad ligandum $\text{pD}=10,37$ b, 1:1 fém-ligandum arány $\text{pD}=11,00$
 c, 1:2 fém-ligandum arány $\text{pD}=10,21$

A képződő komplexek szerkezetéről az NMR spektroszkópiás vizsgálatok eredményei szolgáltatnak információt. Kis pH -n a tripeptid a metionin aminosavhoz hasonló módon, (NH_2, S) koordinációval kötődik a fémionhoz. A pH -t növelve peptidszerű koordináció jön létre, amely 1:1 fém-ligandum arány esetén tioéterhidas oligomer szerkezet kialakulását eredményezi. Ligandumfelesleg mellett a pH -tól

függően metioninszerű illetve négy nitrogén donoratomot tartalmazó biszkomplexek keletkeznek. A 4.19. ábra a ligandum és a lúgos oldatban (pH~10) képződő komplexek NMR spektrumait mutatja. A tioéterkén donoratom koordinációja a metilcsoport jelen könnyen nyomonkövethető. A ligandumot feleslegben tartalmazó minta esetén eltűnik a kötött tioétercsoportra jellemző csúcs, a kénatom kiszorul a koordinációs szférából, ekvimoláris oldatban ellenben kötött marad.



4.20. ábra A Pd(II)-MetGly rendszer CD spektruma 1:2 fémion-ligandum arány mellett különböző pH-kon ($c_{\text{Pd(II)}} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

A Pd(II)ion MetGly-nel képezett komplexeit NMR spektroszkópiás módszerrel csapadék képződése miatt nem tudtuk tanulmányozni. A CD spektroszkópiás vizsgálatok során azonban a palládiumion koncentrációja a potenciometriás és NMR spektroszkópiás vizsgálatok esetén szokásosnál jóval kisebb, kb. $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ volt. Ilyen körülmények között a polimerizáció kisebb mértékű, így a képződő komplex vízdoldható, a rendszer 1:1 fém-ligandum arány mellett is vizsgálható. A 4.20. ábrán a Pd(II)iont és MetGly-t 1:2 arányban tartalmazó minta CD spektruma látható különböző pH-kon. A 2,06-6,61 pH-tartományban felvett spektrumok nem különböznek egymástól, spektrális paramétereik (381 nm (+0,62), 305 nm (-2,56)) jó egyezésben vannak a metionin aminosav palládiumionnal képezett biszkomplexének adataival (379 nm (+0,32), 300 nm (-1,80)¹⁹²), ami alátámasztja, hogy (NH₂,S) koordináció valósul meg a

dipeptid biszkomplexében is. E koordinációs mód kiemelkedő termodinamikai stabilitásáról egy közelmúltban megjelent közlemény is beszámolt.¹²⁶ Ebben az erősen savas közegben kialakuló komplexben a fémion koordinációs szférája telített, pH~7-ig csak a nem koordinálódó karboxilcsoport deprotonálódása következik be, ami nem okoz változást a CD spektrumban. A ligandum eltérő koordinációs módjára utaló spektrális változás csak pH>7 figyelhető meg. A 315 nm-nél tapasztalt izobesztikus pont arra utal, hogy a 7-10 pH-tartományban két részecske van jelen az oldatban. A Pd(II)-MetGly=1:2 rendszer esetén pH>10-n észlelt spektrum (350 nm (-0,50), 301 nm (-0,41)) emlékeztet a Pd(II)-AlaGly vizsgálata során tapasztaltra (360 nm (-0,32), 279 nm (-0,35)), ami arra utal, hogy mindkét dipeptid biszkomplexében lúgos közegben kétfogú ligandumként, (NH₂,N') koordinációval kötődik.⁷⁰

Ekvimoláris oldatban a CD spektrum változása a többmagvú komplexek képződése miatt igen bonyolult. Erősen savas közegben (pH<3) a dipeptid kétfogú, (NH₂,S) koordinációjával képződő egymagvú komplex van jelen az oldatban. A pH növelésével a CD átmenetet jellemző hullámhossz és intenzitás is jelentősen változik, de sem izobesztikus pont, sem a spektrum telítési görbe szerinti változása nem figyelhető meg. NMR spektroszkópiás vizsgálatok alapján korábban arra a következtetésre jutottak, hogy az amidnitrogén deprotonálódásával és koordinálódásával kialakuló (NH₂,N',COO⁻) koordinációs módú egységeket a tioétercsoport kénatomja hídként köti össze.¹²³ A pH további növelése hidroxokomplex képződését eredményezi, amely szintén lehet többmagvú, a híd szerepét a hidroxidion, vagy a tioétercsoport töltheti be.

Több metionint tartalmazó tripeptidek Pd(II)komplexei

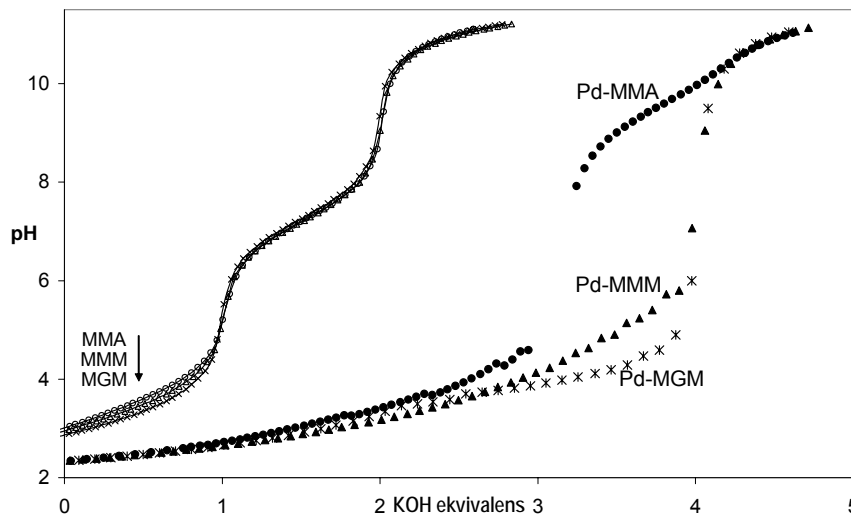
Az egy tioétercsoportot tartalmazó tripeptidek Pd(II)komplexeire vonatkozó eredmények rávilágítottak arra, hogy az oldallánc molekulán belüli helyzete jelentősen befolyásolja a komplexképződési folyamatokat. A kialakuló komplexek összetétele, koordinációs módja, illetve a reakció lejátszódását jellemző pH-tartomány függ attól, hogy a metionin a ligandumban közbenső helyzetű, vagy C- illetve N-terminális aminosav.

Több tioétercsoportot tartalmazó peptidek vizsgálata választ adhat arra a kérdésre, hogy több metionil-oldallánc együttes jelenlétekor, melyik hatása lesz a meghatározó. E peptideknél lehetőség van emellett az előbbieken ismertetettől eltérő koordinációs módok kialakulására is. Munkánk során ezért tanulmányoztuk

két illetve három tioéterkén donoratom együttes jelenlétének hatását is, a MetGlyMet, MetMetAla és MetMetMet Pd(II)komplexein keresztül.

Az egy metionint tartalmazó tripeptidekhez hasonlóan, a képződő komplexek nagy termodinamikai stabilitása miatt egyensúlyi állandó nem számítható. A pH-potenciometriás és NMR spektroszkópiás vizsgálatokat egyéb tényezők is nehezítik. Savas közegben többnyire csapadékképződés tapasztalható, emellett számos esetben a komplexek képződése hosszú időt vesz igénybe; a titrálás során egyes pontokban 15 perc nem volt elegendő az egyensúly eléréséhez. A különböző fém-ligandum arányok mellett kapott titrálási görbékből néhány fontos információ, például az egyes folyamatok (a részecskék átalakulásai, deprotonálódási lépcsők) pH-tartománya azonban leolvasható, valamint a lúgfogyás alapján a képződő főbb részecskék protonáltsági állapota megadható. Az NMR spektrumok alapján pedig a képződő komplexek koordinációs módjáról vonhatunk le következtetéseket.

Mivel ezen ligandumok komplexeiről csak korlátozott információk állnak rendelkezésünkre, a három, több metionint tartalmazó tripeptid esetén kapott legfontosabb eredményeket együtt ismertetem.



4.21. ábra Pd(II)-több tioétercsoportot tartalmazó tripeptid rendszerek 1:1 fémion-ligandum arányhoz tartozó titrálási görbéi, $c_{\text{Pd(II)}} = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

A 4.21. ábrán a vizsgált három, több metionint tartalmazó tripeptid 1:1 fém-ligandum arány mellett kapott titrálási görbéje látható. A MetGlyMet és a MetMetMet esetén két ekvivalens extra lúgfogyás tapasztalható, míg a MetMetAla

esetében csak egy, vagyis a GlyMetGly-hez hasonlóan az utóbbi ligandum második amidnitrogénjének deprotonálódása nem következik be. Fiziológias pH-ra tehát a C-terminális, illetve ennek hiányában a közbenső helyzetű metionin hatása válik uralkodóvá.

Az első két peptiddel képződő $[PdLH_2]^-$ összetételű komplexre a GlyGlyMet-nal megegyezően a peptid (NH_2, N^-, N^-, S) koordinációja jellemző. Az azonos koordinációs módot a kapott NMR spektrumok is alátámasztják: A C-terminális oldalláncban található tioéterként donoratom melletti metilcsoportokra kapott kémiai eltolódás értékek jó egyezésben vannak a GlyGlyMet megfelelő adatával (MetGlyMet: 2,462 ppm, MetMetMet: 2,457 ppm, GlyGlyMet: 2,459 ppm). Az N-terminális, illetve közbenső helyzetű metionin metilprotonjainak jelei pedig a szabad ligandum esetén tapasztaltnál közel jelentkeznek (MetGlyMet: 2,142 ppm, MetMetMet: 2,136 és 2,118 ppm). A $[PdLH_2]^-$ összetételű komplex nagyobb pH-n alakul ki, mint a GlyGlyMet esetében (például a MetMetMet-nal $pH > 4$), vagyis a tripeptid további tioétercsoportjai gátolják ezen részecske képződését, de az N-terminális (és közbenső helyzetű) oldallánc tioétercsoportjával kialakuló kölcsönhatás nem képes megakadályozni a nagy stabilitású, (NH_2, N^-, N^-, S) koordinációs mód kialakulását.

A MetMetAla $[PdLH_1]$ összetételű komplexében a peptid (NH_2, N^-, S) módon kötődve nem telíti a fémion koordinációs szféráját, lúgos oldatban a negyedik koordinációs helyet egy hidroxidion foglalja el. Ezen $[PdLH_2]^-$ összetételű, vegyes hidroxokomplex képződése eredményezi a titrálási görbén (4.21. ábra) is jól látható, újabb deprotonálódási lépcsőt. Ez az erősen lúgos oldatban egyedül jelenlévő komplex jó felbontású NMR spektrumot ad, melynek paraméterei ($CH_3(N\text{-term.})$: 2,157 ppm, $CH_3(közb.)$: 2,469 ppm, $CH_3(Ala)$: 1,379 ppm) az előbbieken leírt koordinációs módot igazolják.

Savas közegben mindhárom ligandum a kénatomokon keresztül kötődik. A peptidek N-terminális végével (NH_2, S) kelát alakul ki, amely mellett még egy tioéterként koordinálódik. Ez a MetGlyMet és a MetMetMet esetén polimer szerkezetet eredményez, amit csapadékleválás jelez. A MetMetAla esetében azonban az 1:1 fém-ligandum arányú minta sem csapadékos, ami arra utal, hogy ezen tripeptid két kén donoratomja ugyanahhoz a fémionhoz koordinálódik, makrokélatot képezve. Valószínűleg a két oldallánc térbeli közelsége akadályozza meg a kiterjedt láncpolimer képződését.

Érdemes megjegyezni, hogy a MetMetMet 1:1 fém-ligandum arányú mintája esetén savas oldatban is megjelenik a nem koordinálódott tioétercsoportra utaló metiljel (2,124 ppm-nél, a 2,511 és 2,493 ppm-es kötött kénatomhoz tartozó jelek mellett), vagyis az egyik kénatom (valószínűleg a közbenső metioninhoz tartozó) nem kötődik a palládiumionhoz.

A metionintartalmú tripeptidek és a Pd(II)ion közötti kölcsönhatás során – a többi vizsgált fémionnal ellentétben – a tioétercsoport tölti be az elsődleges fémmegkötő hely szerepét. A metionil-oldallánc koordinációja a képződő komplexek kiemelkedő termodinamikai stabilitását és az átmenetifém-ionok peptidkomplexeire jellemzőtől eltérő szerkezetek kialakulását eredményezi. A tioéterkén horgonydonorként viselkedik, közbenső illetve C-terminális helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek esetén az amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja már erősen savas közegben is bekövetkezik, (NH₂,N,N,S) illetve (NH₂,N,S) koordináció valósul meg.

4.1.5. Tioéterhidat tartalmazó vegyes fémkomplexek vizsgálata

A tioétercsoportot tartalmazó peptidek vizsgálata rámutatott, hogy a Cu(II)- és Ni(II)komplexeikben a peptidláncbéli donoratomok (az amino-, és a deprotonálódott amidnitrogének, a karbonil- illetve a karboxiláttoxigén) koordinációja a meghatározó, a kénatommal való kölcsönhatás csak egyes komplexekben figyelhető meg, amelyekben az egyéb koordinálódó donorcsoportok által kialakított szerkezet ezt lehetővé teszi. Ellentétben a tioétercsoport effektív kötőhely a Pd(II)ion számára, így a kéndonoratomon keresztül, egyfogú koordináció is megvalósulhat.

A tioétercsoport fémionszelektivitása tehát lehetővé teszi többmagvú vegyes fémkomplexek képződését, melyek elektrontranszfer rendszerek modelljei lehetnek. Például egy Cu(II)- illetve Ni(II)komplex nem koordinálódó oldalláncában található tioéterkén donoratom koordinatívén telítetlen Pd(II)komplexhez kötődhet egy kétmagvú vegyes fémkomplex kialakulását eredményezve, amelyben a híd szerepét a tioétercsoportot tartalmazó oldallánc tölti be.

Egyes Pd(II)komplexeik esetén a tioétercsoport egyfogú koordinációját jellemző stabilitási állandót korábban közvetett potenciometriás módszerrel határozták meg, különböző nitrogéndonor segédligandumokat (például uridint) használva a kompetíciós vizsgálat során.¹⁹⁸ Ez a módszer azonban más fémionok

jelenlétében nem alkalmazható, hiszen a Cu(II)- illetve Ni(II)komplex csak egy meghatározott, viszonylag szűk pH-tartományban található az általunk választott formában.

A vegyeskomplex képződése azonban a rendszer abszorpciós spektrumában jelentős változást eredményez. Spektrofotometriás módszerrel tehát a kölcsönhatás létrejötte bizonyítható, a folyamatot jellemző egyensúlyi állandó ezen közvetlen módszer segítségével számítható.

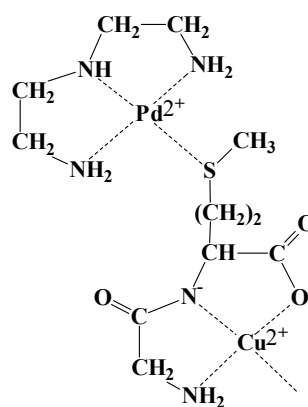
A vizsgálatainkhoz választott Pd(II)komplexekben a központi fémionhoz egy háromfogú ligandum kötődik, vagyis csak egy szabad koordinációs helyük van. A korábban már részletesen ismertetett GlyMet-nal képződő Pd(II)komplex helyett számos esetben a dietilén-triamin (továbbiakban dien) Pd(II)komplexét használtuk a vizsgálatok során. Utóbbi ligandum a három alifás nitrogén donoratomon keresztül koordinálódik, a képződő kettős kelátgyűrű nagy stabilitást kölcsönöz a komplexnek, ami ennek következtében még erősen lúgos oldatban sem bomlik el.

