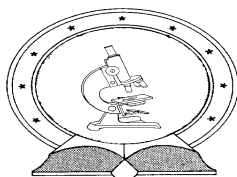


**DE TTK**



**1949**

**PEPTIDEK ÉS SZÁRMAZÉKAIK ÁTMENETIFÉM  
KOMPLEXEINEK KOORDINÁCIÓS ÉS REDOXI  
SAJÁTSÁGAI**

Doktori (Ph.D) értekezés

Timári Sarolta

Témavezető: Dr. Várnagy Katalin, egyetemi docens

Debreceni Egyetem  
Természettudományi Doktori Tanács  
Kémia Doktori Iskola  
Debrecen, 2012



# PEPTIDEK ÉS SZÁRMAZÉKAIK ÁTMENETIFÉM KOMPLEXEINEK KOORDINÁCIÓS ÉS REDOXI SAJÁTSÁGAI

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

Írta: Timári Sarolta okleveles kémia és angol nyelv és irodalom szakos bölcsész és tanár

Készült a Debreceni Egyetem kémia doktori iskolája  
(koordinációs kémia alprogramja) keretében

Témavezető: Dr. Várnagy Katalin egyetemi docens

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. ....

tagok: Dr. ....

Dr. ....

A doktori szigorlat időpontja: 2012 . . . . .

Az értekezés bírálói:

Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. ....

tagok: Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

Az értekezés védésének időpontja: 2012. .... .

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Kémia Doktori Iskola Koordinációs Kémia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (Ph.D) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2012. május 17.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Timári Sarolta doktorjelölt 2008–2011 között a fent megnevezett Doktori Iskola Koordinációs Kémia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2012. május 17.

a témavezető aláírása

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm a *Richter Gedeon Nyrt. Talentum Alapítványának*, hogy doktori képzésem során ösztöndíjat biztosított számomra.

Köszönettel tartozom *Prof. Dr. Fábrián István* tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy doktori értekezésemet az általa vezetett Szerzetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken készíthettem el.

Őszintén köszönöm témavezetőmnek, *Dr. Várnagy Katalin* egyetemi docensnek, hogy egyetemi hallgatóként bevezetett a kémiai kutatás világába, és a közösen végzett munka során rengeteg dologra megtanított, önzetlenül segített mindenben és nagy türelemmel magyarázta el az újabb és újabb módszerek elméleti hátterét, használatát. A kutatómunka mellett az oktatásról is sokat tanultam tőle.

Köszönetemet szeretném kifejezni *Dr. Sóvágó Imre* professzor emeritusnak szakmai támogatásáért, hogy mindvégig figyelemmel kísérte munkámat, és bármikor fordulhattam hozzá, ha tanácsra volt szükségem.

Köszönet illeti *Dr. Farkas Etelka* egyetemi tanárt és *Dr. Buglyó Péter* egyetemi docenst, akik szívesen segítettek, ha kérdések merültek fel bennem.

Köszönettel tartozom a *Bioszerzetlen Kémiai Kutatócsoport* minden régi és jelenlegi tagjának, hogy kérdéseimre választ adtak, és baráti légkört biztosítottak munkám elvégzéséhez. Külön köszönöm *Dr. Kállay Csillának*, hogy megtanította a műszerek használatát, és tanácsért mindig fordulhattam hozzá; *Dr. Jószai Viktóriának*, hogy segítséget nyújtott nekem munkám során; *Dr. Ősz Katalinnak*, hogy segített az NMR mérésekben és a számítógépes kiértékelésekben; *Dr. Nagy Zoltánnak*, hogy számítástechnikai kérdéseimre választ adott. Nemcsak szakmai, de emberi és baráti támogatást is kaptam *Dr. Csapó Edit*, *Bíró Linda*, *Szabó Orsolya*, *Turi Ildikó Margit* volt és jelenlegi PhD hallgatóktól, akiknek a barátsága sokat jelent számomra. Meg kell említenem *Balogh Gábor Zsolt*, *Cerea Riccardo*, *Csire Gizella* és *Sirokai Beáta* volt diplomamunkás hallgatókat, akiknek köszönöm, hogy segítségre voltak az új technikák kidolgozásában.

Köszönöm *Hüse Ilona* vegyésztechnikusnak az évek alatt nyújtott gyakorlati tanácsait és segítségét a mérésekben.

Köszönöm *Dr. Kurtán Tibornak* a cirkuláris dikroizmus mérésekben nyújtott segítségét. Hálaival gondolok *Dr. Giuseppe Pappalardora* és *Dr. Paolo de Bonára* (Department of Chemical Sciences, University of Catania, Szicília), akik egy hónapos cataniai tanulmányutam alatt megtanították nekem a peptidszintézis alapjait.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak és barátaimnak, külön kiemelve *szüleimet*, *testvéremet* és *nagymamámat*, folyamatos támogatásukat, szeretetüket és azt, hogy mindig bátorítottak és mellettem álltak az elmúlt évek során.

## TARTALOMJEGYZÉK

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata .....	1
<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	2
<b>2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK</b> .....	6
2.1. A Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzim és lehetséges modelljei .....	6
2.1.1 A vizsgált SOD modellek típusai .....	7
2.2. Az imidazolcsoport hatása a peptidek koordinációs kémiájára.....	9
2.2.1. Hisztidintartalmú peptidek komplexkémiája.....	9
2.2.1.1. Egy hisztidint tartalmazó peptidek komplexképző sajátságai .....	10
2.2.1.2. Több hisztidint tartalmazó peptidek komplexképző sajátságai .....	14
2.2.2. Bisz(imidazol-2-il) csoportot tartalmazó ligandumok komplexkémiája. 20	
2.2.2.1. Bisz(imidazol-2-il) csoportot tartalmazó aminosav- és peptidszármazékok komplexképző sajátságai .....	21
2.3. Réz(II)komplexek redoxi sajátságai .....	25
2.3.1. Különböző típusú ligandumok réz(II)komplexeinek redoxi sajátságai... 25	
2.3.2. Hisztidintartalmú peptidek réz(II)komplexeinek redoxi sajátságai..... 28	
2.4. Réz(II)komplexek SOD-aktivitásának vizsgálata .....	29
<b>3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK</b> .....	34
3.1. Felhasznált vegyszerek, vizsgált ligandumok .....	34
3.2. Peptidszintézis .....	37
3.3. pH-potenciometria.....	38
3.4. UV-látható spektrofotometria.....	41
3.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia.....	43
3.6. <sup>1</sup> H NMR spektroszkópia.....	45
3.7. Ciklikus voltammetria .....	46
3.8. Szuperoxid-diszmutáz aktivitás vizsgálatok .....	49
<b>4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK</b> .....	52
4.1. Oldategyensúlyi vizsgálatok.....	52
4.1.1. A vizsgált ligandumok sav-bázis sajátságai .....	52
4.1.2. A vizsgált ligandumok réz(II)komplexei .....	53
4.1.2.1. A Cu(II)-Ac-TKHM-NH <sub>2</sub> rendszer vizsgálata .....	53
4.1.2.2. A Cu(II)-Ac-HGGH-NH <sub>2</sub> rendszer vizsgálata .....	55
4.1.3. A vizsgált ligandumok nikkel(II)komplexei .....	59

4.1.4. A vizsgált ligandumok (Ac-HAHVH-NH <sub>2</sub> , Ac-HGHVH-NH <sub>2</sub> , Ac-HVHGH-NH <sub>2</sub> ) kobalt(II)komplexei .....	71
4.2. Elektrokémiai vizsgálatok .....	74
4.2.1. Aminosavak és egyszerű hisztidinszármazékok réz(II)komplexeinek vizsgálata .....	74
4.2.2. Hisztidintartalmú peptidek réz(II)komplexeinek vizsgálata .....	77
4.2.3. Bisz(imidazol-2-il) származékok réz(II)komplexeinek vizsgálata.....	85
4.3. Szuperoxid-diszmutáz aktivitás vizsgálatok .....	89
<b>5. ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	<b>98</b>
<b>6. SUMMARY</b> .....	<b>102</b>
<b>7. IRODALMI HIVATKOZÁSOK</b> .....	<b>107</b>
<b>8. FÜGGELÉK</b> .....	<b>115</b>





## Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata

SOD	szuperoxid-diszmutáz (enzim)		
SPARC	Secreted Protein, Acidic and Rich in Cystein		
N(Im)	imidazolnitrogén		
N <sup>-</sup>	deprotonált amidnitrogén		
PrP	prion protein		
Ha	hisztamin		
Z	benzil-oxi-karbonil (védőcsoport)		
Ac	acetyl-csoport (védőcsoport)		
Fmoc	9-fluorenil-metiloxi-karbonil (védőcsoport)		
BIM	bisz(imidazol-2-il)metán		
BIMA	bisz(imidazol-2-il)metil-amin		
BIP	3-[bisz(imidazol-2-il)]-propionsav		
DMF	dimetil-formamid		
TBTU	2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium tetrafluoroborátot		
HOBt	N-hidroxi-benzotriazol		
TIS	triizopropil-szilán		
DIEA	N,N-diizopropil-etilamin		
EDT	etilén-diamin-tetraecetsav		
PMDT	pentametil-dietiléntriamin		
Et <sub>2</sub> O	dietil-éter		
TFA	trifluor-ecetsav		
ACN	acetonitril		
DCM	diklórmétán		
NHE	normál hidrogén elektród		
SCE	telített kalomel elektród		
NBT	nitroblue-tetrazólium-klorid		
PEG	polietilén-glikol		
Me	metil		
A vagy Ala	alanin	T vagy Thr	treonin
D vagy Asp	aszparaginsav	V vagy Val	valin
E vagy Glu	glutaminsav	W vagy Trp	triptofán
F vagy Phe	fenilalanin	Y vagy Tyr	tirozin
G vagy Gly	glicin		
H vagy His	hisztidin		
K vagy Lys	lizin		
M vagy Met	metionin		
N vagy Asn	aszparagin		
P vagy Pro	prolin		
Q vagy Gln	glutamin		
R vagy Arg	arginin		
S vagy Ser	szerin		

## 1. BEVEZETÉS

Régóta ismert, hogy bizonyos fémionok létfontosságúak az élő szervezet számára. Szerepet játszanak a szerves molekulák szintézisében, szállításában, illetve biológiai rendszerek sav-bázis- és redoxi folyamatainak katalizálásában. Napjainkra az is egyértelművé vált, hogy az élő szervezetben előforduló ligandumok közül a fehérjék képesek legerősebben megkötni a fémionokat.

A fémionok közül a fehérjék elsősorban a réz(II)-, nikkell(II)-, cink(II)- és kobalt(II)ionok számára jelentenek fontos kötőhelyet. Ezen fémionok közül a kötött formában előforduló réz(II)ion többféle szerepet is betölt az élő szervezetben. A különböző réz(II)ionot tartalmazó proteinek funkciója a réz szállításához (ceruloplazmin), tárolásához (metallothionein), illetve redoxi folyamatok katalizálásához kapcsolódik (szuperoxid-diszmutázok, oxidázok, oxigenázok, elektron-transzferproteinek). Ezekben a réz főleg +2, illetve +1 oxidációs állapotban fordul elő.