Pd(II)- és Cu(II)iont tartalmazó vegyes fémkomplexek

A Cu(II)ion a GlyMet-nal a pH-tól függően többféle összetételű komplexet képez.¹¹⁴ A $[CuAH_1]$ összetételű komplex, amelyben az amino- és az amidnitrogén mellett a karboxiláttoxigén koordinálódik a fémionhoz a 6-8 pH-tartományban létezik, ezért a mérést ebben a pH-intervallumban végeztük. Ilyen körülmények mellett azonban a Pd(II)törzskomplex hidrolízise nem elhanyagolható, ezért a számolás során a hidroxokomplex képződését is figyelembe vettük.

A stabilitási állandó meghatározása során a molarány módszert alkalmaztuk, vagyis a Pd(II)törzskomplex koncentrációját nem változtatva különböző ligandum-koncentrációk mellett mértük az oldat abszorbanciáját. A 4.22. ábrán a $[Pd(dien)]^{2+}-[Cu(GlyMetH_1)]$ rendszer

vizsgálata során kapott spektrumok láthatók, melyeken jól megfigyelhető, hogy a kénatom koordinációja kék eltolódást eredményez (330→295 nm). Az egyensúlyi

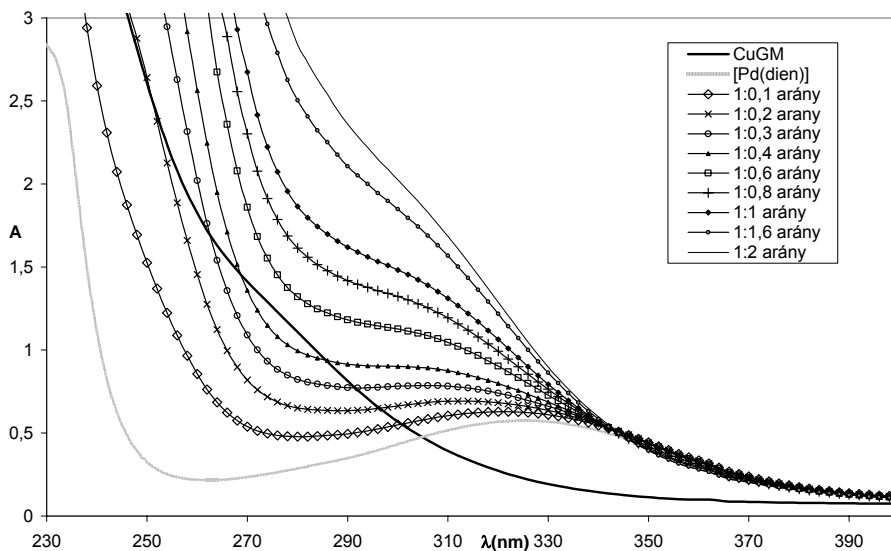


4.23. ábra

A $[Pd(dien)]^{2+}-[Cu(GlyMetH_1)]$ rendszerben képződő vegyes fémkomplex szerkezete

állandó számítását több hullámhosszon is elvégeztük, majd a kapott értékek átlagát fogadtuk el.

A 4.23. ábrán látható szerkezetű vegyes fémkomplex esetén $\lg K=3,26(7)$ értéket kaptunk, ami lényegesen kisebb, mint a $[\text{Pd}(\text{dien})]^{2+}$ -AcMet rendszerre korábban meghatározott állandó ($\lg K=5,61^{198}$), de még mintegy 50%-os komplexképződésnek felel meg. Az egyensúlyi állandó kis értéke a nagy méretű Cu(II)komplex jelentős térigényével magyarázható. Emiatt lúgos közegben a tioéterhíd felbomlik, hidroxokomplex képződik.



4.22. ábra $[\text{Pd}(\text{dien})]^{2+}$ - $[\text{Cu}(\text{GlyMetH}_1)]$ rendszer abszorpciós spektruma a fém-ligandum arány függvényében ($c_{\text{Pd(II)}}=10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)

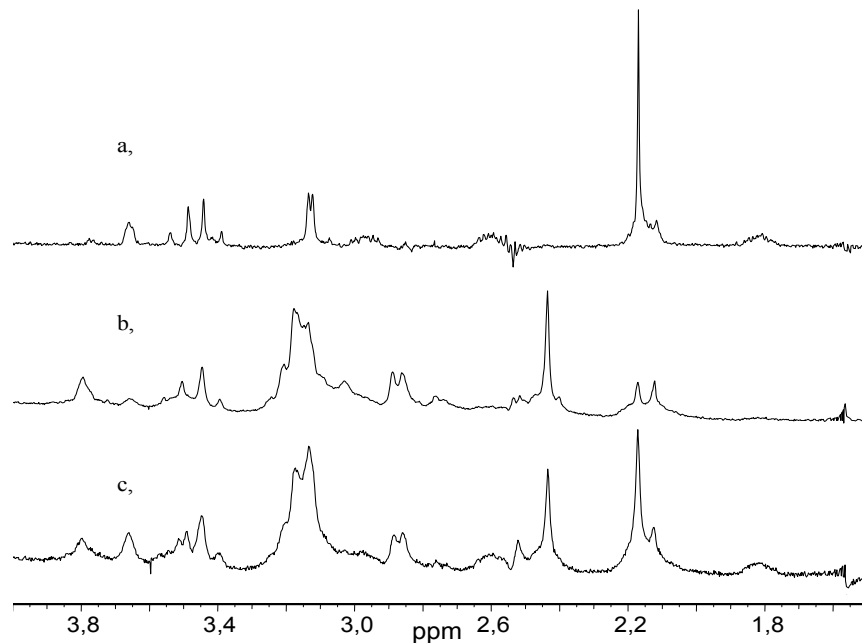
A vegyes fémkomplex képződését a Pd(II)törzskomplex koordinációs szférájában található donoratomok változtatása is befolyásolhatja, ezért a $[\text{Pd}(\text{GlyMetH}_1)]$ esetén is tanulmányoztuk a $[\text{Cu}(\text{GlyMetH}_1)]$ komplex oldalláncában található tioétercsoport koordinálódását. Ezen törzskomplexben már egy kénatom kötődik a Pd(II)ionhoz, így a következő tioétercsoport koordinációja igen kis spektrális változást okoz. Emellett az irodalomból ismert az is, hogy a két Pd(II)törzskomplex, a $[\text{Pd}(\text{GlyMetH}_1)]$ és a $[\text{Pd}(\text{dien})]^{2+}$ egyszerű tioéterkén-donor ligandumokhoz való affinitása eltérő, a fémion koordinációs szférájában található kénatom hatására az előbbiben a Pd(II) soft karaktere lecsökken, ezért az AcMet-nal képezett vegyeskomplexének stabilitása kisebb.¹⁹⁸ Mindezek miatt a spektrofotometriás vizsgálatok csak a két törzskomplex közötti kölcsönhatás

kialakulását igazolják, de egyensúlyi állandó nem számítható megfelelő pontossággal.

Pd(II)- és Ni(II)iont tartalmazó vegyes fémkomplex

A híd szerepét betöltő tioétercsoportot a Cu(II) helyett más fémion, például Ni(II)ion komplexének nem koordinálódó oldallánca is tartalmazhatja. A GlyMetGly [NiLH₂]⁻ összetételű komplexe megfelelt céljainknak, hiszen a kénatom nem kötődik a Ni(II)ionhoz.

Mivel mindkét törzskomplex diamágneses a vegyes fémkomplex képződése NMR spektroszkópiás módszerrel is tanulmányozható. A Ni(II)-GlyMetGly rendszer NMR spektrumában (4.24.a ábra) a nem koordinálódott tioétercsoportra jellemző metiljel 2,164 ppm kémiai eltolódásnál látható, míg mindkét Gly rész metilén protonjai az analóg Pd(II)komplexhez hasonlóan (4.12. ábra) AB típusú multiplettet adnak. A 2,10 ppm-nél megfigyelhető kis csúcs a kismértékű ligandumfelesleg következménye, ami elengedhetetlen ahhoz, hogy a paramágneses Ni(II)ionok jelenlétét kizárjuk. A [Pd(dien)]²⁺ és [Ni(GlyMetGlyH₂)] komplexek közötti kölcsönhatás pD=9-n a 4.24.b ábrán látható spektrumot eredményezi. A metilcsoportoz tartozó csúcs (a tioéter-koordinációra legérzékenyebb jel) 2,441 ppm-re tolódik, ami alátámasztja a Pd(II)-S kötés kialakulását, a kétmagvú vegyes fémkomplex képződését. A [Pd(dien)]²⁺ -t és [Ni(GlyMetGlyH₂)]-t 1:2 arányban tartalmazó minta spektrumában (4.24.c ábra) a szabad és a koordinálódott tioétercsoport metilprotonjainak jelintenzitása közel azonos, a Pd(II) gyakorlatilag teljes mennyisége tioéterhidas vegyes fémkomplekként található az oldatban. A Pd(II)- és a Ni(II)törzskomplexeket különböző arányban tartalmazó minták vizsgálata információt szolgáltat a tioéterkénnel kialakuló kölcsönhatás erősségéről. A kapott adatok arra engednek következtetni, hogy a kölcsönhatást jellemző egyensúlyi állandó nagyobb, ha a tioéterkénatom egy Ni(II)komplex nem koordinálódó oldalláncában található, mint a megfelelő Cu(II)komplex esetén. Ez a különbség feltehetően azzal magyarázható, hogy utóbbi esetében a kénatom legalább részben axiálisan kötődhet a Cu(II)ionhoz, míg a Ni(II)komplexben a Ni(II)-S kölcsönhatás kizárható, a tioétercsoport teljesen szabadnak tekinthető.



4.24. ábra A $[\text{Pd}(\text{dien})]^{2+}$ - $[\text{Ni}(\text{GlyMetGlyH}_2)]$ rendszer NMR spektruma $\text{pD}=9,0$
a, $[\text{Pd}(\text{dien})]^{2+}$ -t nem tartalmazó minta b, 1:1,1 Pd(II)-Ni(II) arány c, 1:2 Pd(II)-Ni(II) arány

A tioéterkén donoratom jelentős fémionszelektivitását kihasználva tioéterhidat tartalmazó vegyes fémkomplexek állíthatók elő. Munkánk során koordinatíve telítetlen Pd(II)komplexek szabad koordinációs helyére Cu(II)- illetve Ni(II)komplexek nem koordinálódó oldalláncában található tioétercsoport kötődésével képződő vegyes fémkomplexeket vizsgáltuk. A kölcsönhatás igazolására és egyensúlyi állandó számítására közvetlen módszerként a spektrofotometria illetve egyes esetekben az NMR spektroszkópia alkalmazható. Kimutattuk, hogy a képződő vegyes fémkomplex stabilitása kisebb, ha a Pd(II)törzskomplex tartalmaz két donoratomot ($[\text{Pd}(\text{dien})]^{2+}$ és $[\text{Pd}(\text{GlyMetH}_1)]$) eredményeit összevetve), ami a két komplexbeli Pd(II)ion eltérő soft karakterével magyarázható. A kölcsönhatás mértékét befolyásolja az is, hogy a hid szerepét betöltő tioétercsoport Cu(II)- vagy Ni(II)komplex nem koordinálódó oldalláncában található. Pd(II)- és Cu(II)iont tartalmazó vegyes fémkomplex stabilitási állandója kisebb, mint a megfelelő Pd(II)- és Ni(II)iont tartalmazó komplexé. Ennek oka feltehetően az oldalláncbeli donorcsoport és a Cu(II)ion közötti igen gyenge axiális kölcsönhatás.

4.2. Aminosavak és peptidek Pb(II)komplexei

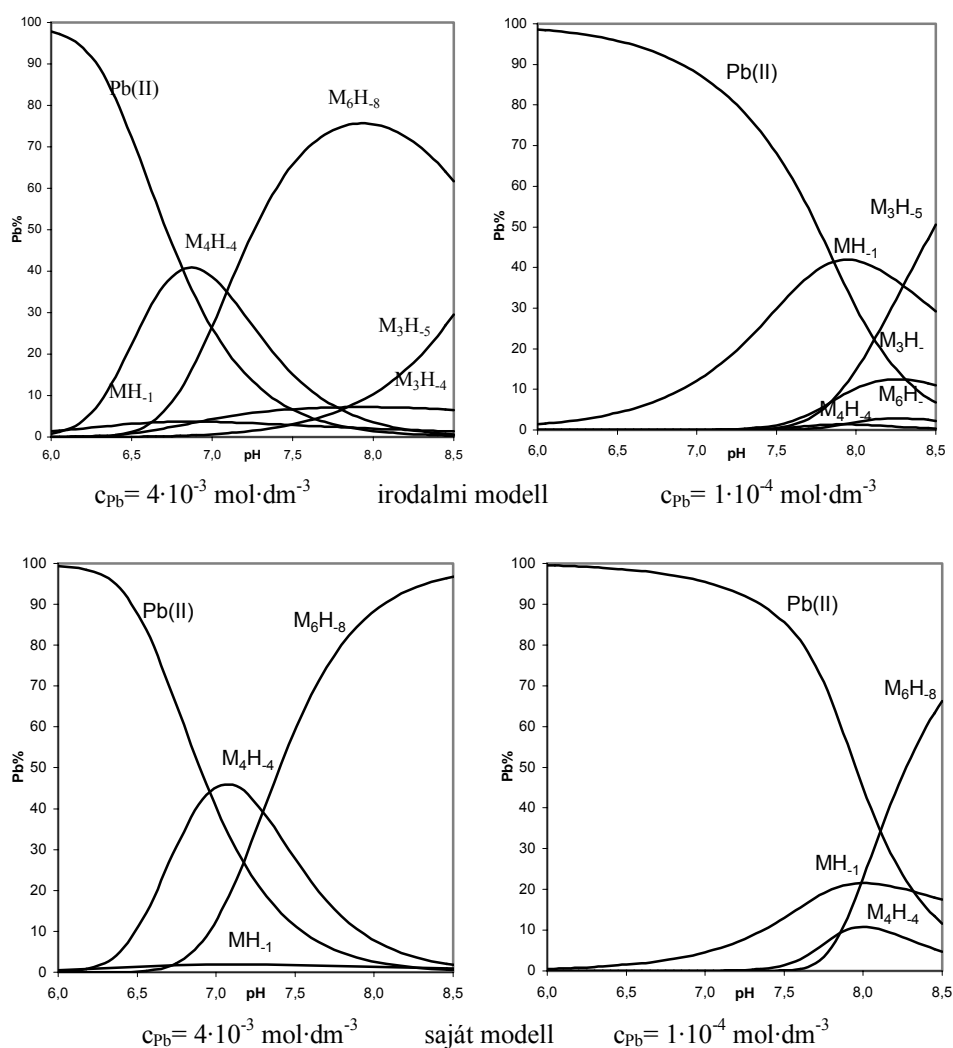
Az Pb(II)ion metionintartalmú peptidekkel alkotott komplexeinek vizsgálata során a tioéterkénnel való kölcsönhatás létének igazolása, illetve ennek kizárása céljából szükségünk volt összehasonlítási alapként az Pb(II)ion egyszerű peptidekkel képezett komplexeinek stabilitási állandóira, valamint egyéb oldalláncbéli donorcsoportoknak a képződő komplex stabilitására gyakorolt hatásának ismeretére. Az irodalomban található kisszámú adat többnyire az általunk alkalmazottól eltérő kísérleti körülményekre vonatkozik, ezért egy szélesebb körű vizsgálat során azonos körülmények között meghatároztuk számos aminosav és peptid Pb(II)komplexeinek stabilitási állandóit. A korábbi vizsgálatok eredményei arra utaltak, hogy a legtöbb vizsgálni kívánt ligandummal kis stabilitású komplexek képződése várható, vagyis a fémion hidrolízisének hatása nem hanyagolható el, ezért a vizsgálatainkat az Pb(II)ion hidrolízisének tanulmányozásával kezdtük.

4.2.1. Az Pb(II)ion hidrolízisének vizsgálata

A fémion hidrolízisét $1 \cdot 8 \cdot 10^{-3}$ mol \cdot dm $^{-3}$ ólomkoncentráció-tartományban pH-potenciometriás módszerrel tanulmányoztuk. A vizsgálatokat csapadékleválás korlátozta, ami a koncentrációtól függően pH~7-8-n tapasztalható. A hidrolízis leírása során a Sylva és Brown által közölt modellt⁸⁰ tekintettük kiindulási alapként. A 4.14. táblázatban a saját kísérleti adatainkat legjobban leíró, a kapott titrálási görbék pontjait a legkisebb hibával közelítő modell mellett az irodalmi adatokat is feltüntettem. A $[\text{Pb}(\text{OH})]^+$ komplex stabilitási állandójának nagy hibáját az okozza, hogy a vizsgált körülmények között igen kis mennyiségben képződik, meghatározó részecske csak nagyon kis ólomkoncentrációk mellett lenne. Egyéb monomer hidroxokomplexek képződése az alkalmazott kísérleti körülmények mellett kizárható. A képződő többmagvú komplexek pontos összetételének igazolása bonyolult, erre alkalmas kísérleti technika kiválasztása igen nehéz feladat. A két fő részecske, az $[\text{Pb}_4(\text{OH})_4]^{4+}$ és az $[\text{Pb}_6(\text{OH})_8]^{4+}$ összetételű komplex létét korábban is feltételezték.²⁰⁰ A $[\text{Pb}_n(\text{OH})_{2n-4}]^{4+}$ általános képlettel jellemezhető két komplex oldatbeli szerkezetét Johansson és Olin röntgendiffrakciós módszerrel határozták meg.²⁰¹ Az előbbire a négy ólomatom tetraédes elrendeződése a jellemző, az utóbbiban azonban nem a szokványos oktaédes geometria alakul ki, hanem négy

ólomatom egy tetraédert határoz meg, további kettő pedig a tetraéder két lapjának középpontjában helyezkedik el.

Az Pb(II)ion aminosavakkal illetve peptidekkel képezett komplexek vizsgálatára alkalmazott kísérleti körülmények mellett a két modell jó egyezésben van. Jelentősebb eltérés csak lényegesen hígabb oldat esetében figyelhető meg, amikor a hidrolízis visszaszorul és a monomer komplexek válnak meghatározóvá. (4.25. ábra)



4.25. ábra A képződő hidroxokomplexek koncentráció eloszlási görbéi

4. 14. táblázat Az Pb(II)ion hidrolízisét leíró modellek összehasonlítása

	irodalmi modell⁸⁰	saját modell
MH₁	-7,86	-8,35(27)
M₃H₄	-23,91	-
M₃H₅	-31,75	-
M₄H₄	-20,40	-20,18(2)
M₆H₈	-43,38	-43,34(2)

A későbbi számítások során a saját modellünket használtuk, amellyel az általunk alkalmazott szűk ólomkoncentráció- és pH-tartományban a hidroxokomplexek képződése figyelembe vehető.

A Fe(III)- és Al(III)ionoktól eltérően, amelyek esetén a hidrolízis már erősen savas oldatban is jelentős, az Pb(II)ionnal csak pH~6-n kezdődik. Így utóbbi fémion és a vizsgált ligandumok között a komplexképződés a hidrolízis kezdete előtt elindul, illetve a két folyamat egymással párhuzamosan játszódik le, míg Fe(III)- és Al(III)ionok esetén a ligandum a hidrolizált fémionnal lép kölcsönhatásba.

4.2.2. Az Pb(II)ion aminosavakkal képezett komplexei

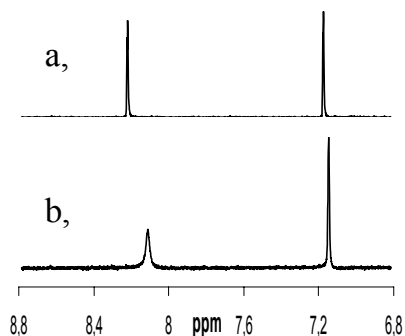
A vizsgált aminosavak Pb(II)komplexeinek stabilitási állandóit a 4.15. táblázat tartalmazza. Megállapítható, hogy valamennyi aminosavval kis stabilitású komplex képződik, bár egyes oldalláncbéli donoratomokkal kialakuló kölcsönhatás a komplexképződés mértékét növeli. Míg glicinnel még ligandumfelesleg (1:2 fém-ligandum arány, $2 \cdot 10^{-3}$ mol·dm⁻³ ólomkoncentráció) mellett is 6,75-os pH-n a fémionnak csupán 20, S-metil-ciszteinnel (SMC) 50, hisztidinnel pedig már 80%-a kötődik az aminosavhoz. A táblázatban szereplő pK-IgK értékek arra utalnak, hogy a tioéter-, a karboxil- és az imidazolcsoportot tartalmazó aminosavak komplexének stabilitása nagyobb, mint a legegyszerűbb aminosav, a glicin megfelelő komplexéé. A táblázatban szereplő másik paraméter, a komplex hidrolízisét jellemző pK_{OH} (lgβ_{MA}-lgβ_{MAH-1}) változásából hasonló következtetések vonhatók le, hiszen a stabilitás növekedésével a hidrolízishajlam csökken. A tioétercsoportot tartalmazó metionin esetén a stabilitásváltozás nem jelentős, de a pK-IgK értékében tapasztalt eltérés nagyobb, mint a hibahatár. Míg a metionin komplexében a tioéterkén donoratom koordinálódásával hattagú kelátgyűrű alakulhat ki, az SMC esetén öttagú

kelátgyűrű képződhet, ami a komplex nagyobb stabilitását eredményezi. Más típusú ligandumok Pb(II)komplexeinek vizsgálata során is az öttagú kelát képződésének kitértetett stabilitásnövelő hatását figyelték meg.⁷³

4.15. táblázat A vizsgált aminosavak Pb(II)komplexeinek stabilitási állandói

ligandum	MA	MAH ₋₁	MAH	pK ^{HA} -lgK ₁	pK _{OH}
Gly	4,68(3)	-2,84(2)	-	4,97	7,52
Met	4,39(4)	-3,18(4)	-	4,73	7,57
SMC	4,49(1)	-3,50(2)	-	4,27	7,99
Asp	5,95(1)	-2,14(2)	11,39(2)	3,66	8,09
His	5,96(1)	-2,28(8)	-	3,16	8,24

Két aminosav, a hisztidin és az S-metil-cisztein esetében az oldalláncbéli donorcsoport koordinálódásának igazolására NMR spektroszkópiás vizsgálatot is végeztünk. A képződő komplexekben az aminosav kötőmódját korábban spektroszkópiás módszerekkel nem bizonyították, minden esetben csupán a stabilitási állandó értékéből következtettek arra, hogy a hisztidin²⁰²⁻²⁰⁴ és az aszparaginsav²⁰⁵⁻²⁰⁶ háromfokúként koordinálódik.



4.26. ábra Az Pb(II)-His rendszer NMR spektruma pD=5,77
a, szabad ligandum b, 1:1,1 arány

Az imidazolnitrogén koordinálódásának hatása az aromásgyűrű CH(2) protonjának kémiai eltolódására a legnagyobb. Az Pb(II)-hisztidin rendszer NMR spektrumában ezen jel eltolódása és kiszélesedése is megfigyelhető, ami az oldalláncbéli donortom kötődésére utal (4.26. ábra).

Az Pb(II)-SMC rendszer NMR spektrumában a CH proton jelének jelentős mértékű eltolódása (0,28 ppm) egyértelműen bizonyítja az aminocsoport koordinációját. Emellett feltételezhető a tioéterkén donortom és a fémion közötti kölcsönhatás is. Ezt igazolhatja a (kénatom melletti) metilcsoport jelének a szabad ligandumhoz képesti igen kismértékű eltolódása is (esetünkben 2,16 ppm-ről, 2,18 ppm-re). A vizsgálat során ugyanis egy átlagjelet kapunk, (a gyors ligandumcsere következtében a szabad és a komplexben kötött

ligandum jele nem detektálható külön,) s az alkalmazott körülmények között a komplex mellett igen nagy (pontosan kétszeres) mennyiségű szabad ligandum található.

Az eredményeink az irodalmi adatoktól egy ponton térnek el jelentősebben: míg a vizsgált rendszereket korábban biszkomplexek képződésével írták le, mi ezeket nem tartalmazó modellt alkalmaztunk. A vizsgált ligandumok a Pb(II)ion számára gyenge komplexképzők, melyekkel biszkomplexek képződése csak nagyon nagy ligandumfelesleg mellett valósulhatna meg, ilyen kísérleti körülmények mellett azonban nem végeztünk vizsgálatokat. Emellett a biszkomplex és a vegyeshidroxokomplex képződése azonos pH-effektussal jár.

4.2.3. Az Pb(II)ion peptidekkel képezett komplexei

A vizsgált peptidek Pb(II)komplexeinek stabilitási állandóit a 4.16. és 4.17. táblázat foglalja össze.

4.16. táblázat A vizsgált peptidek Pb(II)komplexeinek stabilitási állandói

	MAH ₂	MAH	MA	MAH ₁	pK _{lgK}	pK _{OH}
GlyGly	-	9,82(4)	3,30(3)	-4,23(3)	4,83	7,53
GlyGlyGly	-	9,11(3)	2,73(1)	-5,23(6)	5,20	7,96
GlyMet	-	9,95(2)	3,42(2)	-4,08(2)	4,74	7,50
MetGly	-	8,31(19)	1,52(23)	-5,07(6)	6,02	6,59
GlyMetGly	-	9,57(8)	3,12(4)	-4,28(5)	4,88	7,40
GlyGlyMet	-	9,91(3)	3,36(2)	-3,86(2)	4,59	7,22
MetMetMet	-	-	1,81(4)	-	5,44	-
GlyGlu	13,94(5)	10,37(1)	3,45(2)	-4,94(13)	4,85	8,39
GluVal	13,54(5)	10,20(1)	3,35(2)	-4,29(5)	4,52	7,64
GlyAsp	-	10,44(1)	3,70(2)	-3,47(1)	4,68	7,17
AspGly	13,2(1)	10,16(2)	4,01(2)	-3,56(1)	3,95	7,57
SerGly	-	8,63(3)	2,798(7)	-4,60(1)	4,57	7,40
GlyHis	-	10,25(4)	3,25(3)	-3,64(1)	4,94	6,89
HisGly	-	-	3,805(3)	-3,890(4)	3,84	7,70

Az amidnitrogén deprotonálódása egyetlen vizsgált peptid Pb(II)komplexében sem következett be, a képződő [MAH₁] komplexek minden esetben hidroxokomplexek, vagyis a peptidek az Pb(II)ion számára az aminosavaknál is gyengébb komplexképzők; az Pb(II)-GlyGly rendszerben még 1:5 fém-ligandum arány mellett is csupán a fémion 20-25%-a található a peptidhez kötött formában.

A kapott adatok alapján (a különböző ligandumok pK_{lgK} és pK_{OH} értékeit összevetve) megállapíthatjuk, hogy a glicin és a diglicin Pb(II)komplexének stabilitása között nincs jelentős eltérés, a triglicinnel azonban sokkal kisebb stabilitású komplexek képződnek.

Az oldalláncban található donorcsoport molekulán belüli helyzetének hatását is vizsgáltuk, az adott aminosavat C- illetve N-terminális helyzetben tartalmazó dipeptidek komplexein keresztül.

A metionintartalmú di- és tripeptidek esetén az adatok nem jelzik a tioétercsoport kötődését, valamennyi ligandum (NH₂,CO) koordinációja valószínűsíthető. A SerGly-ben található hidroxilcsoport koordinációja is kizárható a stabilitási állandók alapján.

A karboxilcsoportot különböző helyzetben tartalmazó négy dipeptid közül csupán az AspGly Pb(II)komplexe esetén figyelhető meg stabilitásnövekedés, ami hattagú, (NH₂,COO⁻) kelát kialakulásával magyarázható. Az amino- és az oldalláncbeli karboxilátcsoport nagyobb távolsága miatt nem valósulhat meg ez a kölcsönhatás a másik három ligandum (GlyAsp, GluVal, GlyGlu) komplexében.

Az imidazolnitrogén donortom koordinálódása (a karboxilcsoporthoz hasonlóan) csak N-terminális hisztidin (HisGly) esetén valósul meg, ami a [PbL]⁺ összetételű komplex nagyobb stabilitását eredményezi. A fémion és az oldalláncbeli donorcsoport közötti kölcsönhatás igazolása céljából a rendszert NMR spektroszkópiás módszerrel is tanulmányoztuk. Az 1:1,8 fém-ligandum arányú minta mellett összehasonlításként a HisGly spektrumát is felvettük azonos pH-n (6,45). Az aminocsoport koordinálódását a szomszédos CH proton jelének jelentős eltolódása (4,189 ppm-ről 4,57 ppm-re) egyértelműen bizonyítja. Az aromágyűrűben az imidazolnitrogén melletti CH(2) proton kémiai eltolódásának a komplexképződés hatására bekövetkező kismértékű változása (0,05 ppm), pedig fémion és az oldalláncbeli donortom közötti gyenge kölcsönhatás létrejöttére utal.

Három tiolcsoportot tartalmazó peptid, az AlaCys, CysGly és a merkaptopropionil-glicin (MPG) Pb(II)komplexeit is tanulmányoztuk. A kapott egyensúlyi

állandókat a 4.17. táblázat tartalmazza. Az irodalomból jól ismert az Pb(II)ion tiolcsoporthoz való nagy affinitása. A tiolátkén donoratommal kialakuló erős kölcsönhatás következtében ez a három ligandum a többi peptidnél lényegesen jobb komplexképző. Míg a komplexképződés és a fémion hidrolízise más Pb(II)-peptid rendszerekben egymással párhuzamosan játszódik le, ezen ligandumokkal pH~6-n, ahol a fémion hidrolízise elkezdődik, már nem található szabad fémion az oldatban. Az alkalmazott kísérleti körülmények között ezen ligandumokkal a monokomplexek mellett biszkomplexek is jelentős mennyiségben képződnek.

4.17. táblázat A tiolcsoportot tartalmazó peptidek protonálódási állandói és Pb(II)komplexeik stabilitási állandói

	AlaCys	CysGly	MPG	MPG*
HA	9,635	9,36	8,312	8,191
H₂A	17,604	16,32	11,723	11,62
H₃A	20,537	19,5	-	-
MAH₂	20,49(4)	17,96(8)	-	-
MAH	15,99(4)	13,78(12)	10,10(2)	9,85
MA	8,32(12)	10,40(1)	7,008(3)	6,73
MAH₁	0,80(6)	2,32(4)	-1,51(6)	-
MAH₂	-	-	-12,8(1)	-
MA₂H₂	30,06(11)	28,46(18)	-	-
MA₂H	22,0(2)	23,26(4)	-	-
MA₂H₁	-	-	1,80(7)	-
MA₂	13,67(12)	15,96(3)	12,38(1)	11,53
MA₃	-	19,0(1)	15,65(3)	14,38
M₂A₃	-	-	22,36(3)	20,85
pK-lgK	1,32	1,04	1,3	1,46
lg(K₁/K₂)⁰	2,97	4,83	1,64	1,93
lg(K₁/K₂)^H	1,92	0,90	-	-

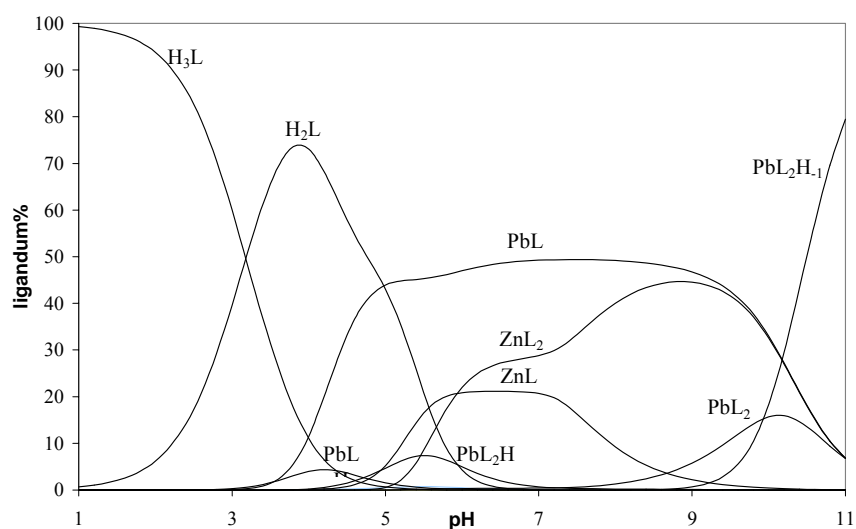
* Az adatok a 207. hivatkozásból (310K, I=0,15 mol·dm⁻³)

A fő koordinációs hely szerepét a tiolcsoport tölti be, emellett a kénatommal kelátképző helyzetben lévő egyéb donoratomok is koordinálódnak. Az MPG

karbonil-, míg az AlaCys karboxiláttoxigénjének résztvételével (S,O) kelát alakul ki a komplexképződés során. Mindkét peptid mono- és biszkomplexeiben a ligandumok kétfogú koordinációját támasztja alá a $\lg K_1/K_2$ értéke, amely protonált és nem protonált komplexek esetén sem túl nagy. A CysGly-nel (NH₂,S) koordináció valósul meg. Bár ezen ligandumhoz nagy $\lg K_1/K_2$ érték tartozik, ez azonban lényegesen kisebb, mint a háromfogúként koordinálódó cisztein illetve penicillamin esetén közölt (5,86 illetve 9,594) adatok.⁸⁹

A CysGly és az AlaCys [PbA]⁺ összetételű komplexének stabilitása gyakorlatilag megegyezik (pK-lgK értékeket összehasonlítva), a tiolcsoportot tartalmazó oldallánc hatása azonos N- és C-terminális helyzetben, ami arra utal, hogy a kelátképződés a láncvégi amino- illetve a karboxilátcsoporttal egyaránt kedvező.