A réz(II)komplexek vizsgálata mellett érdemes tanulmányozni a ligandumok nikkell(II)komplexeit is. A nikkell(II)ion biológiai szerepét csak 1975-ben ismerték el, amikor az ureáz enzim nikkeltartalmát azonosították. A karbamid hidrolízisét katalizáló ureázok számos növényben és baktériumban, de magasabb rendű élőlényben is megtalálhatók. Aktív centrumuk két nikkell(II)ionot tartalmaz, melyekhez két-két imidazolgyűrű és egy-egy vízmolekula kötődik<sup>1</sup>. A két fémionot egy aminocsoportján karbamilált lizin köti össze. Az ureázok mellett ma már egyre több nikkeltartalmú enzim ismeretes. Ezek között említhetjük meg a nikkell-vas hidrogenázokat<sup>2</sup>, amelyek a hidrogén vízzé történő oxidációját katalizálják, valamint a metil-koenzim M-reduktázt<sup>3</sup>, amelynek nikkeltartalmú koenzime, az F<sub>430</sub> a szén-dioxid metánná alakulásában vesz részt. Szintén nikkelt tartalmaz a CO-dehidrogenáz<sup>4</sup>, ami katalizálja a szén-monoxid reverzibilis oxidációját szén-dioxiddá, valamint a nemrégiben azonosított Ni(II)-szuperoxid-diszmutáz enzim is<sup>5,6</sup>.

A kobalt(II)ion kisebb mennyiségben fordul elő az élő szervezetben, jelenlétének felismerése a juhok és szarvasmarhák sorvadásos megbetegedésének (amit Ausztráliában „partvidéki kórnak” neveznek) kezeléséhez köthető. A B<sub>12</sub>-vitamint – amely kobalt(III)ionot tartalmaz – extrahálták a nyers májból, és kimutatták hatékonyságát a vészes vérszegénység kezelésében. Ma már ismeretes, hogy a B<sub>12</sub>-vitamin számos biokémiai folyamat koenzimje, melyek közül a legfontosabb a vörös vértetek képződése<sup>7</sup>. A B<sub>12</sub>-vitamin modellvegyületeiben az is megfigyelhető, hogy a kobalt koordinációs szférája sok tekintetben hasonlít a vas kötőmódjához a hembén. Ugyan a kobalt biológiai szerepe nem olyan széleskörű, mint a

nikkelé, a kobalt(II)komplexek viselkedése analógiát mutat a cink(II)iont tartalmazó rendszerek viselkedésével, mely ion komplexei nehezen vizsgálhatók. Így a kobalt(II)iont tartalmazó rendszerek vizsgálata értékes információt adhat.

A különböző fémtartalmú enzimek, proteinek és egyéb peptidláncot tartalmazó vegyületek legegyszerűbben olyan rendszerekkel modellezhetők, melyek központi ionként valamilyen átmenetifémiont, ligandumként aminosavat, peptidet vagy azok származékát tartalmazzák. Az elmúlt évtizedekben számos vizsgálatot végeztek, amelyek során a fémion-fehérje kölcsönhatásról a modellvegyületek segítségével gyűjtöttek információt. Mindezen vizsgálatok azt mutatták, hogy a metalloproteinekben a fémionok megkötésére leggyakrabban a peptidlánc oldalláncbéli donorcsoportjai szolgálnak. Ezek között említhetjük meg a hisztidin imidazol oldalláncát, mely az egyik legfontosabb kötőhelynek tekinthető, ennek köszönhetően viselkedését már kiterjedten vizsgálták.

A fémion – hisztidin imidazolnitrogén kölcsönhatásra számos példát találunk a metalloenzimek körében. A szénsavanhidrázban például a cink(II)ion három imidazolgyűrűhöz<sup>8</sup>, míg a karboxipeptidázban két imidazolgyűrűhöz és egy karboxilátsoporthoz<sup>9</sup> kapcsolódik. A fémion koordinációja szintén részben az imidazolnitrogéneken keresztül valósul meg a különböző típusú szuperoxid-diszmutáz enzimekben is. Ezek közül a baktériumokban Mn- és/vagy Fe-SOD-ot azonosítottak, amelyek szerkezete hasonlóságot mutat<sup>10,11,12</sup>. Mindkét fémion körül trigonális bipiramisos elrendeződés alakul ki, az ekvatoriális síkban két hisztidinnitrogén és egy aszparatil rész koordinálódik, a harmadik hisztidin és egy oldószermolekula axiálisan kötődik. Mindössze néhány évvel ezelőtt azonosították a *Streptomyces seoulensis*-ben a legújabb SOD-enzimet, amely cisztein kénatomokhoz kötve egy axiális hisztidin kapcsolódásával nikkelt tartalmaz<sup>5,6</sup>. Az eukarióták sejtjeiben működő Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzim aktív centrumában is hasonló koordinációs viszonyokkal találkozunk; a réz(II)ion négy imidazolnitrogénhez, míg a cink(II)ion három imidazolnitrogénhez és egy aszparaginsav karboxilátsoportjához kapcsolódik.

Ezen enzim modellezésével az utóbbi években több kutatócsoport is foglalkozott beleértve a Debreceni Egyetem Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportját is. Kísérleteik eredményeit dolgozatomban irodalmi áttekintés című részében részletesen tárgyalom. Mivel egy adott modellkomplex számos feltételnek kell, hogy eleget tegyen, a mai napig kihívást jelent a kutatók számára egy minden szempontból megfelelő modellvegyület megtalálása. A kutatás közel sem tekinthető lezártnak, amely részben annak is köszönhető, hogy egyre inkább hangsúlyt kap a szervezetben felhalmozódó szabad gyökök

egészségkárosító hatása. Ezen szabad gyökök a lebontó folyamatok során keletkeznek. A szervezet öregedéséért is felelősek, felhalmozódásuk kirívó esetben idegrendszeri rendellenességekhez, tumorok kialakulásához, illetve más sejtkárosodás következtében fellépő betegségekhez vezethet.

A Cu,Zn-SOD enzim egyike azon specifikus enzimeknek, amelyek a sejtekben a szabad gyökök elbontását végzik. Számos észrevétel bizonyítja, hogy több szabad gyök termelődik az idősebb állatokban, mint a fiatalabbakban<sup>13</sup>. Kimutatták, hogy az enzim mennyisége nagyobb a hosszabb élettartamú állatokban, mint a rövidebb ideig élőkben. A legmagasabb szintet az emberben mérték. Azok az alacsonyabb rendű állatok, amelyek extra mennyiségben tartalmazták bizonyos sejteikben a szuperoxid-diszmutázt, 40 %-kal tovább éltek a kontrollállatoknál<sup>14</sup>.

Munkánk során célunk volt a kutatócsoportunkban korábban előállított lehetséges Cu,Zn-SOD modellvegyületek további jellemzése és a vizsgálatok kiegészítése.

Három fő célt tűztünk ki. Mivel a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumának Cu(II)-kötőhelyét modellező peptidok komplexképző sajátosságainak tanulmányozását Cu(II)-ionokkal már korábban elvégezték, így ezen ionok jelenlétében csak néhány kiegészítő mérést végeztünk. *A továbbiakban kiterjesztettük a peptidláncban különböző helyen és számban hisztidint tartalmazó védett peptidok oldategyensúlyi jellemzését olyan fémionokra, amelyek az élő szervezetben nyomelemként fordulnak elő; választásunk a nikkell(II)- és a kobalt(II)ionokra esett.*

Ezen vizsgálatokat követően az említett ligandumok Cu(II)-komplexeinek kémiai kísérleti módszerekkel kivitelezhető hatásvizsgálatát végeztük el. *Munkánk második fázisában a peptidok és a bisz(imidazol-2-il) származékok Cu(II)-ionokkal való komplexképződésének ismeretében azon komplexek redoxi paramétereit határoztuk meg, amelyekben a fémion koordinációja az oldalláncban található imidazolnitrogéneken keresztül valósul meg. Célunk a Cu(II)-komplexek redoxi sajátosságainak jellemzése volt egy szisztematikus ciklikus voltammetriás kísérletsorozaton keresztül.* Vizsgálataink során választ kerestünk arra, hogy a peptidláncban helyet foglaló hisztidinek száma és elhelyezkedése hogyan befolyásolja a redoxipotenciál értékeket. A mérések lehetőséget adtak annak eldöntésére, hogy redoxipotenciál értékeik alapján alkalmasak lehetnek-e ezek a komplexek a szuperoxid gyökönion elbontására.

*A munka harmadik szakaszában a szerkezeti és redoxi szempontból ígéretesnek bizonyuló Cu(II)-komplexeiket vizsgáltuk tovább, a SOD-aktivitásukat határoztuk meg. Ezen komplexek között imidazolnitrogénes*

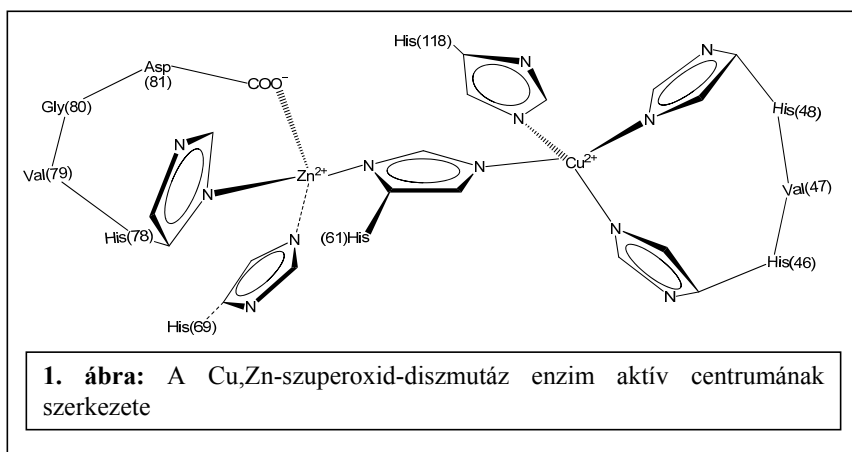
*koordinációt tartalmazó komplexeket és egy imidazolátohidas komplexet is tanulmányoztunk. Különböző pH-értékeken végeztünk méréseket a szakirodalomból ismert indirekt SOD-aktivitást mérő módszer felhasználásával, spektrofotometriás technika segítségével. A SOD-aktivitás mérések során kíváncsiak voltunk arra, hogy megfigyelhető-e korreláció egy komplex stabilitása, redoxipotenciál értéke és SOD-aktivitása között.*

Eredményeinket dolgozatomban az egyes kísérleti technikák szerint csoportosítva tárgyalom.