Az amidnitrogén deprotonálódása a vizsgált tiolcsoportot tartalmazó peptidek Pb(II)komplexeiben sem következik be. Ennek igazolására a MPG esetén 1:1 és 1:2 fém-ligandum arány mellett NMR spektroszkópiás vizsgálatot is végeztünk. Az amidnitrogén deprotonálódása és koordinálódása a szomszédos CH₂ protonok jeleinek jelentős eltolódását eredményezné, ezt azonban nem tapasztaltuk. A komplexképződés csupán a CH proton jelének kémiai eltolódásában okoz nagymértékű változást (kb. 0,9 ppm-mel nő), bizonyítva a ligandum (S,CO) koordinációját.



4.27. ábra A Pb(II)-Zn(II)-CysGly rendszerben képződő komplexek koncentrációeloszlási görbéi $c_{\text{Pb(II)}}=c_{\text{Zn(II)}}=2\cdot 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $c_{\text{CysGly}}=4\cdot 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

A Pb(II)ion tiolokhoz való nagy affinitása okozhatja számos biológiai hatását. Ezek közül a cinktartalmú enzimekkel való kölcsönhatásról szolgáltat információt a 4.27. ábra többkomponensű modellrendszere. Látható, hogy az Pb(II)- és Zn(II)iont valamint CysGly-t 1:1:2 arányban tartalmazó rendszerben fiziológiás pH-n a tiolcsoportot tartalmazó ligandum kb. 50-50%-ban oszlik meg a két fémion között. Az Pb(II)ion tehát képes kiszorítani a Zn(II)iont a tiolcsoportot tartalmazó metalloenzimekből, valamint a cinkujjakkból.

A tioéter donorcsoport nem kötőhely a Pb(II)ion számára. A tioéterkénatom és a fémion közötti gyenge kölcsönhatás kizárólag abban az esetben valósulhat meg, ha az Pb(II)iont a ligandum másik két donoratoma kelátként köti, s a kénatom koordinálódásával még egy öttagú kelát alakulhat ki (például az S-metil-cisztein Pb(II)komplexében). Az Pb(II)ion igen erősen kötődik tiolcsoportot tartalmazó peptidekhez, ennek következtében kompetícióban lehet a Zn(II)ionnal ezen kötőhelyekért; többek között ez a kölcsönhatás is okolható az élő szervezetre gyakorolt káros hatásáért.

4. 3. A Cu,Zn-SOD aktív centrumát modellező peptidek

Cu(II)- és Zn(II)komplexei

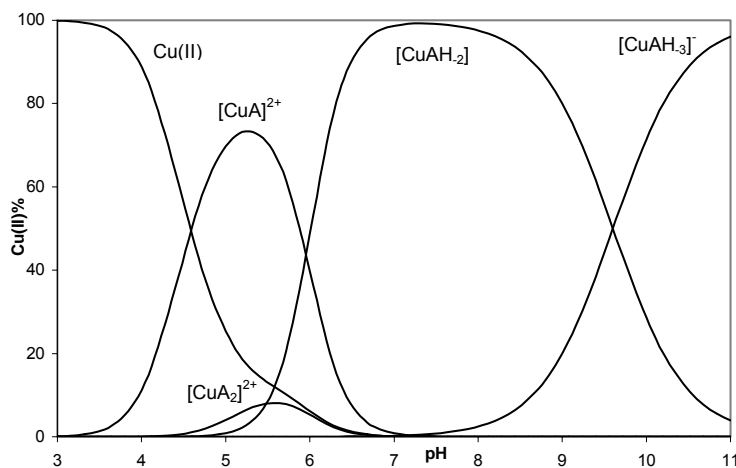
A Cu,Zn-SOD enzimben a rézhez és a cinkhez koordinálódó két-két donoratoma a peptidszekvenciában egymáshoz közel elhelyezkedő aminosavak oldalláncában található, amelyek a rézkötőhely esetén egy tripeptiddel (HisValHis), míg a cinkkötőhely esetén egy tetrapeptiddel (HisValGlyAsp) modellezhetők. Vizsgálatainkhoz e két peptid mindkét láncvégen védett változatát (analógiáját) választottuk.

A vizsgált ligandumok protonálódási állandóit a 4.18. táblázat tartalmazza. Mindkét peptid C- és N-terminális láncvége is védett, ezért csak az oldalláncbeli donorcsoportok deprotonálódását jellemző pK-értékek határozhatók meg. Az N-acetil-hisztidil-valil-hisztidinamid (AcHVH₂NH₂) esetén mért két pK a két imidazolcsoportéhoz rendelhető. Az adatok jól egyeznek hasonló ligandumokra korábban közölt értékekkel.^{132,138,208,209} A pK értékek különbsége igen kicsi (0,94 logaritmusos egység), ami arra utal, hogy a két oldallánc deprotonálódása egymással átfedésben játszódik le. Ellenben az N-acetil-hisztidil-valil-glicil-aszparaginsavamid (AcHVGDNH₂) esetén a két deprotonálódási lépcső elkülönül: az aszpartil rész β-

karboxilesoportja sokkal erősebb sav ($pK=3,81$), mint a hisztidin rész protonált imidazolnitrogénje ($pK=6,60$).

4.18. táblázat A ligandumok protonálódási állandói valamint Cu(II)- és Zn(II)komplexeik stabilitási állandói ($I = 0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KCl}$, $T = 298 \text{ K}$)

	Ac-HisValHisNH ₂	Ac-HisValGlyAsp-NH ₂
HL	6,82(2)	6,60(1)
H ₂ L	12,70(2)	10,41(2)
[CuL] ^{2+/+}	6,63(2)	5,19(2)
[CuL ₂] ²⁺	11,58(5)	-
[CuLH ₂]	-5,86(3)	-
[CuLH ₃] ^{-/2-}	-16,20(3)	-15,39(8)
[CuLH ₄] ³⁻	-	-26,19(10)
[ZnL] ²⁺	-	3,73(4)
[ZnLH ₁]	-	-3,53(5)



4.28. ábra A Cu(II)- AcHVHNH₂ rendszerben képződő komplexek koncentrációeloszlási görbéi ($c_{\text{Cu(II)}} = c_{\text{lig}} = 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)

Az AcHVHNH₂ komplexei

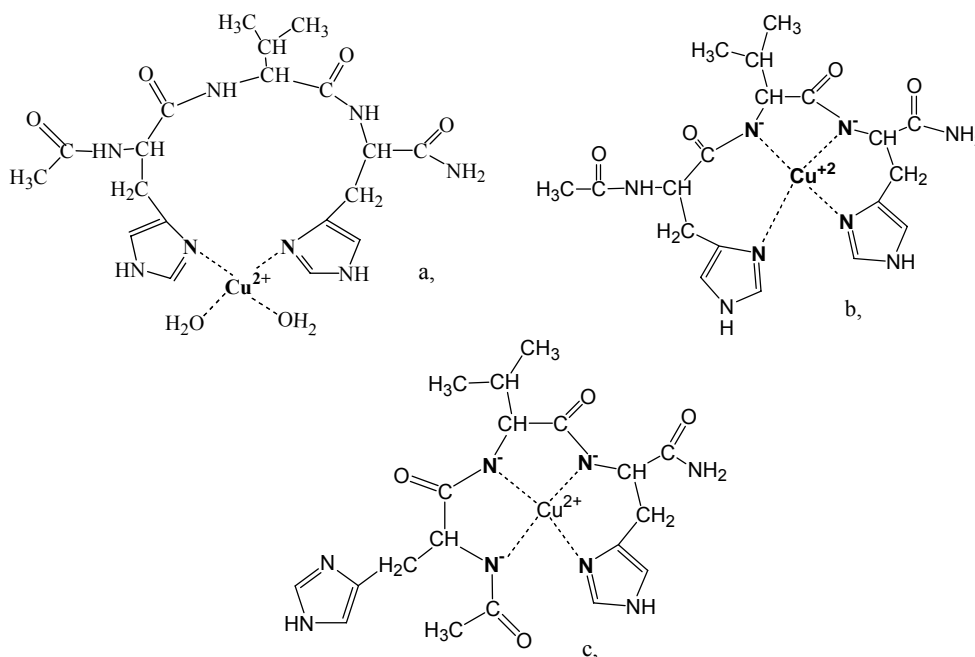
Bár az AcHVHNH₂ a szuperoxid-diszmutáz enzim rézkötőhelyének modellje, összehasonlítás céljából a peptid komplexképződését a Cu(II)ionon kívül

Zn(II)ionnal is vizsgáltuk. A 4.18. táblázatban a ligandum protonálódási állandói mellett a képződő komplexek stabilitási állandóit is feltüntettem. Az adatok jelzik, hogy ezen védett tripeptid a Cu(II)ion számára jó komplexképzőnek tekinthető. Ezt támasztja alá a 4.28. ábra is, amelyen a Cu(II)-AcHVH₂ rendszerben 1:1 fém-ligandum arány mellett képződő komplexek koncentrációeloszlási görbéi láthatók a pH függvényében. A főbb részecskék, a [CuL]²⁺, [CuLH₂] és [CuLH₃]⁻ összetételű komplexek koordinációs módját spektrofotometriás, ESR és CD spektroszkópiás módszerrel határoztuk meg. A részecskék spektrális paramétereit a 4.19. táblázat foglalja össze.

4.19. táblázat A Cu(II)komplexek spektrális paramétereit

	komplex	$\lambda_{\max}(\epsilon)$ nm(M ⁻¹ cm ⁻¹)	A (10 ⁻⁴ cm ⁻¹)	g	$\lambda(\Delta\epsilon)$ nm(M ⁻¹ cm ⁻¹)
Ac-HisValHis-NH ₂	[CuL] ²⁺	690(35)	170	2,310	-
	[CuL ₂] ²⁺	570(70)	173	2,250	-
	[CuLH ₂]	530(126)	197	2,186	585(-0,82) 480(+1,15) 340(-2,20)
	[CuALH ₃] ⁻	530(126)	200	2,177	560(-0,60) 470(+0,30) 335(-0,90)
Ac-HisValGlyAsp-NH ₂	[CuL] ⁺	730(30)	170	2,310	-
	[CuLH ₁]	-	175	2,290	-
	[CuLH ₃] ²⁻	580(128)	178	2,260	610(+0,45) 520(-1,45) 320(+2,20) 255(+2,25)
	[CuLH ₄] ³⁻	535(128)	210	2,172	580(+0,80) 500(-2,30) 310(+2,30) 230(+4,50)

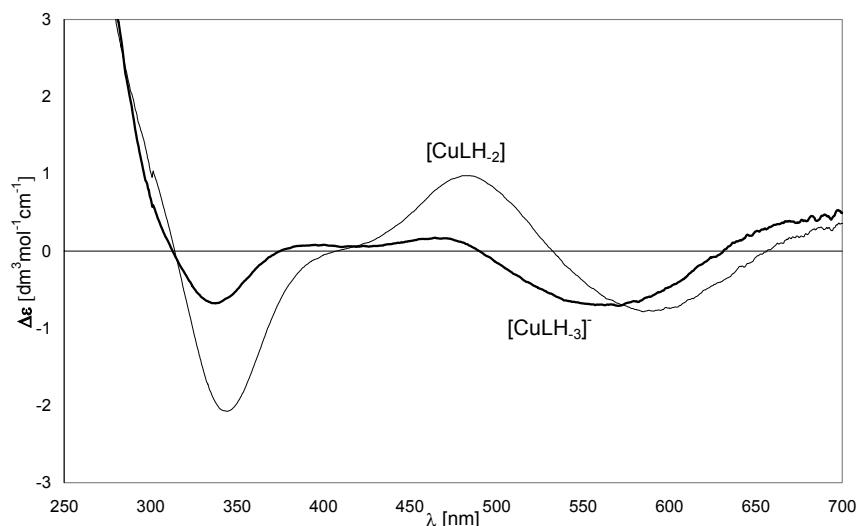
A $[\text{CuL}]^{2+}$ komplex $\text{pH} < 5$ képződik. Ilyen körülmények között, a ligandum pK értékeit figyelembe véve, az imidazol-oldalláncbeli nitrogén donoratomnak protonált formában kell lennie, ha nem koordinálódik a fémionhoz. Emellett a $[\text{CuHL}]^+$ összetételű protonált komplex hiánya további bizonyíték arra, hogy a $[\text{CuL}]^{2+}$ komplexben mindkét imidazol oldallánc kötődik a fémionhoz, makrokelát képződése közben. A korábbi irodalmi eredményekkel^{127,138,208,210} jó egyezésben lévő spektrális paraméterek (ESR, spektrofotometria) is alátámasztják a 4.29.a ábrán látható feltételezett szerkezetet. A $\text{pH} < 5$ -n a CD spektrumban egy nagyon kis intenzitású, pozitív CE észlelhető a 650-700 nm hullámhossz-tartományban, ami további közvetett bizonyítéknak tekinthető arra vonatkozóan, hogy a $[\text{CuL}]^{2+}$ komplexben csak az imidazolnitrogén donoratomok koordinálódnak. Korábban hasonló megfigyelésről számoltak be olyan peptidkomplexek CD spektroszkópiás vizsgálatait során, melyekben az imidazolnitrogén donoratomok voltak az egyedüli fémmegkötő helyek.^{2,50,138, 208, 211}



4.29. ábra Az AcHVHNH₂ Cu(II)komplexeinek feltételezett szerkezete
 a, $[\text{CuL}]^{2+}$, b, $[\text{CuLH}_2]^+$, c, $[\text{CuLH}_3]^+$ összetételű komplex

Ligandumfelesleg jelenlétében jelentős mennyiségben képződik a $[\text{CuL}_2]^{2+}$ összetételű komplex is. A spektrális paraméterek alapján ezen részecskében három vagy négy nitrogén donoratom koordinációja valószínűsíthető.

A $[\text{CuLH}_2]$ összetételű komplex képződését a d-d átmenet abszorpciós maximumának jelentős mértékű kék eltolódása, valamint az ESR és CD spektrumok jellegzetes változása kíséri. A spektrális paraméterek (4.19. táblázat) egyértelműen alátámasztják a 4.29.b ábrán látható, négy koordinálódó nitrogén donoratomot tartalmazó komplex létét. Az imidazol-oldallánc tehát horgonydonorként viselkedik, kötődése előidézi az amidcsoport deprotonálódását és koordinálódását. Ezt a jelenséget korábban más védett N-terminális aminocsoporttal rendelkező hisztidintartalmú peptidok esetén is tapasztalták.¹³⁷ Egy hasonló szerkezetű tetrapeptid, az AcHisGlyHisGlyOH Cu(II)komplexében pedig szintén egy héttagú kelátgyűrű kialakulására következtek.¹³⁸ A Cu(II)-AcHVH NH_2 és a Cu(II)-AcHisGlyHisGlyOH rendszerekben képződő komplexek összetétele nagyon hasonló. A $[\text{CuL}]^{2+}$ részecskékben makrokelát kialakulása valószínűsíthető mindkét peptid esetén, a $[\text{CuLH}_2]$ és a $[\text{CuLH}_3]$ összetételű komplexek spektrális paraméterei azonban jelentősen eltérnek a két ligandum esetében. Úgy tűnik, hogy a C-terminális Gly-nek és szabad karboxilát csoportjának jelentős hatása van a AcHisGlyHisGlyOH tetrapeptid komplexképző sajátságára. Emiatt a két peptid eltérő módon viselkedhet lúgos oldatban, bár mindkettő esetén az ilyen körülmények között képződő részecskében négy nitrogén donoratom koordinálódik.



4.30. ábra A Cu(II)-AcHVH NH_2 rendszerben képződő komplexek CD spektruma

A $[\text{CuLH}_2] \rightarrow [\text{CuLH}_3]$ átalakulás jelentős változást eredményez az ESR és CD paraméterekben (4.30. ábra), ellenben az UV-látható spektrum változatlan

marad. Mindez azt támasztja alá, hogy a $[\text{CuLH}_3]^-$ komplex képződése nem egy egyszerű hidrolitikus folyamat, hanem az acetamidocsoport nitrogénatomja deprotonálódik, és felváltja az N-terminális His imidazolcsoportját (N(Im1)) a fémion koordinációs szférájában. A $[\text{CuLH}_3]^-$ összetételű komplex feltételezett szerkezete a 4.28.c ábrán látható. A két komplexben található csatolt kelátgyűrűk tagszámának összehasonlítása is alátámasztja ezt a következtetést, hiszen a (7,5,6) tagú kelátrendszer (5,5,6) tagú váltja fel, amelynek termodinamikai stabilitása sokkal nagyobb.²¹² Az irodalomból jól ismert, hogy az XYHis aminosav-szekvenciának, amely az albumint modellezi, kiemelkedő fémmegekötő képessége van, különösen, ha a terminális aminosav is részt vehet a koordinációban.^{127, 213} A szabad terminális csoportokkal rendelkező HisValHis $[\text{CuLH}_2]$ komplexe esetén is albuminszerű kötőmód kialakulásáról számoltak be korábban.¹⁷⁴ A láncvégi aminosavcsoportot amiddá alakítva a ligandum fémmegekötő képessége azonban jelentősen csökken. Egy korábbi vizsgálat során a Z-GlyGlyHis-OH nagy pH-n képződő $[\text{CuLH}_3]^{2-}$ összetételű komplexében is a peptid (N⁻,N⁻,N⁻,N(Im)) koordinációs módjára következtettek.¹³⁷ Utóbbi részecske spektrális paraméterei ($g_{\parallel}=2,180$, $A_{\parallel}=202 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) nagyon jó egyezésben vannak az AchVH₂NH₂ megfelelő komplexének adataival (4.19. táblázat), ami alátámasztja, hogy a két peptid azonos módon koordinálódik.

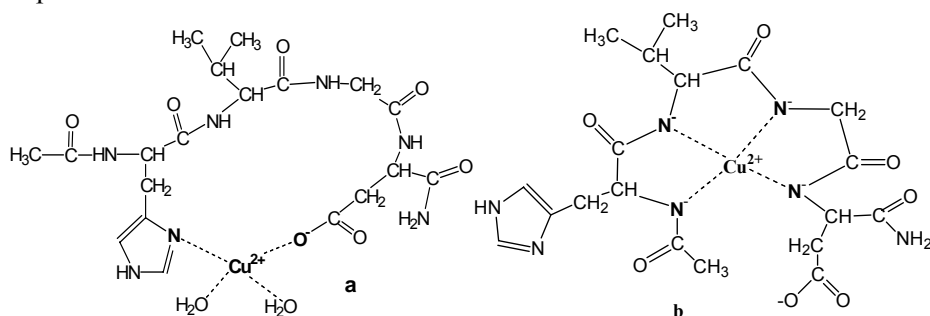
A Zn(II)-AchVH₂NH₂ rendszer esetén is végeztünk potenciometriás vizsgálatokat, de a Zn(II)komplexek stabilitási állandóinak meghatározása nem volt lehetséges. A pH<5 tartományban a ligandum nem lép kölcsönhatásba a fémionnal, míg ennél nagyobb pH-n bármilyen fémion-ligandum arány mellett csapadékképződés következik be. Korábban más, két hisztidil-oldalláncot tartalmazó peptid Zn(II)komplexeinek vizsgálata során is hasonló tapasztalatokról számoltak be.²⁰⁹ A csapadékképződés enyhén savas pH-n következik be, ahol a cinkion még nem hidrolizál. Irodalmi adatok szerint az imidazolcsoportot tartalmazó ligandumok komplexképződési reakciói Zn(II)ionnal savas pH-tartományban játszódnak le, a csapadék tehát nagy valószínűséggel a vizsgált tripeptid Zn(II)komplexe. Mivel a vizsgált ligandummal képződő $[\text{ZnL}]^{2+}$ összetételű komplex töltéssel rendelkezne, a rossz oldékonyságot nem okozhatja töltésneutralizáció. A Zn(II)ionra emellett nem jellemző a makrokelát szerkezetű komplexek képződése sem. Ezért $[\text{Zn}_n\text{L}_n]^{2n+}$ összetételű, ligandumhidas polimer szerkezetű komplex kialakulását valószínűsítjük, amelyben a peptid két hisztidil-oldallánca nem ugyanahhoz a cinkionhoz kötődik. A csapadék visszaoldódását még erősen lúgos oldatban sem tapasztaltuk, vagyis az

amidnitrogén deprotonálódása és koordinálódása nem következik be ebben a rendszerben.

Az AcHVGDNH₂ komplexei

A Cu,Zn-SOD Zn-kötőhelyét modellező védett tetrapeptid, az AcHVGDNH₂ Cu(II)- és Zn(II)komplexeit pH-potenciometriás és spektroszkópiás módszerekkel tanulmányoztuk. Az egyes komplexek stabilitási állandóit és spektrális paramétereit a 4.18. és a 4.19. táblázat tartalmazza.

A Cu(II)-AcHVGDNH₂ rendszerben enyhén savas oldatban képződő [CuL]⁺ összetételű komplexben a peptid imidazolnitrogén donoratomja az elsődleges fémegkötő hely. A [CuL]⁺ komplex stabilitási állandója lényegesen kisebb, mint az AcHVHNH₂ azonos összetételű komplexéé, de az egyszerű imidazol-donorcsoportot tartalmazó ligandumok esetén tapasztaltnál sokkal nagyobb.²¹⁴ Mindez a spektrális paraméterekkel (4.19. táblázat) együtt azt támasztja alá, hogy az aszpartil-oldallánc β-karboxilátcsoportja is koordinálódik a fémionhoz, azaz egy 17-tagú makrokelát alakul ki (4.31.a ábra). A 6 < pH < 10 tartományban valamennyi vizsgált fémion-ligandum arány mellett csapadékleválást tapasztaltunk, amit a fémion hidrolízise, vagy egy kis oldékonyságú komplex képződése okozhat. A pH növelésével azonban az amidcsoportok deprotonálódnak és koordinálódnak a fémionhoz, ami a csapadék visszaoldódását eredményezi. Lúgos közegben (pH > 10) [CuLH₃]²⁻ és [CuLH₄]³⁻ komplexek vannak jelen a tiszta oldatban. Aszparaginsavat közbenső helyzetben tartalmazó tri-, tetra- és pentapeptidek fémkomplexeinek korábbi vizsgálata során megállapították, hogy az aszpartil-oldallánc β-karboxilátcsoportja a fémionhoz kötődve elősegíti az előtte található amidcsoport deprotonálódását és koordinálódását.^{215,217}



4.31. ábra Cu(II)-AcHVGDNH₂ rendszerben képződő komplexek szerkezete a, [CuL]⁺, b, [CuLH₄]³⁻ összetételű komplex

Az abszorpciós spektrumban jelentős kék eltolódás figyelhető meg a $[\text{CuLH}_3]^{2-} \rightarrow [\text{CuLH}_4]^{3-}$ átalakulással párhuzamosan, ami arra utal, hogy az utóbbi részecskében több a koordinált nitrogén donoratom az ekvatoriális síkban, vagyis egy újabb amidnitrogén, a deprotonálódott acetamidocsoport donoratomja kötődik. A $[\text{CuLH}_4]^{3-}$ komplexben négy nitrogén donoratom koordinálódik a rézionhoz, $(\text{N}, \text{N}, \text{N}, \text{N})$ kötés mód valósul meg (4.31.b ábra). A $[\text{CuLH}_3]^{2-}$ összetételű komplex paraméterei többféle szerkezettel is értelmezhetők, a három deprotonálódott amidnitrogén mellett egyrészt a karboxiláttoxigén koordinálódásával, másrészt az imidazol- és a karboxilátcsoport egyidejű kötődésével, amely egy erősen torzult szerkezetű, ötös koordinációs számú komplexet eredményezhet.

Az előbbiekkal egyezésben a Cu(II)-AcHVH NH_2 rendszer esetén a komplex spektruma nem változott annak hatására, hogy a fémion koordinációs szférájában az imidazolnitrogén egy deprotonálódott amidnitrogénnel cserélődött.

A táblázatokban szereplő $[\text{CuLH}_1]$ komplex csupán kis mennyiségben képződik a vizsgálható pH-tartományban. Szerkezetéről csak ESR spektroszkópiás módszerrel nyerhető információ. A paraméterek alapján ($g_{\parallel}=2,290$, $A_{\parallel}=175 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) két nitrogén donoratom koordinációja feltételezhető, vagyis az imidazolnitrogén mellett egy deprotonálódott amidnitrogén is található a fémion koordinációs szférájában. Korábban hasonló, $(\text{N}(\text{Im}), \text{N})$ kötés mód kialakulására következtettek a Z-HisGly-OH-nel képződő $[\text{CuLH}_1]$ összetételű komplex esetén is. (Utóbbi komplex paraméterei:¹³⁷ $g_{\parallel}=2,269$, $A_{\parallel}=176 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$.)

A védett tetrapeptid, az AcHVGDNH $_2$ Zn(II)komplexeit is vizsgáltuk pH-potenciometriás módszerrel. A Zn(II)-AcHVH NH_2 rendszerrel ellentétben nem tapasztaltunk csapadékképződést savas közegben, a fémion hidrolízise azonban bekövetkezik semleges illetve enyhén lúgos oldatban. A $[\text{ZnB}]^+$ összetételű komplex stabilitási állandó értéke arra utal, hogy az imidazolnitrogén mellett az aszparaginsav karboxilátcsoportja is részt vesz a fémion megkötésében. A $[\text{ZnBH}_1]$ részecske valószínűleg egy vegyeshidroxokomplex, melynek képződése csapadékleválással jár. A Zn(II)ion tehát nem képes előidézni az amidnitrogén deprotonálódását. Ez egyezésben van a várakozásokkal, mivel amiddeprotonálódást és az azt követő koordinációt a szabad láncvégi aminocsoporttal rendelkező tetrapeptid Zn(II)komplexénél sem figyeltek meg.¹⁷⁴

A Cu(II) - AcHVH₂NH₂ – AcHm vegyes ligandumú rendszer vizsgálata

A Cu,Zn-SOD aktív centrumában a Cu(II)- és Zn(II)iont egy negatív töltésű, imidazoláto-híd köti össze. Ezt a kölcsönhatást vegyes ligandumú rendszereken keresztül tanulmányozhatjuk. A híd szerepét az enzimben a protein egyik hisztidinjének oldallánca tölti be, amelyet vizsgálataink során az N-acetil-hisztaminnal (AcHm) modelleztünk, ami nagyobb mérete miatt realisabb modell, mint az imidazol molekula.

A Cu(II)-AcHVH₂NH₂(A)–AcHm(L) rendszer vizsgálata során a törzskomplexek mellett két új részecske, a [CuAL]²⁺ és a [CuALH₂] összetételű vegyeskomplexek képződését tapasztaltuk, melyek stabilitási állandója lgβ₁₁₁₀=10,10 és lgβ₁₁₁₋₁=-3,93. A folyamatot jellemző egyensúlyi állandó értéke 3,47, ha az AcHm a [CuA]²⁺ komplex szabad koordinációs helyére kötődik, míg 1,93, ha a [CuAH₂] részecskéhez. Az irodalomban az AcHm szabad Cu(II)ionnal való kölcsönhatására lgK=3,97 adat található,¹⁵ ami nem sokkal nagyobb, mint a [CuAL]²⁺ komplex esetén kapott érték. A [CuALH₂] összetételű komplexhez tartozó stabilitási állandó azonban igen kicsi, ami azt jelzi, hogy a [CuAH₂] törzskomplex esetén a vegyesligandumú komplex képződése nem kedvező, mivel a tripeptid négy nitrogén donoratomja telíti a fémion koordinációs szféráját. Mindkét vegyesligandumú komplexről elmondható, hogy nem rendelkeznek kiugró stabilitással, s móltörtjük csupán 15-20%.

Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a Cu,Zn-SOD aktív centrumában az imidazoláto-híd stabilitását nem specifikus fémion-ligandum kölcsönhatás okozza, hanem a fehérje konformáció hatása a döntő.

A kapott eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy az enzimbéli aminosavszekvenciát kiugró fémmegkötő képesség jellemzi. A Cu(II)- és Zn(II)ionnal képződő MA összetételű komplexekben az enzimhez hasonlóan makrokelát alakul ki. Az oldalláncbeli donorcsoportok horgonydonorként viselkednek, elősegítik az amidnitrogének deprotonálódását és koordinálódását. Az N-acetil-hisztaminnal képződő vegyesligandumú komplexek nem rendelkeznek kiugró stabilitással, ami arra utal, hogy az imidazoláto-hidas, többmagvú szerkezet kialakulásában az enzimefehérje konformációnak van meghatározó szerepe.

5. Összefoglalás

A metalloenzimekben a fémion megkötésében meghatározó szerepet játszanak a protein oldalláncában található funkciós csoportok. Munkánk során a legfontosabb kötőhelyek közül két donorcsoport, az imidazol- és a tioétercsoport szerepét tanulmányoztuk.

Egyik fő célkitűzésünk a fémion-tioéterkén kölcsönhatás vizsgálata volt a fémionok igen széles körében, mivel ezen donorcsoportra jelentős fémionszelektivitás jellemző. A választott kétértékű fémionok között találhatóak a 3d (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), a 4d (Pd^{2+} és Cd^{2+}) valamint a főcsoportbeli elemek (Pb^{2+}) közé sorolhatók is. A szisztematikusan választott metionintartalmú di- és tripeptidek (GlyMet, MetGly, MetGlyGly, GlyMetGly, GlyGlyMet, MetMetAla, MetGlyMet és MetMetMet) komplexeit a pH-potenciometria mellett a képződő komplexek koordinációs módjának igazolása céljából különböző spektroszkópiás módszerekkel is tanulmányoztuk, azaz spektrofotometriás, CD, ESR illetve NMR spektroszkópiás vizsgálatokat is végeztünk.

A vizsgált fémionok a tioéterkén kialakuló kölcsönhatás mértéke, erőssége alapján három csoportba sorolhatók:

- A **Zn(II)-, Co(II)-, Cd(II) és Pb(II)ionokkal** képződő $[\text{ML}]^+$ összetételű komplexben a vizsgált metionintartalmú peptidek (NH_2, CO) koordinációja valósul meg, *a tioéterkén donoratom kötődése gyakorlatilag kizárható.*
- A **Cu(II)- és Ni(II)ionnal** való komplexképződés során a *tioétercsoport hatása csak másodlagos*, a meghatározó szerepet a peptidlánc tölti be.

Valamennyi vizsgált tripeptid $[\text{NiLH}_2]^-$ összetételű komplexében, a peptidekre általánosan jellemző koordinációs mód ($(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{COO}^-)$) valósul meg. A tioétercsoport gyenge koordinációja csak az N-terminális helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek $[\text{NiL}]^+$ összetételű, oktaéderes komplexében mutatható ki.

Cu(II)ion esetében a tioétercsoport térbeli helyzetétől függően *a kénatom is kötődhet* egyes komplexekben, melyek sztöchiometriai összetétele és a peptid aminosavszekvenciája között szoros összefüggést mutattunk ki. Nevezetesen Cu-S kölcsönhatás a $[\text{CuL}]^+$, $[\text{CuLH}_1]$ illetve $[\text{CuLH}_2]^-$ összetételű komplexekben jön létre N-terminális, közbenső helyzetű illetve C-terminális metionint tartalmazó tripeptidek esetén.