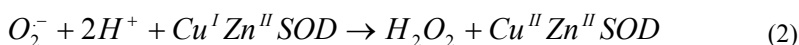
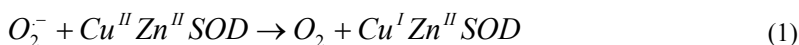
## 2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

### 2.1. A Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzim és lehetséges modelljei

Ahogy azt a dolgozat bevezetőjében is említettem, a szuperoxid-diszmutáz enzimeknek több típusa is ismert. Ezek közül részletesen csak a Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzimet mutatom be, kísérleti munkám során ugyanis ezen enzim aktív centrumának modellezésével foglalkoztam.



A Cu,Zn-SOD enzim két alegységből épül fel, amelyeket hidrofób kölcsönhatás tart össze (1. ábra). Alegységenként egy-egy aktív centrumot találunk, amelyekben egy réz(II)- és egy cink(II)ion foglal helyet<sup>15,16</sup>. A réz(II)ion négy imidazolnitrogénhez koordinálódik, míg a cink(II)ion három imidazolnitrogénhez és egy aszparaginsav karboxilátcsoportjához kapcsolódik. Ezzel a réz(II)ion körül torzult tetragonális piramisos, a cink(II)ion körül pedig tetraédes geometria alakul ki. A fémionok megkötése mellett ún. hídszerephez is jut az imidazolgyűrű az enzimben; az aktív centrumban összeköti a réz(II)- illetve a cink(II)-kötőhelyet. A cink(II)ionnak elsősorban szerkezetalkító szerepe van, de újabban a külsősférás elektrontranszferfolyamat gyorsítását tulajdonítják neki. Az enzim működése a réz(II)ion oxidációs állapotának megváltozásával jár együtt. Első lépésben a réz(II)ion redukálódik réz(I)ionná, majd egy újabb szuperoxid-gyökanionnal való reakcióban visszaképződik a réz(II)ion. A réz(II)ion redoxi átalakulása közben a szuperoxid-gyökanió oxigénné és hidrogén-peroxiddá alakul át az alábbi egyenletek szerint:



A katalitikus reakció sebességi állandója és a spektroszkópiai tulajdonságok széles pH-tartományban (5,0-9,5) csaknem függetlenek a pH-tól<sup>17</sup>.

Az elmúlt években számos közlemény született, amely a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumának modellezésével foglalkozik. A vizsgált modellvegyületek különböző szempontok alapján több csoportba sorolhatók; beszélhetünk szerkezeti és funkcionális modellekről is. Szerkezeti modell alatt értjük azokat a komplexeket, amelyeket úgy állítottak elő, hogy az aktív centrumban a koordinálódott fémion körül kialakuló kötésmódot modellezték. Szintén szerkezeti szempontú modellezésnek tekinthetők azok a munkák, amelyek során a fémion kötőhelyénél megjelenő aminosav-szekvenciát modellezik különböző tagszámú peptidek segítségével. Funkcionális modellekről akkor beszélünk, amikor egy komplex szerkezete ugyan nem feltétlenül követi az enzim aktív centrumában kialakuló kötésviszonyokat, de aktivitást mutat a szuperoxid gyökánionnal szemben.

Mindezen modellkomplexek közül azok a leghatékonyabbak, amelyek több szempontból is megfelelő modellek. Egyrészt hasonló aminosav-szekvenciát tartalmaznak, mint ami az aktív centrumban is megjelenik, másrészt olyan redoxipotenciál érték jellemzi őket, amely alapján képesek lehetnek a szuperoxid gyökánion elbontására. Ahhoz, hogy ez megvalósuljon az adott komplex redoxipotenciál értéke  $-0,16$  V és  $+0,89$  V közé kell, hogy essen<sup>18</sup>. Természetesen akkor mondhatjuk egy komplexre, hogy hatékony SOD modell, ha egy közvetlen vagy közvetett SOD-aktivitást mérő technika segítségével is bizonyítjuk, hogy a komplex elbontja a szuperoxid gyökániont. Mivel az utóbbi években számos vegyületet állítottak elő ezen enzim modellezésére, a dolgozat következő alfejezetében egy áttekintést kívánok nyújtani a különböző típusú modellkomplexekről.

### 2.1.1. A vizsgált SOD modellek típusai

A SOD enzim modellezésére az elmúlt évek során előállított komplexek igen változatos képet mutatnak. A vizsgált komplexek között megtalálhatóak polipeptidek Cu(II)-komplexei<sup>19,20</sup>, polidentát Schiff-bázis ligandumok<sup>21,22,23,24,25</sup> és vegyes ligandumú komplexek<sup>26,27</sup>.

Több vizsgálat is azt mutatta, hogy a makrociklusos ligandumok Cu(II)-komplexei hatékony SOD modellek lehetnek. Zhu és szerzőtársai egy dinukleáris Cu(II)-komplexeket tanulmányoztak, ahol az alapligandum egy makrociklusos vegyület volt<sup>28</sup>. Azt találták, hogy a fémion körül torzult tetragonális-piramisos geometria jön létre, amely hasonló a natív enzimben megjelenő kötésmódhoz. A kialakuló imidazolátohid ugyan felbomlik, de abban a pH-tartományban, amely a natív enzimre is jellemző. Később Shu-an Li és társai állítottak elő egy olyan makrociklusos ligandumot, amely esetében már a molekulán belül kialakulhatott az imidazolátohid<sup>29</sup>. Megállapították, hogy hatékonyabb SOD modell az a komplex, amely egy Cu(II)-, illetve egy Zn(II)-iont tartalmaz. A jelentős aktivitást a makrociklusos ligandum flexibilitásával magyarázták.

Hasonló következtetésre jutottak további heterodinukleáris komplexek vizsgálata során is<sup>30</sup>. A két Cu(II)-iont tartalmazó komplexek közül azok mutattak jelentős SOD-aktivitást, amelyekben a természetes enzim aktív centrumában megjelenő torzult szerkezet alakult ki a fémionok körül, illetve a két fémiont imidazolátohid kapcsolta össze<sup>31,32</sup>.

Említésre méltó SOD-aktivitást mutattak különféle, piridingyűrűket tartalmazó ligandumok Cu(II)-komplexei is<sup>33</sup>. Különböző poli-piridilamin ligandumok vizsgálata során azt találták, hogy ha a ligandum szerkezetének köszönhetően lehetőség van hidrogénkötés kialakulására, akkor nő a komplex SOD-aktivitása. A hidrogénkötés kialakítására képes csoport ugyanolyan szerepet tölt be, mint a természetes enzim Arg<sub>141</sub> egysége, azaz segíti a szuperoxid gyökánion kapcsolódását a Cu(II)-ionhoz. Azt is megfigyelték, hogy az ötös koordinációjú komplexek aktívabbak voltak, mint a négyes koordinációs számúak, azaz a Cu(II)-ion körül kialakuló torzult geometria kedvez a SOD-aktivitásnak. Emellett a kétmagvú komplexek jobb modellnek bizonyultak, mint az egymagvúak.

Patel és munkatársai olyan kétmagvú komplexeket vizsgáltak, amelyek ligandumként bipiridilt vagy fenantrolint tartalmaztak<sup>34</sup>. Az előállított komplexekben kialakult az imidazolátohid, amely 8,5-10-es pH-tartományban maradt stabilis. A heterodinukleáris komplexek nagyobb SOD-aktivitást mutattak, mint a két Cu(II)-iont tartalmazó komplexek. A mért SOD-aktivitás értékek azonban elmaradtak azoktól, amelyeket makrociklusos ligandumok jelenlétében mértek. Vizsgálataik eredményei alapján arra a következtetésre jutottak, hogy egy komplex SOD-aktivitása összefügg a fémcentrum körül kialakuló geometria megváltozásával, torzulásával, valamint azzal, hogy szterikusan mennyire gátolt a szuperoxid anion kapcsolódása a ligandumhoz. A szuperoxid bekötődését az is befolyásolja, hogy milyen gyorsan tud cserélni az



axiálisan koordinált oldószer molekulával.

Többen is foglalkoztak szalicilátot tartalmazó ligandumok Cu(II)-komplexeinek vizsgálatával<sup>35,36,37</sup>. Ezek között leghatékonyabbnak a hexakis-(N-metilimidazol) Cu(II)-szalicilát komplex bizonyult, amelyben a fémion négy nitrogéne keresztül koordinálódik<sup>37</sup>.

Mindezen megemlített modellkomplexekkel a fémionok körüli geometriát igyekeztek megvalósítani, az enzim szerkezetét és működését próbálták modellezni. Egy másik lehetséges irány az enzim aktív centrumában található fehérjelánc modellezése hisztidintartalmú oligopeptidek segítségével, illetve a két fémkötőhelyet összekötő imidazolátohid beépítése különböző komplexekbe. Ahhoz, hogy ezen vegyületek SOD-aktivitását vizsgálni tudjuk, ismernünk kell a ligandumok Cu(II)-iont tartalmazó rendszereinek oldatbeli viselkedését. Ezért mielőtt ezen modellvegyületek SOD-aktivitásáról szót ejtenék, összefoglalom az imidazolcsoport hatását az egy- illetve több hisztidint tartalmazó peptidek koordinációs kémiai sajátosságaira.

## **2.2. Az imidazolcsoport hatása a peptidek koordinációs kémiájára**

Ahogy azt a bevezetőben is említettem, a szerkezetünkben megtalálható fémionok legerősebben a fehérjék oldalláncában található donoratomokhoz kötődnek. Ilyen oldalláncbeli donoratom lehet az imidazolnitrogén (His), tiokén (Cys), karboxilátóigén (Asp, Glu) és a tioéterkén (Met). Mindezen donorcsoportok viselkedését már kiterjedten vizsgálták az elmúlt évtizedek alatt. Mivel a Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzim aktív centrumában is a fémionok elsősorban a hisztidin imidazolnitrogénjéhez kötődnek, munkánk szempontjából kiemelt jelentőséggel bír ezen donorcsoport hatása a peptidek komplexképző sajátosságaira.

### **2.2.1. Hisztidintartalmú peptidek komplexkémiája**

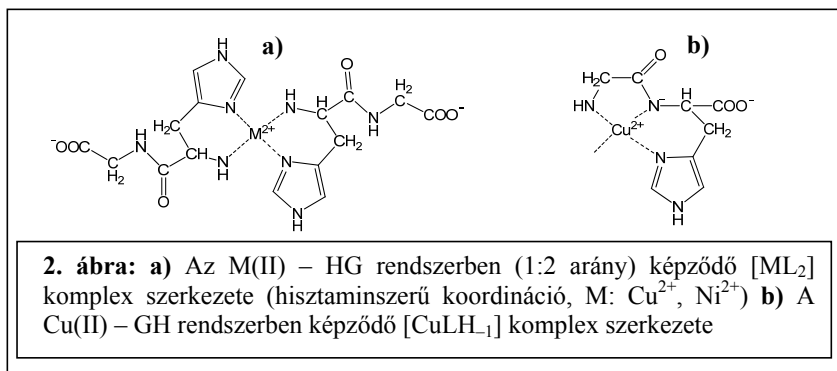
A metalloproteinekben a hisztidin aminosav meghatározó szerepet játszik a fémion koordinálódása szempontjából. A kialakuló komplexek koordinációs viszonyait nagymértékben befolyásolja a hisztidinek száma, pozíciója és több hisztidin aminosav esetén azok egymáshoz viszonyított elhelyezkedése a peptidláncban. Ezen tényezők mellett a fémkomplexek összetétele függ a mérések során alkalmazott fémion/ligandum aránytól valamint attól, hogy a ligandum N- vagy C-terminális vége tartalmaz-e védőcsoportot. A különböző hisztidintartalmú peptidek komplexképződési folyamatait réz(II)- illetve

nikkel(II)ionok jelenlétében két részre bontva tárgyalom, attól függően, hogy az aminosavláncban hány hisztidin foglal helyet.