- A **Pd(II)ion** számára *a tioétercsoport az elsődleges fémionkötőhely*, amely pH-tól függetlenül koordinálódik. A peptid oldalláncában található tioéterkén

donoratom kötődése a képződő komplexek kiemelkedő termodinamikai stabilitását és az átmenetifém-ionok peptidkomplexeire jellemzőtől eltérő szerkezetek kialakulását eredményezi. A C-terminális illetve közbenső helyzetben metionint tartalmazó tripeptidek tioétercsoportja horgonydonorként viselkedik, így az amidnitrogén deprotonálódása és koordinálódása már erősen savas közegben bekövetkezik, $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S})$ illetve $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S})$ koordináció alakul ki. Ezzel ellentétben a tioétercsoport kötődése gátolja a tőle a C-terminális láncvég irányában található peptidcsoport deprotonálódását, így ez a folyamat a MetGlyGly esetben nagyobb pH-n játszódik le, míg a GlyMetGly második amidnitrogénje a teljes vizsgált pH-tartományban protonált marad, vagyis dipeptidszerű viselkedés tapasztalható. Utóbbi ligandum esetén egy- és háromfogú molekulákat tartalmazó biszkomplexek képződését is kimutattuk, ezek kötési izomereit a tioéter/amino-koordináció pH-függése és az NMR spektrumok alapján azonosítottuk. N-terminális metionint tartalmazó peptidokkal képződő biszkomplexekben ellenben az amino- és a tioétercsoport kötődésével hattagú kelátgyűrű képződik.

A tioéterkén donoratom előbb részletezett fémionszelektivitását kihasználva tioéterhidat tartalmazó vegyes fémkomplexek állíthatók elő. Munkánk során koordinatív telítetlen Pd(II)komplexek szabad koordinációs helyére Cu(II)- illetve Ni(II)komplexek nem koordinálódó oldalláncában található tioétercsoport kötődésével képződő vegyes fémkomplexeket is vizsgáltunk spektroszkópiás módszerekkel (spektrofotometria, NMR). Kimutattuk, hogy a képződő vegyes fémkomplex stabilitását befolyásolja, hogy a Pd(II)törzskomplexben milyen donoratomok koordinálnak a fémionhoz (hard-soft karakter), illetve mely fémion (Cu(II) vagy Ni(II)) komplexének nem koordinálódó oldalláncában található a híd szerepét betöltő tioétercsoport.

Az Pb(II)ion esetén az irodalmi adatok hiányossága miatt, összehasonlítás céljából a vizsgált ligandumok körét kiterjesztettük, egyéb oldalláncbeli donorcsoportokat tartalmazó aminosavak és peptidek komplexeit is tanulmányoztuk. Megállapítottuk, hogy az oldalláncbeli donorcsoport hatása csak tiolcsoportot tartalmazó ligandumok esetén jelentős, azonban kismértékű stabilitásnövekedés N-terminális helyzetben hisztidint és aszparaginsavat tartalmazó peptid esetén is kimutatható.

Számos enzim aktív centrumában kötődik imidazolnitrogén a fémionhoz, emiatt igen sok munka található az irodalomban, amelyben az előbb említett donorcsoport koordinációra gyakorolt hatását vizsgálták. Céljaink között ezért csak

egyetlen enzim, a szuperoxid-diszmutázok közé tartozó Cu,Zn-SOD, modell komplexeken keresztüli vizsgálata szerepelt. Az aktív centrumban a rézhez és a cinkhez koordinálódó két-két donoratom a peptidszekvenciában egymáshoz közel elhelyezkedő aminosavak oldalláncában található, amelyek a HisValHis tripeptiddel, illetve a HisValGlyAsp tetrapeptiddel modellezhetők. Munkánk során a két peptid mindkét láncvégen védett változatainak Cu(II)- és Zn(II)ionnal képezett komplexeit tanulmányoztuk pH-potenciometriás, spektrofotometriás, CD és ESR spektroszkópiás módszerekkel. Továbbá az enzimbéli imidazoláto-híd szerepét is vizsgáltuk az N-acetil-hisztaminnal képződő vegyesligandumú komplexeken keresztül.

Megállapítottuk, hogy az enzimbéli aminosavszekvenciát kiugró fémmegkötő képesség jellemzi. A Cu(II)- és Zn(II)ionnal képződő MA összetételű komplexekben az enzimhez hasonló módon, makrokelát szerkezet jön létre. Az oldalláncbéli donorcsoportok horgonydonor szerepet töltenek be, azaz kötődésük elősegíti az amidnitrogének deprotonálódását és koordinálódását. Az N-acetil-hisztaminnal képződő vegyesligandumú komplexek stabilitása nem kiugró, ami arra enged következtetni, hogy az enzimbéli többmagvú szerkezet létrejöttében nem specifikus fémion-ligandum kölcsönhatás kialakulása, hanem az enzimfehérje konformációjának hatása a döntő.

6. Summary

Functional groups in side chains of proteins play the most important role in the binding of metal ions in metalloenzymes. Imidazole nitrogen and thioether sulfur atoms are among the most common binding sites in metalloproteins. In the frame of this work we studied the role of the above mentioned donor functions.

L-Methionine and S-methyl-L-cysteine are the most common forms of thioether donors in biological systems. The thioether donor functions of these amino acid residues exhibit very high selectivity in metal binding preferring the coordination of soft metal ions including palladium(II) and platinum(II). In the biggest part of this work we studied the metal-sulfur interaction in the metal complexes of di- and tripeptides containing methionine in all possible locations (GlyMet, MetGly, GlyGlyMet, GlyMetGly, MetGlyGly, MetGlyMet, MetMetAla, and MetMetMet). The metal ions included divalent 3d (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) 4d (Pd^{2+} , Cd^{2+}) and main group (Pb^{2+}) elements. The results of the combined potentiometric and spectroscopic (UV-Vis, NMR/EPR, CD) studies reveal that the metal ions can be divided into three groups.

- The possibility of metal-thioether sulfur interaction was ruled out in the case of **zinc(II), cobalt(II), cadmium(II) and lead(II) ions**. $[\text{ML}]^+$ type complexes can be formed with (NH_2, CO) coordination of the peptides.

- In **copper(II) and nickel(II) complexes** the thioether has only secondary effect on the complex formation processes, the primary binding sites are the other donor functions of the peptide molecules.

All the tripeptides form stable square-planar diamagnetic species with nickel(II) ion, and both the thermodynamic and the spectroscopic parameters of $[\text{NiLH}_2]^-$ are very similar to those of triglycine. A weak axial coordination of thioether side-chain was concluded in the octahedral $[\text{NiL}]^+$ complexes of tripeptides with N-terminal methionyl residues (MetGlyGly, MetMetAla and MetMetMet). The metal ion is coordinated primarily via the terminal amino nitrogen and carbonyl oxygen donors and this species exists only in low concentration and in a narrow pH range, between pH 5 and 8. The species $[\text{NiLH}_2]^-$ predominates at higher pH values. In this complex the metal ion is coordinated by the terminal amino, two deprotonated amide nitrogens and the carboxylate oxygen, while the thioether moiety does not take part in metal binding.

In the case of copper(II) complexes the thioether sulfur has a minor, but systematic influence on the complex formation processes. Namely, the coordination

of the sulfur atoms depends on both the number and the position of methionyl residues in the peptide sequence. $[\text{CuL}]^+$, $[\text{CuLH}_1]$ and $[\text{CuLH}_2]^-$ are the main species in all cases and the bis complex, $[\text{CuL}_2\text{H}_1]^-$, can also be formed in the presence of ligand excess. The terminal amino and the neighbouring carbonyl groups are the main binding sites in the $[\text{CuL}]^+$ complexes of all peptides with N-terminal glycyl residue. The carbonyl group, however, can be replaced by the thioether sulfur of N-terminal methionine in cases of MetGlyGly, MetGlyMet, MetMetAla and MetMetMet. This change in coordination has only a slight effect on the stability constants of the complexes, but existence of a CT band (UV-Vis, CD) around 320-330 nm is a good indication of the S (thioether) \rightarrow Cu(II) interaction. In the case of tripeptides containing internal methionyl residues (GlyMetGly, MetMetAla and MetMetMet) a CT band (around 310nm in UV-Vis and around 340-360nm in CD) develops parallel with the formation of the species $[\text{CuLH}_1]$, in which either axial or equatorial coordinations of sulfur atoms are possible. EPR spectra and the change in the sign of the Cotton effect in CD spectra strongly suggest the equatorial coordination of the thioether residues. The coordination of C-terminal methionyl residues was concluded in the $[\text{CuLH}_2]^-$ complexes of GlyGlyMet, MetGlyMet and MetMetMet and the EPR spectra support an equilibrium between the isomeric forms involving carboxylate or sulfur in the equatorial positions.

- On the contrary, thioether residues were detected as the primary metal binding sites of tripeptides in the **palladium(II) complexes**. Their coordination does not depend on pH, and results in an enhanced thermodynamic stability of the complexes and a significant difference in the binding modes of the peptides with and without methionyl residues. The thioether functions of the peptides containing methionine in C-terminal or internal positions act as an anchor and the palladium promoted amide deprotonation occurs in very acidic solution. This process results in the formation of $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S})$ or $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S})$ coordinated species. On the contrary, the thioether binding hinders the amide deprotonation in terminal position so it takes place at higher pH values in the case of MetGly and MetGlyGly. Stable metal ion coordination of the internal methionyl residue results in the dipeptide-like coordination of the tripeptide GlyMetGly. In contrast with common tripeptides the second amide group of GlyMetGly is not a metal binding site at any pH values. The fourth coordination site of the species $[\text{PdLH}_1]$ of GlyMet or GlyMetGly is easily available for the coordination of another donor function. Depending on the experimental conditions this fourth donor group can be water molecule, chloride or

hydroxide ions and the second ligand in the bis complexes. The second ligand can coordinate in a monodentate manner via the thioether residue in acidic media ($[\text{PdL}_2]$) or via the amino group in the physiological pH range ($[\text{PdL}_2\text{H}_1]$). In the case of GlyGlyMet ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S}$) binding mode is not influenced by the excess of ligand or by hydroxo complex formation.

The significantly different affinity of thioether donor atoms toward palladium(II) and copper(II) or nickel(II) made it possible to prepare mixed metal complexes via thioether bridging. Thioether sulfur is not a binding site in the $[\text{CuLH}_1]$ complex of GlyMet or in $[\text{NiLH}_2]$ of GlyMetGly. Sulfur atoms of these metal complexes are, however, good candidates for binding to coordinatively unsaturated palladium(II) complexes ($[\text{Pd}(\text{dien})]^{2+}$ or $[\text{Pd}(\text{GlyMetH}_1)]$). We studied the formation of these mixed species by spectroscopic methods (UV-Vis, NMR). The interaction of the complexes results in a blue shift of the spectra in the UV range, which is considered as an indication of the Pd-S interaction and provides a good base for stability constant determination. In the case of the square-planar diamagnetic nickel(II) complexes the formation of mixed metal complexes can be monitored by NMR measurements. We concluded that the binding constant for the nickel(II) complex is higher than that of the corresponding copper(II) complex and the donor atoms in the coordination sphere of the parent palladium(II) complex also have an important effect on the stability.

There is only a very limited number of data available in the literature concerning the interaction of lead(II) with amino acids or peptides. Most of them are used at very different experimental conditions. In order to obtain reliable data for comparison we studied amino acids and peptides containing other possible coordinating donor atoms in the side chain besides thioether sulfur. We concluded that only the thiolate sulfur has important effect on the coordination properties of the ligands. We observed a little increase in the stability of the complexes of peptides containing histidine or aspartic acid in the N-terminal position.

Due to the high number of enzymes containing imidazole nitrogen in the active site a lot of studies have been performed in the field of coordination chemistry of this function. We focused our work only on one enzyme, namely the Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD). The active site of this enzyme consists of two metal ions, namely Cu(II) and Zn(II) bridged by a histidine side chain of the substrate sequence. Both of the metals are coordinated by two donor atoms from the side chains of amino acids located very near by the peptide sequences. This interaction can be modelled with the tripeptide HisValHis (copper binding site) and with the tetrapeptide HisValGlyAsp (zinc binding site). In order to obtain more

realistic model peptides with protected terminals were synthesised. The copper(II) and zinc complexes of these ligands were studied by potentiometric and spectroscopic methods (UV-Vis, EPR, CD). The mixed ligand complexes with N-acetyl-histamine gave information about the imidazolato bridge in the native enzyme.

Our results revealed that both ligands have effective metal binding properties but the tripeptide Ac-HisValHis-NH₂ is a much stronger complexing agent than the tetrapeptide Ac-HisValGlyAsp-NH₂. The complex formation reactions of copper(II) with Ac-HisValHis-NH₂ were described by the formation of [CuL]²⁺, [CuLH₂]⁺ and [CuLH₃]⁰ as the major species in solution in the pH range 3 to 12. The binding sites of these complexes were interpreted by the (N(Im₁),N(Im₂)), (N(Im₁),N⁻,N⁻,N(Im₂)) and (N⁻,N⁻,N⁻,N(Im₂)) coordination modes, respectively. Among the different species [CuLH₂]⁺ predominates at physiological pH. [CuL]²⁺ was found to be stabilized by the formation of a macrochelate similarly to the enzyme. The interaction of Ac-HisValHis-NH₂ with zinc(II) results in the formation of precipitate even in slightly acidic solutions indicating polynuclear complex formation via the terminal histidyl residues. Neither macrochelate formation nor amide deprotonation was observed in the zinc(II)- Ac-HisValHis-NH₂ system.

The tetrapeptide Ac-HisValGlyAsp-NH₂ binds both copper(II) and zinc(II) in the slightly acidic pH range. The structures of the species [CuL]⁺ and [ZnL]⁺ are best characterised by the assumption of the formation of a 17-membered (N(Im),COO⁻) macrochelate, but this type of binding is not able to prevent the hydrolysis of the metal ion. However, in the copper(II)- Ac-HisValGlyAsp-NH₂ system the metal ion can promote the deprotonation and coordination of amide functions in slightly basic media and the species [CuLH₃]²⁻ and [CuLH₄]³⁻ are formed containing 3N and 4N donor atoms, respectively.

The ternary system copper(II)- Ac-HisValHis-NH₂ – Ac-histamine (B) has also been studied to get a better understanding on the role of the bridging imidazole residue in the enzyme. It was found that the species [CuL]²⁺ containing the 14-membered (N(Im₁), N(Im₂)) macrochelate can bind another imidazole nitrogen, but the stability constant of ternary complex, [CuLB]²⁺, is lower than the binding constant of imidazole to the free copper(II) ion and the concentration of the mixed species does not exceed 15-20%. From these observations it can be concluded that the stabilization of the imidazolato bridge in the active centre of Cu,Zn-SOD is not the result of a specific metal ion to ligand interaction, but governed by the conformational changes of the protein molecule.