### 2.2.1.1. Egy hisztidint tartalmazó peptidok komplexképző sajátosságai

Számos olyan közleményt találunk az irodalomban, amelyekben egy hisztidint tartalmazó peptidok komplexeinek vizsgálatáról számolnak be, valamint rendelkezésünkre állnak összefoglaló jellegű művek is<sup>38,39,40,41</sup>.

Az N-terminális részen hisztidint tartalmazó di- és oligopeptidok esetében mind a Cu(II)- mind a Ni(II)-ionok hisztaminszerű koordinációval kötődnek a peptidhez (2.a) ábra).

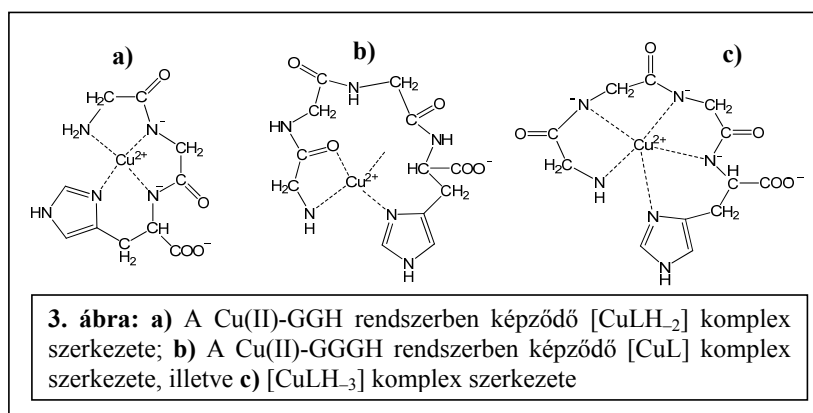


Ez a koordinációs mód olyan stabilis, hogy a kialakuló 6-tagú kelát a nikkell(II)komplexek esetében képes megakadályozni az amidnitrogének deprotonálódását. Így a HG, HM<sup>42</sup> és HGG<sup>43</sup> ligandumok esetében [NiL] és [NiL<sub>2</sub>] komplexek képződnek. Réz(II)komplexek esetében a kialakuló kelát visszaszorítja az amidnitrogének deprotonálódását, de nem tudja megakadályozni azt. Az első amidnitrogén deprotonálódása 6-os pH felett játszódik le, ami közel egy egységgel nagyobb pH értéket jelent annál, mint amit az oligoglicinek esetében meghatároztak. Ligandumfelesleg mellett [CuL<sub>2</sub>] komplex képződik. Egy, a közelmúltban elvégzett szisztematikus vizsgálat során (melynek keretében különböző HXX szekvenciát tartalmazó peptidok Cu(II)-komplexeit vizsgálták, ahol X= G vagy A volt) azt állapították meg, hogy a két kapcsolódó ligandum között nemkovalens vagy szterikus kölcsönhatás van. Ez magyarázza a CD spektrumokban megjelenő szokatlanul nagy  $\Delta\epsilon_{\max}$  értékeket<sup>44</sup>.

Az aminosavláncban második helyen hisztidint tartalmazó peptidok esetében lehetőség nyílik arra, hogy 5,6-tagú kelátrendszer alakuljon ki az amino-, imidazol- és deprotonálódott amidnitrogén koordinálódásával (2.b)

ábra). Ezen peptidek legegyszerűbb képviselője a GH, amelynek esetében már 4-es pH-n kimutatták a  $[\text{CuLH}_1]$  részecskét, amely 10-es pH-ig a legfontosabb komplex a rendszerben<sup>45</sup>. A Cu(II)-ion körüli négy ekvatoriális koordinációs helyből csak hármat foglalnak el a donatoratomok, így a negyedik helyet egy további GH molekula vagy egy másik ligandum is elfoglalhatja. Ugyanilyen koordinációjú, nagy stabilitással rendelkező  $[\text{CuLH}_1]$  részecskét mutattak ki több, a hisztidint második helyen tartalmazó peptid esetében is: AH, AHA<sup>46</sup>, GHG<sup>46,47</sup>, GHK<sup>48</sup>, GHa<sup>49</sup>, AHa<sup>50</sup>. A Ni(II)-iont tartalmazó rendszerek hasonlóan viselkednek a Cu(II)-iont tartalmazó rendszerekhez, de a nikkel(II)ion kisebb mértékben képes elősegíteni az amidnitrogén deprotonálódását, így az nagyobb pH-n megy végbe (pH 6-7, míg a réz(II) esetében pH 4).

Azok a peptidek, amelyek a harmadik helyen tartalmazznak hisztidint az XXH illetve XXHX általános képlettel jellemezhetők. Ezen peptidek komplexképző sajátságait is kiterjedten tanulmányozták<sup>47,51,52,53,54</sup>, ugyanis ez az N-terminális aminosav-szekvencia jelenik meg a humán szérum albumin esetében is. Az albumin a vérplazmában legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje, feladata különböző kismolekulák és ionok szállítása. A szervezetben található réz(II)- és nikkel(II)ion is főleg az albuminhoz kötve fordul elő. Az XXH szekvenciával rendelkező peptidek emellett még számos élettani szempontból fontos helyen megjelennek; például a SPARC (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cystein) peptidfragmensében<sup>55</sup>, valamint képesek a DNS-lánc szekvenciáinak felismerésére és a hibás DNS-lánc kivágására<sup>56</sup>. A számos vizsgált ligandum közül a legegyszerűbb a GGH, amely mind Cu(II)- mind Ni(II)-ionok jelenlétében nagy stabilitású  $[\text{CuLH}_2]$  komplexet képez, amely már pH 4-5 között megjelenik. A komplexben a fémionok négy nitrogéne keresztül,  $[\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  típusú koordinációs móddal kötődnek (3. a) ábra).



Az amidnitrogének deprotonálódása kooperatív módon megy végbe, melynek eredményeképpen 5,5,6-tagú csatolt kelátrendszer jön létre. Ez magyarázza a komplex kiugró stabilitását. Ugyanilyen összetételű komplex alakul ki a Cu(II)-GGH-*N*-metilamid<sup>54</sup> és a Cu(II)-GGHa<sup>52</sup> rendszerben is.

Ugyanezen ligandumok Ni(II)-ionot tartalmazó rendszereiben a csatolt kelátrendszer kialakulása együtt jár egy térbeli szerkezetváltással is; az oktaéderes paramágneses komplexből síknégyzetes diamágneses komplex képződik. Emellett az amidnitrogének deprotonálódása nagyobb pH-n megy végbe a Cu(II)-komplexekhez képest.

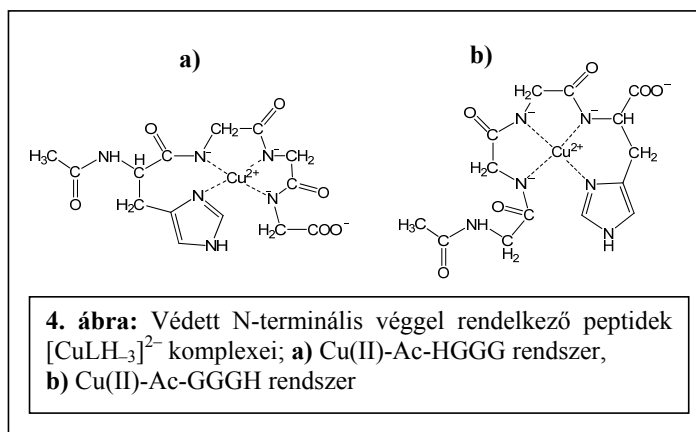
Abban az esetben, ha a hisztidin az N-terminális végtől számítva a negyedik, vagy annál távolabbi pozícióban foglal helyet, az imidazolnitrogén és az N-terminális aminos csoport két- vagy több aminosav távolságba kerülnek egymástól. Így már nincs meg a lehetőség a csatolt kelátrendszer egyidejű kialakulására, de a komplexképződés összetett képet mutat. A savas pH-tartományban a makrokelát szerkezetű komplexek az uralkodó részecskék (3. b) ábra), melyekben a terminális aminos csoport és az imidazolnitrogén koordinálódik, valamint az aminos csoporttal kelátképző helyzetben lévő karboniloxigén is kötődhet<sup>57</sup>. A makrokelát stabilitása a gyűrű méretének növekedésével csökken. A pH növelésével kimutatták az amidnitrogének lépcsőzetes deprotonálódását mind a nikkell-<sup>58</sup>, mind a rézkomplexek esetében<sup>57,59</sup>; ennek eredményeképpen [MLH<sub>1</sub>], [MLH<sub>2</sub>] és [MLH<sub>3</sub>] komplexek (3. c) ábra) képződnek. A deprotonálódás irányát illetően azonban kétféle nézetet is találunk az irodalomban. Egyes közlemények arról számolnak be, hogy a hisztidin előtti amidnitrogén deprotonálódik, azaz a deprotonálódás a peptid N-terminális vége felé halad, míg mások azt írják, hogy az aminonitrogént követő amidnitrogének a C-terminus irányába haladva deprotonálódnak. Több kutatócsoportban is azt találták<sup>57,59,41</sup>, hogy kisebb peptidek (penta-, hexapeptidek) esetében az [NH<sub>2</sub>, 3N<sup>-</sup>] koordinációs mód alakul ki, nagyobb peptidmolekuláknál pedig a [N(Im), 3N<sup>-</sup>]<sup>41</sup>.

Mindezen ismertetett koordinációs módok és komplexszerkezetek olyan peptidek fémionot tartalmazó rendszereiben jöttek létre, amelyek szabad N- illetve C-terminális véggel rendelkeztek. Abban az esetben, ha védőcsoportot helyezünk el egy peptid valamelyik vagy mindkét végén, átalakulnak az oldatbeli viszonyok; az aminos csoport blokkolásával az imidazolnitrogén horgonydonorként viselkedhet, a fémionhoz koordinálódva elősegítheti az amidnitrogén deprotonálódását.

Ezen hisztidint tartalmazó vegyületek vizsgálatát azokkal a peptidekkel kezdték, amelyek az N-terminális végén védőcsoportot tartalmaztak. Először az Ac-GH, az Ac-GGH, az Ac-GGGH és az Ac-GHG ligandumok

réz(II)komplexei esetében végezték el a vizsgálatokat<sup>60,61</sup>. Azt tapasztalták, hogy a komplexképződés a C-terminális imidazolcsoport koordinációjával indul, amit nagyobb pH-n az amidnitrogének lépcsőzetes deprotonálódása követ. Kutatócsoportunkban az N-terminális végen Z (benzil-oxi-karbonil) védőcsoportot tartalmazó ligandumok (Z-H, Z-HG, Z-GH, Z-GGH) komplexképződési folyamatait vizsgálták Cu(II)-ionok jelenlétében<sup>62</sup>. Hasonló megállapításokat tettek, mint amit korábban az acetilezett származékoknál tapasztaltak.

Szintén elvégeztek egy szisztematikus vizsgálatot N-acetilezett tetrapeptidek esetében, melyek különböző pozícióban tartalmazták a hisztidint a peptidláncban<sup>63</sup>. A munka során Ac-HGGG, Ac-GHGG, Ac-GGHG és az Ac-GGGH peptidek Cu(II)-komplexeit vizsgálták; valamennyi ligandum esetében a komplexképződés savas pH-n indul az imidazolnitrogén koordinálódásával, a pH emelésével az amidnitrogének deprotonálódása és koordinálódása játszódik le. Megfigyelték, hogy az N-terminális végtől számított első pozícióban hisztidint tartalmazó tetrapeptid esetében a peptidnitrogének rendhagyó módon a C-terminus irányába haladva deprotonálódnak. A másik három ligandum esetében a deprotonálódás az acetilezett N-terminus irányába halad (4. ábra). A kialakuló komplexekben csatolt kelátrendszer jön létre.

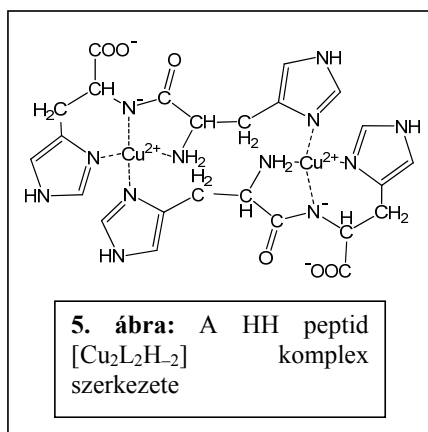


A csirke prionfehérje modellezésére előállított hexapeptid (Ac-HNPGYP-NH<sub>2</sub>) szintén az acetilezett N-terminális részen tartalmaz egy hisztidint. Ezen ligandum komplexképző sajátosságait Stanczak és munkatársai vizsgálták<sup>64</sup>. Azt találták 1:1 fémion-ligandum arány alkalmazásánál, hogy a már 4-es pH-n megjelenő, és 6-os pH-n uralkodó CuLH részecskében monodentát Cu<sup>2+</sup> - imidazol koordináció alakul ki. Ezt a koordinációs módot alátámasztották az ESR mérések során kapott paraméterek is. Kis mennyiségben a CuL komplex is megjelenik, de a 7-9 pH-tartományban már a

$\text{CuLH}_1$  komplex az uralkodó, amelyben a fémion tridentát módon kötődik a ligandumhoz a  $[\text{N}(\text{Im}), \text{N}^-, \text{O}^-(\text{Tyr})]$  donoratomokon keresztül. A prolin aminosav védőhatásának köszönhetően nem a második peptidnitrogén deprotonálódik, hanem a tirozin fenolát csoportja. 11-es pH felett egy újabb amidnitrogén deprotonálódik, és kialakul a  $\text{CuLH}_2$  komplex.

### 2.2.1.2. Több hisztidint tartalmazó peptidok komplexképző sajátosságai

A több hisztidint tartalmazó peptidok legegyszerűbb képviselője a HH, amelynek  $\text{Cu}(\text{II})$ -iont tartalmazó oldataiban háromféle koordinációs mód alakulhat ki a pH függvényében<sup>65</sup>. Savas pH-tartományban, 4-es pH-értéken a  $\text{CuLH}$  komplex jelenik meg, melyben a fémion a peptid N-terminális végén koordinálódik az amino- és egy imidazolnitrogénon keresztül. pH 5-6 tartományban a fémion körüli koordinációs szférában átrendeződés figyelhető meg, a kialakuló  $\text{CuL}$  komplex szerkezete analógiát mutat a GH peptid  $\text{CuLH}_1$  komplexével, amelyben a fémion  $[\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  típusú koordinációval kapcsolódik a peptidhez. 7-es pH felett egy dimer komplex  $\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_2$  van jelen az oldatban (5. ábra), amelyben mindkét fémion körül azonos koordinációs környezet alakul ki.



Hasonló koordinációs módot tartalmazó komplexek jelennek meg a  $\text{Cu}(\text{II})$ -HVH rendszerben<sup>66</sup>, ahol a két hisztidin közé egy aminosavat építettek be. Myari és munkatársai vizsgálták ezt a rendszert és azt találták, hogy a savas pH-tartományban  $[\text{CuLH}]^{2+}$  és  $[\text{CuL}]^+$  komplexek képződnek hisztaminszerű koordinációval. A makrokelátot tartalmazó szerkezet a komplex síknégyszetes geometriájának torzulását eredményezi, valamint gátolja a biszkomplexek képződését és az amidnitrogén deprotonálódását. Ezen folyamatok a nagyobb pH-tartomány felé tolódnak, de itt is kialakul a  $[\text{CuLH}_2]^-$  komplex már a fiziológiás pH-tartományban, amelyben  $[\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  koordináció jelenik meg.

A HH peptidláncának meghosszabbításával kapott tetrapeptid esetében (HHGG) nem változnak meg a peptid komplexképző sajátosságai<sup>67</sup>. Azonos körülmények között azonban a HHGG tetrapeptid  $\text{Cu}(\text{II})$ -ionnal alkotott komplexében a fémion a GGH peptidre is jellemző donoratomokon keresztül koordinálódik.

Ezzel szemben az N-terminális részen glicint tartalmazó tetrapeptid (GHGH) oldategyensúlyi viselkedése bonyolultabb képet mutat<sup>68</sup>. pH 4-5 tartományban CuL komplex alakul ki, amelyet tetragonális, GH-szerű geometria jellemez. 6-os pH-értéken egy szerkezeti átrendeződés figyelhető meg, az imidazolnitrogén axiális kötődésével négyzetes piramisos komplexszerkezet jön létre. Ezt a folyamatot egy további átrendeződés követi pH 7 körül, amelynek eredményeképpen torzult trigonális bipiramisos szerkezetű CuLH<sub>2</sub> komplex képződik. A komplex ekvatoriális síkjában található az aminonitrogén és két deprotonálódott amidnitrogén; a két imidazolnitrogén az axiális kötőhelyeket foglalja el.

A glicin és hisztidin aminosavakat alternáló pozícióban tartalmazó oktapeptid, a GHGHGHGH négy imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik a Cu(II)-ionhoz 5-ös pH-nál, míg nagyobb pH-n a deprotonálódott amidnitrogének veszik át a donoratomok szerepét<sup>69</sup>. Hasonló viselkedést tapasztaltak a polihisztidin esetén is, amelynek oldatában a semleges pH-tartományban imidazol- és amidnitrogéneken keresztül koordinálódik a Cu(II)-ion<sup>70</sup>. A Ni(II)-GHGHGHGH rendszerben is hasonló komplexek alakulnak ki<sup>69</sup>, CD spektroszkópiás vizsgálatok alapján azt állapították meg, hogy a réz(II)ionokhoz viszonyítva a nikkell(II)ionok kevésbé segítik elő az amidnitrogének deprotonálódását, és merev síknégyzetes fémkomplexet képeznek.

Mindezen eredmények azt mutatják, hogy hisztidin jelenlétében a fémion elsősorban az imidazolnitrogénekhez koordinálódik. Ezen donoratomok horgonyként viselkednek, csakúgy mint az N-terminális részen szabadon található aminocsoport. A kialakuló komplexek azonban nem elég stabilisak ahhoz, hogy megakadályozzák az amidnitrogének deprotonálódását, így a lúgos pH-tartományban a fémion körüli koordinációs környezet átrendeződése figyelhető meg. Az így kialakuló komplexekben a fémion az amino-, az imidazol- és gyakran az amidnitrogéneken keresztül koordinálódik. Sokszor használnak szabad aminocsoportot tartalmazó peptideket enzimek aktív centrumában kialakuló kötésviszonyok modellezésére. Azonban a legtöbb enzimben, így például a Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzimben is a fémion csak az imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik. Így a modellvegyületek közül kutatómunkánk célkitűzéseit figyelembe véve azokkal célszerű dolgozni, amelyekben az aminocsoportot és a karboxilcsoportot védőcsoporttal blokkolják. Ezekben a peptidekben a hisztidin veszi át a horgonydonor szerepét, ahogy az a természetes enzimben is gyakran előfordul.

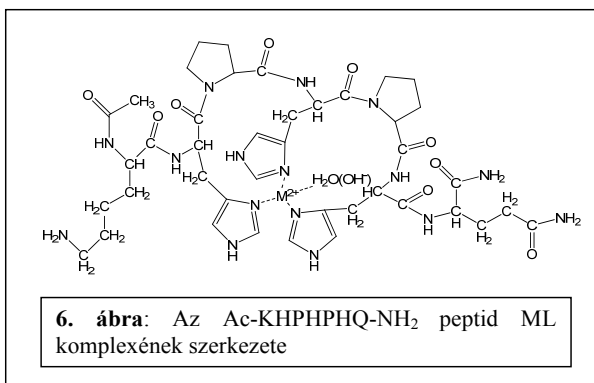
A prion protein, amelynek megváltozott konformációja okoz bizonyos neurodegeneratív betegségeket, modellezésére is több hisztidint tartalmazó

peptideket szintetizáltak. Oktarepeat tartományában egy nyolc aminosavból álló egység (PHGGGWGQ) ismétlődik négyszer. Ez a peptidlánc felelős négy  $\text{Cu}^{2+}$ -ion megkötéséért, és pH 7,4-es értéken a fémion az imidazol és két amidnitrogéneken keresztül koordinálódik<sup>71,72,73,74</sup>. Ezen egység modellezése az Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> ligandummal valósult meg. Savas és semleges pH-értéken a Cu(II)-ionok az imidazolnitrogéneken keresztül kötődnek, majd az amidnitrogének lépcsőzetes deprotonálódása figyelhető meg. A komplexek kialakulása a peptid szerkezeti átrendeződésével jár, amely segíti a Cu(II)-ionok egymást követő bekötődését az oktarepeat ligandumhoz.

Változatos és összetett képet mutat a különböző prolint és több hisztidint tartalmazó peptidok oldategyensúlyi viselkedése is. A prolin aminosav szerkezetéből adódóan töréspontként jelenik meg az aminosavláncban, így meg is akadályozhatja az amidnitrogének deprotonálódását. A prolin helyzete a peptidláncban befolyásolhatja a kialakuló komplexek szerkezetét<sup>75</sup>. Így például két hexapeptid esetén (Ac-HPSGHA-NH<sub>2</sub> és Ac-HGSPHA-NH<sub>2</sub>) hasonló sztöchiometriájú, de eltérő kötésviszonyokat tartalmazó komplexeket képez réz(II)ionok jelenlétében. A savas pH-tartományban két imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik a fémion, majd a pH emelésével az amidnitrogének deprotonálódnak lépcsőzetes módon. A prolint negyedik pozícióban tartalmazó peptid esetében az amidnitrogének deprotonálódása a C-terminus irányába megy végbe.