Irodalmi hivatkozások:

1. R.B. Martin, *Federation Proceedings*, Vol. 20, 54-57 (1961)
2. H. Sigel, B. Martin, *Chem. Rev.*, **82**, 385 (1982)
3. S. H. Laurie, in *Comprehensive Coordination Chemistry*, Vol. 2, ed. G. Wilkinson, Pergamon Press, Oxford, 1987, pp. 739
4. I. Sóvágó, in *Biocoordination Chemistry: Coordination Equilibria in Biologically Active Systems*, ed. K. Burger, Ellis Horwood, Chichester, 1990, Chap. 4, pp. 135-184
5. L.D. Pettit, J.E. Gregor, H. Kozlowski, in *Perspectives on Bioinorganic Chemistry*, Vol. 1, ed. R.W. Hay, J.R. Dilworth and K.B. Nolan, Jani Press, London, 1991, pp. 1-43
6. L. D. Pettit, R. A. Robbins, in *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids*, Vol. 1, ed. G. Berthon, Marcel Dekker Inc., New York, 1995, Part Three, Chap. 2, pp. 636-647
7. E. Farkas, I. Sóvágó, in *Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. 29, ed. J.S. Davies, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, Chapter 5, pp. 324
8. E. Farkas, I. Sóvágó, in *Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. 31, ed. J.S. Davies, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2000, Chapter 5, pp. 336-412
9. E. Farkas, I. Sóvágó, in *Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. 33, ed. G.C. Barrett and J.S. Davies, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2002, Chapter 5, pp. 295-364
10. T. Kiss, in *Biocoordination Chemistry: Coordination Equilibria in Biologically Active Systems*, ed. K. Burger, Ellis Horwood, Chichester, 1990, Chap. 3, pp. 56-134
11. S.H. Laurie, in *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids*, Vol. 1, ed. G. Berthon, Marcel Dekker Inc., New York, 1995, Part Three, Chap. 2, pp. 603-619
12. R.B. Martin, W.C. Hutton, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 4752 (1973)
13. D.W. Appleton T.P.A. Kruck, B. Sarkar, *J. Inorg. Biochem.*, **10**, 1-8 (1979)
14. M.R. Udupa, B. Krebs, *Inorg. Chim. Acta*, **31**, 251 (1978)
15. I. Sóvágó, B. Harman, A. Gergely, B. Radomska, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 235 (1986)
16. H.C. Freeman, Crystal Structures of metal peptide chemistry in *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 22, Academic Press, New York, 1967
17. G. Bormans, O.M: Peeters, H. Vanbilloen, N. Blaton, A. Verbruggen, *Inorg. Chem.*, **35**, 6240-6244 (1996)
18. I. Sóvágó, E. Farkas, A. Gergely, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2159 (1982)
19. I. Sóvágó, T. Kiss, K. Várnagy, B. Decock-Le Reverend, *Polyhedron*, **7**, 1089-1093 (1988)
20. K. Cherifi, B. Decock-Le Reverend, C. Loucheux, K. Várnagy, T. Kiss, I. Sóvágó, *J. Inorg. Biochem.*, **38**, 69 (1990)
21. N. Nagao, T. Kobayashi, T. Takayama, Y. Koike, Y. Ono, T. Watanabe, T. Mikami, M. Suzuki, T. Matumoto, M. Watabe, *Inorg. Chem.*, **36**, 4195-4201 (1997)
22. M. Watabe, T. Takayama, A. Kuwahara, T. Kawahashi, Y. Koike, A. Horiuchi, M. Suzuki, T. Watanabe, K. Mikami, T. Matsumoto, Y. Narusawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 2559 (1995)
23. S.L. Best, T.K. Chattopadhyay, M.I. Djuran, R.A. Palmer, P.J. Sadler, I. Sóvágó, K. Várnagy, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2587 (1997)
24. E.J. Evans, J.E. Grice, C.J. Hawkins, M.R. Heard, *Inorg. Chem.*, **19**, 3496 (1980)
25. C.J. Hawkins, J. Martin, *Inorg. Chem.*, **22**, 3879-3883 (1983)
26. C.J. Hawkins, J. Martin, *Inorg. Chem.*, **25**, 2146-2154 (1986)

27. K. Gerega, G. Formicka-Kozłowska, B. Jezowska-Trzebiatowska, B. Decock-le Reverend, *Inorg. Chim. Acta*, **125**, 183-185 (1986)
28. C.M. Murdock, M.K. Cooper, T.W. Hambley, W.N. Hunter, H.C. Freeman, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1329 (1986)
29. D.W. Margerum, G.D. Owens, in *Metal Ions in Biological Systems*, **12**, 75 (1981)
30. G.E. Kirvan, D.W. Margerum, *Inorg. Chem.*, **24**, 3245-3253 (1985)
31. G.L. Burce, E.B. Paniago, D.W. Margerum, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 261 (1975)
32. D.W. Margerum, *Pure and Appl. Chem.*, **55**, 23, (1983)
33. L.J. Kirschenbaum, J.D. Rush, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 1003 (1984)
34. J. Costa Pessoa, T. Gajda, R.D. Gillard, T. Kiss, S.M. Luz, J.J.G. Moura, I. Tomaz, J.P. Telo, I. Török, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3587 (1998)
35. T. Kiss, K. Petrohán, P. Buglyó, D. Sanna, G. Micera, J. Costa Pessoa, C. Madeira, *Inorg. Chem.*, **37**, 6389 (1998)
36. M.A. Girasolo, G. Guli, L. Pellerito, G. C. Stocco, G. Valle, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1195 (1996)
37. M.A. Girasolo, G. Guli, L. Pellerito, G.C. Stocco, *Appl. Organomet. Chem*, **9**, 241 (1995)
38. P. Surdy, P. Rubini, N. Buzás, B. Henry, L. Pellerito, T. Gajda, *Inorg. Chem.*, **38**, 346 (1999)
39. A. Jancsó, B. Henry, P. Rubini, G. Vankó, T. Gajda, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1941 (2000)
40. A. Kaneda, A.E. Martell, *J. Coord. Chem.*, **4**, 137 (1975)
41. A. Gergely, I. Nagypál, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1104 (1977)
42. E. Farkas, T. Kiss, *Polyhedron*, **8**, 2463 (1989)
43. M. Saato, S. Matsuki, M. Ikeda, J. Nakaya, *Inorg. Chim. Acta*, **125**, 49 (1986)
44. M. Sheinblatt, E.D. Becker, *J. Biol. Chem.*, **242**, 3159 (1967)
45. H. Kozłowski, *Chem. Phys. Letters*, **46**, 519 (1977)
46. H. Dobbie, W.O. Kermack, *Biochem. J.*, **59**, 257 (1955)
47. M.K. Kim, A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 914 (1966)
48. M.K. Kim, A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 872 (1969)
49. I. Sóvágó, D. Sanna, A. Dessí, K. Várnagy, G. Micera, *J. Inorg. Biochem.*, **63**, 99-117 (1996)
50. R.B. Martin, in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 23, ed H. Sigel, Marcel Dekker Inc., New York, 1988, Chap.5, 123-164.
51. H. C. Freeman, J.M. Guss, *Acta Cryst.*, **B34**, 2451 (1978)
52. E.J. Billo, D.W. Margerum, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 6811 (1970)
53. H. C. Freeman, J.M. Guss, R.L. Sinclair, *Acta Cryst.*, **B34**, 2459 (1978)
54. M.S. Michailidis, R.B. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 4683 (1969)
55. P.J. Morris, R.B. Martin, *Inorg. Chem.*, **10**, 964 (1971)
56. R.B. Martin, J.T. Edsall, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1107 (1960)
57. J. Reedijk, *Chem. Commun.*, 801 (1996)
58. M.J. Bloemink, J. Reedijk, in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 10, ed H. Sigel and A. Siegel, Marcel Dekker Inc., New York, 1980, 11.
59. R.M. Izatt, D. Eatough, J.J. Christensen, *J. Chem. Soc.,(A)*, 1301 (1967)
60. J. Kragten, in *Atlas of metal-ligand equilibria in aqueous solutions*, Wiley, New York, 1978, pp. 576-577
61. B.I. Nabivanets, L.V. Kalabina, *Russian J. Inorg. Chem.*, **15**, 812 (1970)

62. E.C. Frias, H. Pitsch, J. Ly, C. Poitrenaud, *Talanta*, **42**, 1675 (1995)
63. A. Iakovidis, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.*, 135-136, 17-63. (1994)
64. L.D. Pettit, M. Bezer, *Coord. Chem. Rev.*, 61, 97 (1985)
65. S. Kasselouri, A. Garoufis, M. Lamera-Hadjiliadis, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.*, 104, 1-12. (1990)
66. T.G. Appleton, *Coord. Chem. Rev.*, 166, 313-359. (1997)
67. H. Kozłowski, B. Jezowska-Trzebiatowska, *Chem. Phys. Lett.*, **42**, 246-249 (1976)
68. H. Kozłowski, G. Formicka-Kozłowska, B. Jezowska-Trzebiatowska, *Org. Magn. Res.*, **10**, 146 (1977)
69. H. Kozłowski, B. Jezowska, H. Szyszuk, *J. Mol. Struct.*, **50**, 73-80 (1978)
70. Cs.G. Ágoston, T. Kowalik-Jankowska, I. Sóvágó, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3295-3302 (1999)
71. R.A. Goyer, in *Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds*, ed H.G. Seiler, H. Sigel and A. Siegel, Marcel Dekker, New York, 1988, Chap. 31, pp. 359-382
72. P.B. Hammond, E.C. Foulkes, in *Metal Ions in Biological Systems*, **20**, 157-200 (1986)
73. E.S. Claudio, H.A. Godwin, J.S. Magyar, in *Progress in Inorganic Chemistry*, Vol. 51, ed. K.D. Karlin, John Wiley & Sons, 2003, pp. 1-144
74. P.G. Harrison, in *Comprehensive Coordination Chemistry*, Vol. 3, ed. G. Wilkinson, Pergamon Press, 1987, Chap. 26, pp. 183-234
75. P.G. Harrison, *Coord. Chem. Rev.*, **20**, 1-36 (1976)
76. R.B. Martin, in *Metal Ions in Biological Systems*, **20**, 21-65 (1986)
77. R.B. Martin, in *Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds*, ed H.G. Seiler, H. Sigel and A. Siegel, Marcel Dekker, New York, 1988, Chap. 2, pp. 9-25
78. J. Parr, *Polyhedron*, **16**, 551-566 (1997)
79. R.B. Martin, *Inorg. Chim. Acta*, **283**, 30-36 (1998)
80. R.N. Sylva, P.L. Brown, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1577-1581 (1980)
81. C.F. Baes, R.E. Mesmer, in *The Hydrolysis of Cations*, Wiley-Interscience, New York, 1976
82. D. Ferri, F. Salvatore, E. Vasca, *Annali di Chimica*, **79**, 1-13 (1989)
83. H. Sigel, C.P. Da Costa, R.B. Martin, *Coord. Chem. Rev.*, **219-221**, 435-461 (2001)
84. J.S. Mills, J.D. Johnson, *J. Biol. Chem.*, **260**, 15100-15105 (1985)
85. J.C. Payne, M.A. ter Horst, H. A. Godwin, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6850-6855 (1999)
86. N.C. Li, R.A. Manning, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 5225-5228 (1955)
87. G.R. Lenz, A.E. Martell, *Biochemistry*, **3**, 745-750 (1964)
88. H. Shindo, T.L. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1904-1909 (1965)
89. A.M. Corrie, M.D. Walker, D.R. Williams, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1012-1015 (1976)
90. K. Nag, P. Banerjee, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **36**, 2145-2149 (1974)
91. A.M. Corrie, G.K.R. Makar, M.L.D. Touche, D.R. Williams, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 105-110 (1975)
92. D.L. Rabenstein, S. Libich, *Inorg. Chem.*, **11**, 2960-2967 (1972)
93. G. Battistuzzi, M. Borsari, L. Menabue, M. Saladini, M. Sola, *Inorg. Chem.*, **35**, 4239-4247 (1996)
94. G. Brookes, L.D. Pettit, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2106 (1975)
95. T. Szabó-Planka et al., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1925 (1989)
96. E.J. Billo, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **40**, 1971 (1978)

97. A. Gergely, E. Farkas, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 381 (1982)
98. J.-F. Galey, B. Decock-le Reverend, A. Lebkiri, L.D. Pettit, S.I. Pyburn, H. Kozlowski, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2281-2287 (1991)
99. I. Sóvágó, in *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids*, Vol. 1, ed. G. Berthon, Marcel Dekker Inc., New York, 1995, Part Three, Chap. 2, pp.657-665
100. I. Sóvágó, R. B. Martin, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **43**, 425 (1981)
101. Y. Sugiura, Y. Hirayama, H. Tanaka, K. Ishizu, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 5577 (1975)
102. D.B. McCormick, R. Griesser, H. Sigel, in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 1 ed. H. Sigel, Marcel Dekker, New York, 1974, Chapter 6 pp. 213-247
103. P.M. Colman, H.C. Freeman, J.M. Guss, M. Murata, V.A. Norris, J.A.M. Ramshaw, M.P. Venkatappa, *Nature (London)*, **272**, 319 (1978)
104. R.E. Dickerson, T. Takano, D. Eisenberg, O.B. Kallai, L. Samson, A. Cooper, E. Margoliash, *J. Biol. Chem.*, **246**, 1511 (1971)
105. L.C. Dickinson, J.C.W. Chien, *Biochemistry*, **14**, 3534 (1975)
106. A. Müller, E. Diemann, in *Comprehensive Coordination Chemistry*, Vol. 2, ed. G. Wilkinson, Pergamon Press, 1987, Chap. 16.2, pp. 551-558
107. R.B. Martin, in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 9, ed. H. Sigel, Marcel Dekker, New York, 1979, Chapter 1, pp. 1-33
108. P. Bonvicini, A. Levi, V. Lucchini, G. Scorrano, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2267 (1972)
109. H. Sigel, V.M. Rheinberger, B.E. Fischer, *Inorg. Chem.*, **18**, 3334-3339 (1979)
110. P. deMeester, D.J. Hodgson, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 6884 (1977)
111. E. Dubler, N. Cathomas, G.B. Jameson, *Inorg. Chim. Acta*, **123**, 99 (1986)
112. H. Sigel, C.F. Neumann, B. Prijs, D.B. McCormick, M.C. Falk, *Inorg. Chem.*, **16**, 790 (1977)
113. H. Kozlowski, T. Kovalik, *Inorg. Nucl. Chem. Letters*, **14**, 201 (1978)
114. I. Sóvágó, Gy. Petőcz, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1717 (1987)
115. T. Kowalik-Jankowska, K. Várnagy, Cs. Bertalan, *J. Chem. Res. (S)*, 172 (1993)
116. T. Kowalik-Jankowska, A. Kiss, I. Sóvágó, H. Kozlowski, *Polish J. Chem.*, **68**, 1093 (1994)
117. R.P. Bonomo, G. Maccarrone, E. Rizzarelli, M. Vidali, *Inorg. Chem.*, **26**, 2893-2897 (1987)
118. B. Jezowska-Trzebiatowska, A. Allain, H. Kozlowski, *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **15**, 279 (1979)
119. M. Kubiak et al., *Acta Cryst.*, **B36**, 2246 (1980)
120. B. Decock-Le Reverend, H. Kozlowski, *J. Chem. Phys.*, **82**, 883. (1985)
121. B. Decock-Le Reverend, C. Loucheux, T. Kowalik, H. Kozlowski, *Inorg. Chim. Acta*, **66**, 205 (1982)
122. H. Kozlowski, B. Decock-Le Reverend, J.-L. Delaruelle, C. Loucheux, B. Ancian, *Inorg. Chim. Acta*, **78**, 31-35 (1983)
123. B. Jezowska-Trzebiatowska, T. Kowalik, H. Kozlowski, *Bull. Acad. Pol. Sci.*, **26**, 223 (1978)
124. B.T. Khan, S. Shamsuddin, K. Venkatasubramanian, *Polyhedron*, **11**, 671-676 (1992)
125. H. Kozlowski, Z. Siatecki, B. Jezowska-Trzebiatowska, A. Allain, *Inorg. Chim. Acta*, **46**, L25-L26 (1980)
126. B. Stypinski-Mis, G. Anderegg, *Anal. Chim. Acta*, **406**, 325-332 (2000)

127. H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, *Coord. Chem. Rev.*, **184**, 319-346 (1999)
128. M.A. Doran, S. Chaberek, A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 2129 (1964)
129. R.P. Agarwal, D.D. Perrin, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 89 (1976)
130. C. Livera, L.D. Pettit, M. Bataille, H. Kozłowski, B. Radomska, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 661 (1987)
131. J. Ueda, N. Ikota, A. Hanaki, K. Koga, *Inorg. Chim. Acta*, **135**, 43 (1987)
132. R. Bonomo, F. Bonsignore, E. Conte, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, R. Purello, E. Rizzarelli, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1295 (1993)
133. R. Bonomo, L. Casella, L. De Gioia, H. Molinari, G. Impellizzeri, T. Jordan, G. Pappalardo, R. Purrello, E. Rizzarelli, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2387 (1997)
134. A. Levitzki, I. Pecht, A. Berger, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 6844 (1972)
135. G.F. Bryce, R.W. Roeske, F.R.N. Gurd, *J. Biol. Chem.*, **240**, 3837 (1965)
136. G.F. Bryce, R.W. Roeske, F.R.N. Gurd, *J. Biol. Chem.*, **241**, 1072 (1966)
137. D. Sanna, Cs.G. Ágoston, I. Sóvágó, G. Micera, *Polyhedron*, **20**, 937-947 (2001)
138. M. Casolaro, M. Chelli, M. Ginanneschi, F. Laschi, L. Messori, M. Muniz-Miranda, A.M. Papini, T. Kowalik-Jankowska, H. Kozłowski, *J. Inorg. Biochem.*, **89**, 181-190 (2002)
139. J.C. Gutteridge, in *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids*, ed. G. Berthon, Marcel Dekker Inc., New York, 1995, Part Four, Chapter 3, Section A, pp 848-856
140. K.J.A. Davies, *Free Radicals and Oxidative Stress: Environment, Food and Drug Additives*, ed. C. Rice-Evans, B. Halliwell and G.G. Lunt, Portland Press, London, 1994, 61, 1
141. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Biochem. J.*, **219**, 1-14 (1984)
142. J. Aikens, T.A. Dix, *J. Biol. Chem.*, 266 (23), 15091 (1991)
143. T.A. Dix, K.M. Hess, M.A. Medina, R.W. Sullivan, S.L. Tilly, T.L.L. Webb, *Biochemistry*, **35**, 4578 (1996)
144. N.A. Law, M.T. Caudle, V.L. Pecoraro, in *Advances in Inorganic Chemistry*, Vol. 46, ed. A.G. Sykes, Academic Press, San Diego, 1999, pp. 305-440
145. J.A. Tainer, E.D. Getzoff, K.M. Beem, J.S. Richardson, D.C. Richardson, *J. Mol. Biol.*, **160**, 181-217 (1982)
146. J.A. Tainer, E.D. Getzoff, J.S. Richardson, D.C. Richardson, *Nature*, **306**, 284-287 (1983)
147. J.S. Valentine, L. M. Ellerby, J.A. Graden, C.R. Nishida, E. B. Gralla, in *Bioinorganic Chemistry*, ed. D.P. Kessissoglou, Kluwer Academic Publishers, Netherland, 1995, pp. 77-91
148. L. M. Ellerby, D.E. Cabelli, J.A. Graden, J.S. Valentine, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6556-6561 (1996)
149. P.J. Hart, M.M. Balbirnie, N.L. Ogihara, A.M. Nersissian, M.S. Weiss, J.S. Valentine, D. Eisenberg, *Biochemistry*, **38**, 2167-2178 (1999)
150. H.-D. Youn, H. Youn, J.-W. Lee, Y.-I. Yim, J.K. Lee, Y.C. Hah, S.-O. Kang, *Arch. Biochem. Biophys.*, **334**, 341 (1996)
151. I. Fridovich, *J. Exp. Biol.*, **201**, 1203-1209 (1998)
152. S. Choudhury et al., *Biochemistry*, **38**, 3744-3752 (1999)
153. D.P. Riley, *Chem. Rev.*, **99**, 2573-2587 (1999)
154. Q. Lu et al., *J. Am. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1429-1430 (1990)
155. M. Zongwan et al., *Polyhedron*, **11**, 191-196 (1992)

156. R.N. Patel, S. Kumar, K.B. Pandeya, *J. Inorg. Biochem.*, **89**, 61-68 (2002)
157. J.-L. Pierre, P. Chautemps, S. Refaif, C. Beguin, A.E. Marzouki, G. Serratrice, E. Saint-Aman, P. Rey, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 1965-1972 (1995)
158. H.L. Zhu, L.M. Zheng, D.G. Fu, X.Y. Huang, M.F. Wu, W.X. Tang, *J. Inorg. Biochem.*, **70**, 211-218 (1998)
159. H. Ohtsu, Y. Shimazaki, A. Odani, O. Yamauchi, *Chem. Commun.*, 2393-2394 (1999)
160. H. Ohtsu, Y. Shimazaki, A. Odani, O. Yamauchi, W. Mori, S. Itoh, S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5733-5741 (2000)
161. G. Tabbi, W.L. Driessen, J. Reedijk, R.P. Bonomo, N. Veldman, A.L. Spek, *Inorg. Chem.*, **36**, 1168-1175 (1997)
162. C.J. Feng, Q.H. Luo, Z.L. Wang, M.C. Shen, H.W. Wang, M.H. Zhao, *J. Inorg. Biochem.*, **75**, 1-6 (1999)
163. M. Linss, U. Weser, *Inorg. Chim. Acta*, **125**, 117-121 (1986)
164. C.M. Liu, R.G. Xiong, X.Z. You, Y.J. Liu, *Polyhedron*, **15**, 4565 (1996)
165. C.M. Liu et al., *Polyhedron*, **16**, 119-123 (1997)
166. J. Müller, D. Schübl, C. Maichle-Mössmer, J. Strahle, U. Weser, *J. Inorg. Biochem.*, **75**, 63-69 (1999)
167. J. Müller, K. Felix, C. Maichle, E. Lengfelder, J. Strahle, U. Weser, *Inorg. Chim. Acta*, **233**, 11 (1995)
168. K. Jitsukawa, M. Harata, H. Arai, H. Sakurai, H. Masuda, *Inorg. Chim. Acta*, **324**, 108-116 (2001)
169. A.L. Abuhijleh, C. Woods, *Inorg. Chem. Commun.*, **5**, 269-273 (2002)
170. K. Skorda, S.P. Perlepes, C.P. Raptopoulou, R. Keuleers, A. Terzis, J.C. Plakatouras, *Transition Metal Chemistry*, **24**, 541-545 (1999)
171. G. Facchin, M.H. Torre, E. Kremer, O.E. Piro, E.E. Castellano, E.J. Baran, *J. Inorg. Biochem.*, **89**, 174-180 (2002)
172. L.L. Costanzo, G. De Guidi, S. Giuffrida, E. Rizzarelli, G. Vecchio, *J. Inorg. Biochem.*, **50**, 273-281 (1993)
173. J. Ueda, T. Ozawa, M. Miyazaki, Y. Fujiwara, *J. Inorg. Biochem.*, **55**, 123-130 (1994)
174. A. Myari, G. Malandrinos, Y. Deligiannakis, J.C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, Z. Nagy, I. Sóvágó, *J. Inorg. Biochem.*, **85**, 253-261 (2001)
175. A. Myari, G. Malandrinos, J.C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, I. Sóvágó, *Bioinorg. Chem. Appl.*, **1**, 99-112 (2003)
176. M. Ciuffi, C. Cellai, S. Franchi-Micheli, P. Failli, L. Zilletti, M. Ginanneschi, M. Chelli, A.M. Papini, F. Paoletti, *Pharmacol. Res.* **38**, 279-287 (1998)
177. H.L. Grube, in *Handbook of Preparative Inorganic Chemistry*, ed. G. Bauer, Acad. Press, New York-London, 1965, pp. 1584
178. Bodanszky, in *Peptide Chemistry, A Practical Textbook*, Springer-Verlag (1993)
179. L. Zékány, I. Nagypál, in *Computation Methods for the Determination of Formation Constants*, ed. D. J. Leggett, Plenum Press, New York, 1985, pp. 291-355
180. H. M. Irving, M. G. Miles, L.D. Pettit, *Anal. Chim. Acta*, **38**, 475 (1967)
181. I. Puigdomenech, CED, Computer program drawing equilibrium diagrams, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden, 1998.
182. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1196 (1985)
183. G. Gran, *Acta Chem. Scand.*, **4**, 559 (1950)
184. E. Prenesti, P.G. Daniele, M. Prencipe, G. Ostacoli, *Polyhedron*, **18**, 3233 (1999)

185. K. Burger, *Modern koordinációs kémiai vizsgáló módszerek*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1967, 249-260.
186. R.B. Martin, in *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 1, ed. H. Sigel, Marcel Dekker, New York, 1974, Chapter 4, pp. 129-156
187. H. Kozłowski, G. Micera, in *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids*, Vol. 1, ed. G. Berthon, Marcel Dekker Inc., New York, 1995, pp.566-582
188. R.B. Martin, J.M. Tsangaris, J.W. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 821 (1968)
189. J.M. Tsangaris, J.W. Chang, R.B. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 726 (1969)
190. J.M. Tsangaris, R.B. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4255 (1970)
191. J.W. Chang, R.B. Martin, *J. Phys. Chem.*, **73**, 4277 (1969)
192. E.W. Wilson Jr., R.B. Martin, *Inorg. Chem.*, **9**, 528 (1970)
193. P.D. Ellis, in *The Multinuclear Approach to NMR Spectroscopy*, ed. J.B. Lambert and F.G. Riddell, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, 1983, 457-523.
194. B.J. Goodfellow, M.J. Lima, C. Ascenso, M. Kennedy, R. Sikkink, F. Rusnak, I. Moura, J. J.G. Moura, *Inorg. Chim. Acta*, **273**, 279-287 (1998)
195. H.J. Jacobsen, P.D. Ellis, *J. Phys. Chem.*, **85**, 3367-3369 (1981)
196. T.P. Pitner, E.W. Wilson Jr., R.B. Martin, *Inorg. Chem.*, **11**, 738 (1972)
197. A. Kiss, E. Farkas, I. Sóvágó, B. Thormann, B. Lippert, *J. Inorg. Biochem.*, **68**, 85(1997)
198. Z. Nagy, I. Fábián, I. Sóvágó, *J. Inorg. Biochem.*, **79**, 129 (2000)
199. M. Wienken, E. Zangrando, L. Randaccio, S. Menzer, B. Lippert, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3349 (1993)
200. A. Olin, *Acta Chem. Scand.*, **14**, 126 (1960)
201. G. Johansson, A. Olin, *Acta Chem. Scand.*, **22**, 3197 (1968)
202. L.D. Pettit, J.M. Swash, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 588-594 (1976)
203. D.D. Perrin, V.S. Sharma, *J. Chem. Soc. (A)*, 724-728 (1967)
204. A.M. Corrie, M.L.D. Touche, D.R. Williams, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2561-2565 (1973)
205. R.J.B. Diez-Caballero, J.P.A. Valentin, A.A. Garcia, P.S. Batanero, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 688-694 (1985)
206. Y. Khayat, M. Cromer-Morin, J. Scharff, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **41**, 1496-1498 (1979)
207. M. Filella, D.R. Williams, *Inorg. Chim. Acta*, **106**, 49-57 (1985)
208. M. Casolaro, M. Chelli, M. Ginanneschi, F. Laschi, M. Muniz-Miranda, A.M. Papini, G. Sbrana, *Spectrochim. Acta A*, **55**, 1675 (1999)
209. P. Gockel, M. Gelinsky, R. Vogler, H. Vahrenkamp, *Inorg. Chim. Acta*, **272**, 115 (1998)
210. K. Várnagy, J. Szabó, I. Sóvágó, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, G. Micera, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 467 (2000)
211. B. Gyurcsik, I. Vosekalna, E. Larsen, *Acta Chem. Scand.*, **51**, 49 (1997)
212. D. Sanna, Cs.G. Ágoston, G. Micera, I. Sóvágó, *Polyhedron*, **20**, 3079 (2001)
213. N. Camerman, A. Camerman, B. Sarkar, *Can. J. Chem.*, **54**, 1309 (1976)
214. A. E. Martell, R. M. Smith, in *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York, 1982
215. I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely, *Inorg. Chim. Acta*, **93**, L53 (1984)
216. B. Decock-Le Reverend, L. Andrianarijaona, C. Livera, L.D. Pettit, I. Steel, H. Kozłowski, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2221 (1986)
217. I. Sóvágó, C. Bertalan, L. Göbl, I. Schön, O. Nyéki, *J. Inorg. Biochem.*, **55**, 67 (1986)

Függelék

1. Az értekezés anyagához kapcsolódó közlemények:

1. K. Várnagy, B. Bóka, I. Sóvágó, D. Sanna, P. Marras and G. Micera:
Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) and nickel(II) complexes of tripeptides of methionine
Inorg. Chim. Acta, 275-276 (1998) 440-446.
2. B. Bóka, Z. Nagy, K. Várnagy and I. Sóvágó:
Solution equilibria and structural characterisation of the palladium(II) and mixed metal complexes of peptides containing methionyl residues
J. Inorg. Biochem., 83 (2001) 77-89.
3. K. Ősz, B. Bóka, K. Várnagy, I. Sóvágó, T. Kurtán and S. Antus:
The application of circular dichroism spectroscopy for the determination of metal ion speciation and coordination modes of peptide complexes
Polyhedron, 21, (2002) 2149-2159.
4. B. Bóka, I. Sóvágó, A. Myari, J.C. Plakatouras, 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
J. Inorg. Biochem., (közlésre előkészítve)

2. Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások, poszterek:

1. Bóka Beáta (témavezetők: dr. Várnagy Katalin, dr. Sóvágó Imre) (előadás)

Metionintartalmú tripeptidek átmenetifém komplexei

XXIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, 1997. április 2-4. Pécs

2. Katalin Várnagy, Imre Sóvágó, Beáta Bóka, Csaba Gábor Ágoston, Giovanni Micera and Daniele Sanna (poszter)

Equilibrium and Spectroscopic Studies on Copper(II) Complexes of Peptides Containing Sulfur Atoms

The 3rd Cost D1 Workshop on Biocoordination Chemistry, 11-13 September 1997, Bergen, Norvégia

3. Bóka Beáta (előadás)

Tioéterhidat tartalmazó vegyes fémkomplexek képződésének vizsgálata

XXI. Kémiai Előadói Napok, 1998. október 26-28. Szeged

4. Imre Sóvágó, Zoltán Nagy and Beáta Bóka (előadás)

Thermodynamic, Kinetic and Structural Studies on Palladium(II) Complexes of Thioether Ligands

5th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 13-17 April 1999, Ioannina, Görögország

5. Bóka Beáta, Várnagy Katalin és Sóvágó Imre (előadás)

Tioétercsoportot tartalmazó peptidok átmenetifém komplexeinek egyensúlyi és szerkezeti vizsgálata

XXXIV. Komplexkémiai Kollokvium, 1999. május 19-21. Tata

6. Beáta Bóka and Imre Sóvágó (poszter)

Palladium(II) Complexes of Peptides Containing Thioether Side Chains

Vth Symposium on Inorganic Biochemistry, 23-27 September 1999, Wroclaw, Lengyelország

7. B. Bóka and I. Sóvágó (poszter)

Metal ion dependence of thioether coordination

10th International Conference on Bioinorganic Chemistry, 26-31 August 2001,
Florence, Olaszország

8. Bóka Beáta, Nagy Zoltán, Sóvágó Imre, Alexandra Myari, Nick Hadjiliadis
(előadás)

A Cu,Zn-SOD aktív centrumát modellező peptidek Cu(II)- és Zn(II)komplexei
XXXVIII. Komplexkémiai Kollokvium, 2003. május 21-23. Gyula

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Sóvágó Imre egyetemi tanárnak sokoldalú segítségével, hasznos tanácsaiért.

Köszönöm Dr. Várnagy Katalin egyetemi docensnek, hogy munkám korábbi szakaszában témavezetőként nagy segítséget nyújtott a kezdeti nehéz lépések megtételében.

Köszönettel tartozom Prof. Nick Hadjiliadisnak, hogy lehetővé tette számomra, hogy kutatócsoportjában, a Ioanninai Egyetemen végezzem el a doktori munkám egyik alfejezetét (SOD modell komplexek) képező vizsgálatokat.

Köszönöm Dr. Kövér Katalin tudományos tanácsadónak a ^{113}Cd NMR, Dr Kurtán Tibornak és Ósz Katalinnak a CD, Dr. Iannis Deligiannakisnak, Dr. Danielle Sannanak és Dr Giovanni Miceranak az ESR spektroszkópiás vizsgálatok, míg Alexandra Myarinak a peptidszintézis során nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Köszönettel tartozom továbbá az Erasmus és a Marie Curie ösztöndíjakért, amelyek külföldi tanulmányutaimat lehetővé tették.

Köszönöm a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport minden volt és jelenlegi tagjának a munkám során adott hasznos tanácsaikat és segítségüket, valamint a baráti légkört.

Hálával tartozom családomnak támogatásukért és türelmükért.