Az elmúlt években egy- illetve több prolint tartalmazó védett peptideket is vizsgáltak (Ac-HPHPH-NH<sub>2</sub>, Ac-KHPHPHQ-NH<sub>2</sub><sup>76</sup>, Ac-HHPHG-NH<sub>2</sub>, Ac-HHPHGHHHPHG-NH<sub>2</sub><sup>77</sup>), komplexképző sajátosságaikat réz(II)- és cink(II)ionok jelenlétében térképezték fel. Azt tapasztalták, hogy savas pH-tartományban az imidazolnitrogének deprotonálódása játszódott le, és pH~7 értéken makrokélatot tartalmazó komplex alakult ki. A réz(II)ionokat tartalmazó rendszerekben a pH emelésével először a koordinálódott vízmolekula deprotonálódik  $\text{CuLH}_{-1}$

komplexet képezve (6. ábra) – kivéve a Cu(II)-Ac-HPHPH-NH<sub>2</sub> rendszert, amelyben nem vízoldható, semleges komplex keletkezett. Cink(II)ionok jelenlétében 7-es pH felett csapadékkepződés volt megfigyelhető, hasonlóan más oligopeptidekhez.





Az amidnitrogének deprotonálódása csak pH ~ 9,5 felett játszódik le, az így kialakult komplexben a fémion két imidazol- és két amidnitrogé-nen keresztül koordinálódik, majd lehetőség van egy to-vábbi amidnitrogén deprotonálódására is.

Kutatócsoportunkban is számos több hisztidint tartalmazó peptid oldategyensúlyi viselkedését tanulmányozták. Vizsgáltak két hisztidint tartalmazó peptideket, amelyek a horgonycsoportként viselkedő hisztidin mellett aszparaginsavat is tartalmaztak<sup>78</sup>. Mind az Ac-HHVGDNH<sub>2</sub> mind az Ac-HVGDH-NH<sub>2</sub> peptidekre igaz az, hogy réz(II)ionok jelenlétében a komplexképződés pH 3,5 felett kezdődik meg, amikor is [CuLH]<sup>2+</sup> és [CuL]<sup>+</sup> komplexek képződnek. Ezen komplexekben a fémionok először monodentát módon egy-, majd makrokelátot kialakítva két imidazolnitrogé-nen koordinálnak. Az aszparaginsav β-karboxilát csoportja kis mértékben hozzájárul a fémion megkötéséhez. A pH növelésével egymást követő lépésekben játszódik le az amidnitrogének deprotonálódása, a kialakuló [CuLH<sub>2</sub>]<sup>-</sup> komplexben [N(Im), 2×N<sup>-</sup>, N(Im)] típusú koordináció jelenik meg, a harmadik amidnitrogén deprotonálódása eltolódik a lúgosabb pH-tartományba.

A korábban vizsgált HVH peptid védett származékának vizsgálatára is sor került. A Cu(II)-Ac-HVH-NH<sub>2</sub> rendszerben is a hisztidinnitrogének a fő fémion-kötőhelyek, amelyek horgonycsoportként viselkedhetnek<sup>79</sup>. Savas pH-tartományban az imidazolnitrogének koordinálódásával [CuL]<sup>2+</sup> komplex képződik, amelyben ugyan kialakul a makrokelátot tartalmazó szerkezet, de végbemegy az amidnitrogének deprotonálódása már a fiziológiás pH-tartományban és [CuLH<sub>2</sub>] komplex képződik [N(Im), N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] koordinációval.

A nagyobb méretű valint a kisebb méretű glicinre cserélték annak reményében, hogy a kialakuló makrokelát szélesebb pH-tartományban lesz stabilis. Az így előállított ligandumok között találjuk az Ac-HGH-OH tripeptidet és ennek C-terminális részén is védőcsoportot tartalmazó származékát (Ac-HGH-NHMe), valamint az Ac-HHGH-OH tetrapeptidet és védett párját (Ac-HHGH-NHMe)<sup>80</sup>. Ezen ligandumok komplexképző sajátságait is réz(II)ionok jelenlétében vizsgálták. Mind a tri-, mind a tetrapeptidek esetében imidazolnitrogé-nen keresztül koordinálódik a fémion. Amennyiben jelen van a szabad karboxilcsoport, úgy annak deprotonálódott formája is koordinálni fog, amely együtt jár a kialakuló komplex stabilitásának növekedésével. A pH emelésével az amidnitrogének lépcsőzetes deprotonálódása játszódik le, és az imidazolnitrogének helyét az amidnitrogének veszik át a fémion koordinációs szférájában.

Jellemezték olyan peptideket is, amelyekben a hisztidineket két aminosav választotta el egymástól<sup>81</sup>. Az Ac-HVVH-NH<sub>2</sub> tetrapeptid és az Ac-HAAHVVH-NH<sub>2</sub> heptapeptid esetében is a legnagyobb stabilitású komplexek Cu(II)-ionok jelenlétében képződtek. Mindkét peptid képes stabilis imidazolnitrogén koordinációt tartalmazó makrokelát kialakítására réz(II)-illetve nikkell(II)ionok jelenlétében. Az így kialakuló komplexek jelentős stabilitással rendelkeznek, mégis kevésbé stabilisak, mint a hisztidineket alternáló pozíciókban tartalmazó ligandumok hasonló szerkezetű komplexei. Azt is megállapították, hogy ezen peptidek esetében is végbemegy az amidnitrogén deprotonálódása, és az uralkodó részecske az [MLH<sub>3</sub>]<sup>-</sup> komplex lesz, amelyben [N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] típusú koordináció valósul meg.

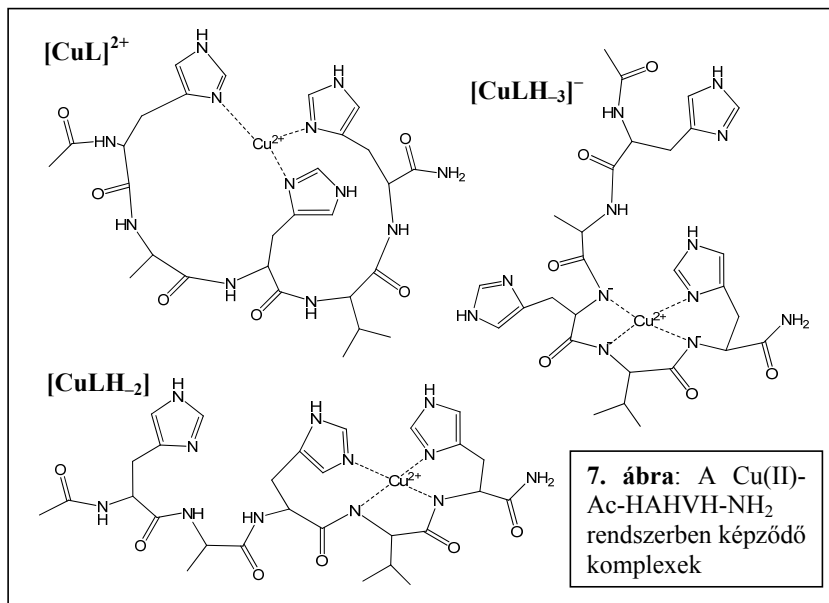
Mindezen vizsgálati eredmények rámutattak arra, hogy stabilisabb komplexek keletkeznek akkor, ha a hisztidinek egymástól egy aminosav távolságra helyezkednek el. Így került sor a HXHYH szekvenciájú pentapeptidek szintézisére. Ezen ligandumok Cu(II)-ionok jelenlétében való viselkedését pH-potenciometriás, UV-VIS, CD és ESR spektroszkópiás módszerekkel tanulmányozták<sup>82</sup>. A ligandumok Cu(II)-iont tartalmazó oldataiban is a három oldalláncbeli hisztidin jelenléte lehetővé teszi makrokelátok kialakulását; ez a koordináció [CuL]<sup>2+</sup> komplex kialakulásához vezet (7. ábra).

A makrokelátok képződése visszaszorítja ugyan az amidnitrogén deprotonálódását, de teljes mértékben nem tudja megakadályozni azt. Ennek következtében a fiziológiás pH-tartományban mind ekvimoláris, mind pedig fémionfelesleget tartalmazó oldatokban a [CuLH<sub>2</sub>] összetételű komplex dominál, amelyben a réz(II)ionok két imidazol- és két amidnitrogénnel keresztül kötődnek (7. ábra). Mind az egyensúlyi vizsgálatok, mind a CD spektrumok alátámasztották koordinációs izomerek kialakulását az oldatban, és a C-terminális részen való kötődés kedvezményezettebbnek bizonyult. Nagyobb pH-n (pH>10) egy harmadik amidnitrogén is deprotonálódhat, és ez [N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] típusú koordinációval a [CuLH<sub>3</sub>]<sup>-</sup> komplex képződését eredményezheti (7. ábra). Fémionfelesleget tartalmazó oldatokban kétmagvú komplexek kialakulására is van lehetőség.

Mivel az előbb bemutatott HXHYH szekvenciát tartalmazó ligandumok esetében már fiziológiás pH-n lejátszódik az amidnitrogén deprotonálódása, a hisztidineket összekötő aminosavakat egy újabb kísérletsorozat során szarkozinra cserélték<sup>83</sup>.

Az így szintetizált ligandumok az Ac-(His-Sar)<sub>n</sub>-His-NH<sub>2</sub> általános képlettel jellemezhetők, ahol n = 1,2,3. Ezen ligandumok esetében gátolt az amidnitrogén deprotonálódása, így azt várták, hogy a réz(II)ionok

jelenlétében kialakuló makrokelát szélesebb pH-tartományban marad stabilis. A kisebb tagszámú peptideknél is stabilis a  $[\text{CuL}]^{2+}$  komplex, a három szarkozint tartalmazó heptapeptid esetében viszont még nagyobb stabilitást mutat; 6-os pH felett uralkodó részecskének számít az oldatban. Ezen komplexben a fémion négy imidazolnitrogénen keresztül koordinálódik, így a Cu(II)-ion körül kialakul egy olyan koordinációs környezet, ami jellemző a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumára is.



A cikkben bemutatott összehasonlító elemzések arra is rávilágítottak, hogy a makrokelát szerkezetet tartalmazó komplexek termodinamikai stabilitása függ a peptidláncban helyet foglal hisztidinek számától, egymáshoz viszonyított helyzetétől és pozíciójától. A legnagyobb stabilitású komplexek a HXHYH szekvenciát tartalmazó peptidek esetében képződnek.

## 2.2.2. Bisz(imidazol-2-il) csoportot tartalmazó ligandumok komplexkémiája

A metalloenzimekben a fémionok legtöbbször több imidazolnitrogénen keresztül koordinálódnak, gyakran két vagy több imidazolcsoportot tartalmazó ligandumokat használnak modellezésre. Az egyik legegyszerűbb poliimidazol ligandum a bisz(imidazol-2-il)metán (BIM), amely egyben nagyon jó kelátképző ligandum is. A BIM ligandum amino- és karboxilát származékait nevezetesen a bisz(imidazol-2-il)-metil-amint (BIMA) és a 3-[bisz(imidazol-2-il)]-propionsavat

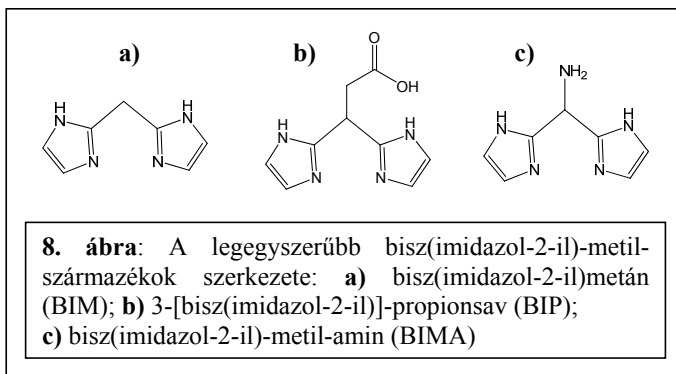
(BIP) (8. ábra) amidkötések segítségével könnyen lehet aminosavakhoz és peptidokhoz kapcsolni.

Az alapvegyületek és az így kapott bisz(imidazol-2-il) származékok réz(II)-

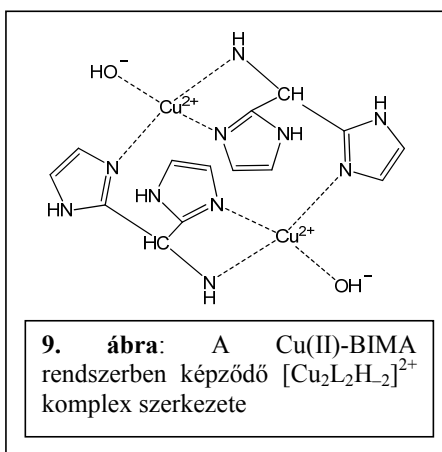
valamint nikkell(II)- és cink(II)komplexeit kutatócsoportunkban az elmúlt évek alatt igen részletesen vizsgálták<sup>84,85,86,87,88,89,90</sup>.

A különböző bisz(imidazol-2-il) származékok esetében az imidazolnitrogének kisebb pH-értéken deprotonálódnak, mint a szabad imidazol<sup>88</sup>. A három alapvegyület (BIM, BIMA, BIP) közül a BIMA esetében csökken le legnagyobb mértékben a nitrogénatomok bázicitása.

Mind réz(II)-, mind nikkell(II)ionok jelenlétében azt találták, hogy BIM ligandummal főleg  $[ML]^{2+}$  és  $[ML_2]^{2+}$  komplexeket képeznek. Ezekben a komplexekben a fémionok 2 illetve 4 nitrogéndonoratomon keresztül koordinálódnak. A BIMA és a BIP esetében is hasonló koordinációs viszonyok jelennek meg, erősen savas pH-tartományban a BIM-hez hasonlóan 2N és 4N koordinációjú komplexek alakulnak ki. A BIP karboxilcsoportja lehetővé teszi egyéb protonált komplexek képződését is  $[MLH]^{3+}$ ,  $[ML_2H_2]^{4+}$  és  $[ML_2H]^{3+}$  összetétellel. Nikkell(II)- és cink(II)ionok jelenlétében a komplexképződés eltolódik a nagyobb pH-tartományba, mivel a fémkomplexek termodinamikai stabilitása kisebb. Így Ni(II)-ion jelenlétében kisebb a protonált komplexek koncentrációja, a Zn(II)-iont tartalmazó rendszerekben pedig nem is jelennek meg.



A BIMA komplexképződési folyamatai már bonyolultabb képet mutatnak, mint ami a BIM vagy a BIP ligandumra jellemző. Ez köszönhető az aminocsoport jelenlétének, ami befolyásoló szereppel bír. Közel 4-es pH-értékig az imidazolnitrogén atomok az elsődleges fémkötőhelyek, de az ammóniumcsoport, deprotonálódását követően, szintén képes a fémionok megkötésére. 7-es pH körül a monokomplexek koordinációs viszonyainak átrendeződésével egy



kétmagvú  $[Cu_2L_2H_2]^{2+}$  összetételű komplex képződik, melyben az ekvatoriális kötőhelyeket az amino-, egy imidazolnitrogén, egy hidroxidion és a híd szerepét betöltő másik ligandum imidazolnitrogénje foglalja el (9. ábra). Mivel a BIMA erősebb fémmegkötőként viselkedik, mint a BIM vagy a BIP, a Ni(II)-BIMA és a Zn(II)-BIMA rendszerben is képződnek protonált komplexek. Ezeknél a fémionoknál nem alakulnak ki dimerkomplexek, de a ligandum tridentát koordinációja az oktaédes komplexekben feltételezhető.

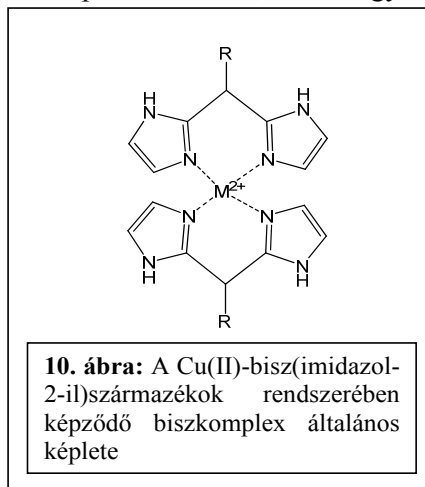
### 2.2.2.1. Bisz(imidazol-2-il) csoportot tartalmazó aminosav- és peptidszármazékok komplexképző sajátosságai

A különböző bisz(imidazol-2-il) származékok tárgyalása során segítségünkre lehet, ha a ligandumokat valamilyen szempont szerint csoportosítjuk. Mivel a komplexképződést nagymértékben befolyásolja mind a terminális aminocsoport, mind a koordinálódó oldallánc jelenléte, így az alábbi négy nagyobb kategóriába sorolhatjuk a vizsgált származékokat:

- N- és C-terminálisan védett tripeptidek nemkoordinálódó oldalláncokkal, például: Ac-ProLeuGly-BIMA, BIP-IleAlaGly-OEt,
- N- és C-terminálisan védett tripeptidek, amelyek különböző pozíciókban tartalmaznak hisztidint, például: BOC-ProLeuHis-BIMA, BOC-ProHisGly-BIMA, BOC-HisLeuGly-BIMA,
- a BIMA ligandum aminosav származékai, melyek szabad aminocsoportot tartalmaznak, például: Gly-BIMA, Phe-BIMA, His-BIMA,
- a BIMA ligandum dipeptid származékai, melyek szabad aminocsoportot tartalmaznak, például: LeuGly-BIMA, Phe-GlyBIMA.

Valamennyi származékra igaz, hogy a bisz(imidazol-2-il) csoport nitrogén donoratomjai a savas pH-tartományban deprotonálódnak, és egyéb protonálódásra képes csoportok jelenléte csökkenti a bázicitásukat.

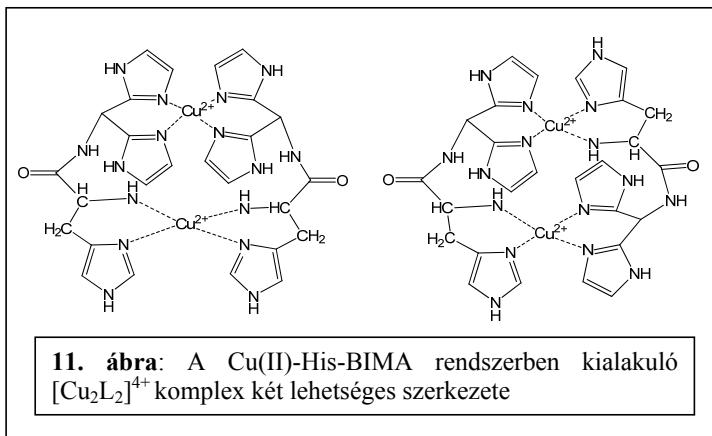
A ligandumok réz(II)komplexeinek vizsgálata során megállapították, hogy az elsődleges fémkötőhelynek a ligandumok bisz(imidazol-2-il) csoportjai számítanak. A komplexképződés erősen savas pH-n kezdődik el, amikor 6-tagú kelátgyűrűket tartalmazó stabilis mono- és biszkomplexelek képződnek. Az elvégzett ESR mérések is bebizonyították, hogy a fémion négy ekvivalens nitrogénhez koordinálódik<sup>84</sup>. Ezt a koordinációs módot mutatja be általánosságban a 10. ábra.



A terminálisan védett hisztidintartalmú tripeptidekben tridentát koordináció alakul ki, ami megnöveli a [CuL] komplex termodinamikai stabilitását. Ez a koordinációs mód kedvezményezettebb akkor, ha a kelátképző csoport az N-terminális részen található. Abban az esetben, ha a kelátképző csoport a C-terminális részen található, a lépcsőzetes stabilitási állandók aránya annak függvényében növekszik, ahogy a távolság is nő a kelátképző és a monodentát oldalláncok között. Szintén ezen távolság növekedésével párhuzamosan növekszik az oldalláncban található hisztidin axiális koordinációjának mértéke is. Összességében elmondható, hogy valamennyi pH-értéken a bisz(imidazol-2-il) egységek az elsődleges fémkötőhelyek, de az oldalláncbéli funkciócsoportok megnövelhetik ezen ligandumok fémmegkötő képességét ekvatoriális vagy axiális koordinációval.

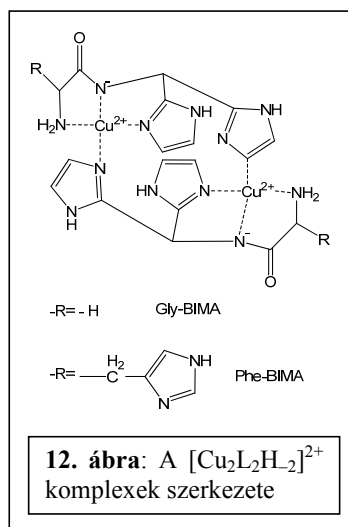
Abban az esetben, ha nem védjük a terminális aminocsoportot, a komplexképződési folyamatok sokkal bonyolultabb képet mutatnak. A Cu(II)-Gly-BIMA, a Cu(II)-LeuGly-BIMA és Cu(II)-His-BIMA rendszerekre is igaz az, hogy a nemkoordinálódó ammóniumcsoport deprotonálódása kétmagvú komplexek kialakulásához vezet az enyhén savas pH-tartományban. Mind a His-BIMA, mind a dipeptid-BIMA ligandumok két elkülönült, kelátképző donorcsoportot tartalmaznak: a bisz(imidazol-2-il)csoportot és az [NH<sub>2</sub>, N(Im)] vagy az [NH<sub>2</sub>, CO] csoportot. Térbeli okok miatt nem lehetséges az, hogy ezek a donorcsoportok ugyanahhoz a fémionhoz koordinálódjanak egymagvú komplex formájában, de minden esetben lehetőség van ligandumhidas dimerek kialakulására. Ezen dimer szerkezet megvalósulhat kétféle izomer formájában

is: a donorcsoportok szimmetrikus vagy aszimmetriku elrendeződésében. A kétféle izomert a His-BIMA  $[\text{Cu}_2\text{L}_2]^{4+}$  komplexe esetében az 11. ábra szemlélteti.



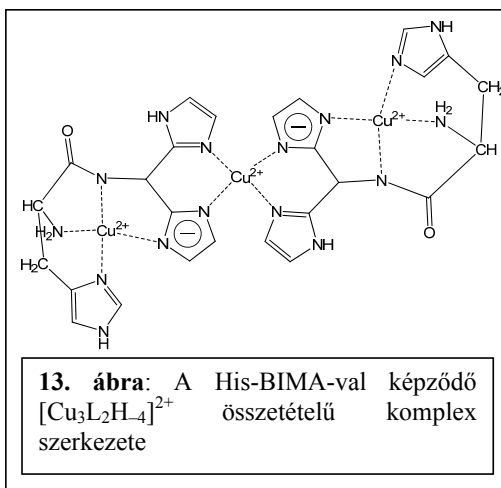
Korábbi kutatási eredmények<sup>91</sup> is megerősítik, hogy jellemzőbb a szimmetrikus szerkezet kialakulása.

A pH növelésével egy másik kétmagvú komplex keletkezik, amely  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_2]$  sztöchiometriával jellemezhető. Az elvégzett spektroszkópai vizsgálatok alapján arra a megállapításra jutottak, hogy az extra lúgfogyasztó folyamat oka a molekula amidcsoportjának deprotonálódása és koordinálódása. A Cu(II)-dipeptidszármazék rendszerekben a korábbi  $[\text{NH}_2, \text{CO}]$  kelát helyett az  $[\text{NH}_2, \text{N}^-]$  kelát alakul ki, de nem bomlik fel a ligandumhidás szerkezet. A Cu(II)-aminosav származékokban tridentát típusú  $[\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  koordináció figyelhető meg (12. ábra).



Valamennyi ligandum réz(II)ionokat tartalmazó rendszereire igaz az, hogy 7-es pH felett egy vagy két extra lúgfogyasztó folyamat jelenik meg. Abban azonban különbség van, hogy az egyes ligandumok oldataiban milyen részecskék alakulnak ki. A Cu(II)-Gly-BIMA rendszerben például a  $[\text{CuLH}_2]$  komplex deprotonálódása és képződése hidroxokomplex képződésével magyarázható, amit a fémhidroxid leválása követ nagy pH-értékeken. A Cu(II)-His-BIMA rendszerben viszont az ESR vizsgálatok egyértelműen igazolták dimer komplexek létezését. A mérések

eredményei alapján az is megállapítható, hogy a koordinálódott imidazol N(1)H csoportja deprotonálódik, aminek eredménye-képpen negatív töltésű imidazolátó csoport alakul ki. A dimer komplex kiemelkedő termodinamikai stabilitásához a töltésneutralizációs folyamatok is hozzájárulhatnak. Fémionfelesleget tartalmazó oldatokban többmagvú komplexek kialakulását is megfigyelték, amelyekben szintén imidazolátóhidias szerkezet alakul ki (13. ábra). Bár elméletileg lenne lehetőség hasonló komplex kialakulására mind a Cu(II)-Gly-BIMA, mind a Cu(II)-Phe-BIMA rendszerben is, de ezekben az esetekben a ligandumok nem képesek elég erősen megkötni a fémionokat. A His-BIMA esetében az oldalláncbeli imidazolcsoportok axiális kölcsönhatása növeli meg a ligandum fémkötő képességét.



A dipeptid-BIMA származékok esetében a két amidcsoport csatolt kelátgyűrűk kialakítására képes a terminális amino és a bisz(imidazol-2-il) csoport nitrogénatomjaival. Így 7-es pH felett egyszármagvú  $[CuLH_2]$  komplex képződik, amely 8-10-es pH-tartományban van jelen, és benne a fémion  $[NH_2, N^-, N^-, N(Im)]$  típusú koordinációval kötődik. 10-es pH felett a megjelenő újabb lúgfogyasztó folyamat a koordinálódott imidazol pirrol típusú nitrogénjének deprotonálódásával értelmezhető, amely azonban nem befolyásolja a fémion körül kialakult koordinációs környezetet. Mivel a dipeptid származékok több fémion megkötésére is képesek, fémionfelesleget tartalmazó oldatokban többmagvú komplexek kialakulása is lehetséges a lúgos pH-tartományban. A képződő komplexek között többféle részecskét találunk, amelyek közül egyet emelnék ki, a 3:2 fémion/ligandum aránynál képződő hárommagvú komplexet, amelyben mindhárom fémiont 4N donortatomok kötik. A LeuGly-BIMA ligandum esetében ezen hárommagvú komplex képződését MALDI-MS mérésekkel is igazolták<sup>90</sup>.

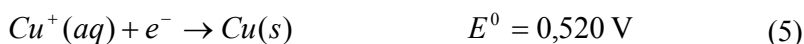
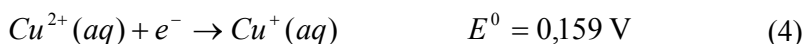
Összességében elmondhatjuk, hogy a bisz(imidazol-2-il) származékok hatékony fémmegekötőnek számítanak. A nemvédett származékokban a bisz(imidazol(-2-il) csoport mellett a terminális aminocsoport horgonycsoportként viselkedhet, ráadásul a ligandumok képesek polinukleáris komplexek kialakítására is. Ezen komplexek és a negatív töltésű



imidazolátóhidat tartalmazó komplexek is ígéretes modelljei lehetnek különböző metalloenzimnek, így például a Cu,Zn-SOD enzimnek is.

### 2.3. Réz(II)komplexek redoxi sajátosságai

A Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzim működése közben a Cu(II)-ionok oxidációs állapota megváltozik. Ahhoz, hogy az enzimet modellező komplexeket több oldalról vizsgáljuk, érdemes ismernünk az őket jellemző redoxipotenciál értékeket. Vizes közegben a Cu(II)-ionok redoxi átalakulásait az alábbi redoxipotenciál értékek jellemzik<sup>92</sup>:



Kompleképződés hatására ezek az értékek megváltoznak. Általánosságban elmondhatjuk, hogy a Cu(II)/Cu(I) rendszer redoxipotenciál értékeit jelentősen befolyásolja a rézkomplexek koordinációs módja. A réz(II)komplexek esetében általában a tetragonálisan megnyúlt, pszeudo-oktaéderes elrendeződés, míg a réz(I)komplexek esetében a lineáris, síkháromszöges vagy tetraéderes geometria célravezető. Ciklikus voltammetriás mérések során, miközben a réz(II)centrumot redukáljuk, majd oxidáljuk, egy sztereokémiai átrendeződés játszódik le az oldatban. Ennek eredményeképpen általában kvázireverzibilis redoxi folyamattal találkozunk, és a katódos valamint az anódos csúcsok szeparációja nagyobb, mint ami az egyelektronos redoxi folyamatokat általában jellemzi.

#### 2.3.1. Különböző típusú ligandumok réz(II)komplexeinek redoxi sajátosságai

Az elmúlt évek alatt számos ligandum réz(II)komplexének redoxi sajátosságait vizsgálták. A kapott eredményeket az 1. táblázatban foglaltam össze. Látható, hogy az irodalomban Cu(II)/Cu(I) redoxi átalakulásra talált adatok között a Cu(II)-orto-hidroxi Schiff bázis komplexek redoxipotenciál értékei a legnagyobb negatív értékek<sup>93</sup>. Ezen komplexek vizsgálata során dimetilformamidban végeztek méréseket, amely befolyásolhatja a kapott redoxipotenciál értékeket.

**1. táblázat:** Különböző típusú ligandumok réz(II)komplexeinek redoxipotenciál értékei

ligandumok	redoxipotenciál értékek	vonatkoztatási elektród
orto-hidroxi Schiff bázis komplexek <sup>93</sup>	-1,015 – (-0,875) V	SCE
makrociklusos ligandumok <sup>94,95,96,109</sup>	-0,850 – (-0,440) V	SCE
benzimidazol-csoporttal szubsztituált ciklononán származékok <sup>18</sup>	-0,150 – (+0,110) V	NHE
2,2'-bipiridil származékok <sup>99</sup>	+0,200 – (+0,800) V	NHE
egyszerű dipeptidok <sup>97</sup>	-0,255 – (-0,190) V	SCE
nem koordinálódó oldalláncot tartalmazó aminosavak <sup>99</sup>	-0,170 – (-0,130) V	NHE
ciklo(L-aszparatil-L-aszparatil-)bis-hisztamin <sup>20</sup>	-0,030 V	SCE
ciklo(L-glutamil-L-glutamil-)bis-hisztamin <sup>20</sup>	+0,100 V	SCE
ciklo(GH) <sub>4</sub> <sup>98</sup>	+0,195 V	NHE
ciklo(GHG) <sub>2</sub> <sup>98</sup>	+0,219 V	NHE
hisztidin <sup>99</sup>	-0,170 V	NHE
piridin <sup>99</sup>	+0,240 V	NHE
imidazol <sup>99</sup>	+0,317 V	NHE
<b>Hisztidintartalmú ligandumok</b>		
GH, GHG, GHL, GGH <sup>104,105</sup>	-0,220 – (-0,120) V	SCE
Ac-HGGG-NH <sub>2</sub> <sup>107</sup>	-0,299 – (-0,270) V	NHE
Ac-GGGTH-NH <sub>2</sub> <sup>110</sup>	+0,040 V	Ag/AgCl
Ac-(PHGGGWGQ) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> ahol n = 1,2,4 <sup>107,109</sup>	-0,530 – (-0,299) V	NHE

Abban az esetben, ha a fémiont makrociklusos ligandumok kötik<sup>94,95,96</sup>, a Schiff-bázisok réz(II)komplexeit jellemző értékekhez hasonló, illetve nagyobb redoxipotenciál érték volt mérhető. Ezen ligandumokról a legátfogóbb elemzést Miyoshi és munkatársai adták, akik olyan tetra-, penta- és hexaaza-ciklodekán származékokat vizsgáltak, amelyekben négyzetes piramisos elrendződés alakul ki a fémion körül<sup>94</sup>. A komplexek redoxi átalakulása során reverzibilis vagy kvázireverzibilis folyamatok játszódnak le. Megfigyelték, hogy a komplex geometriája is hatással van a redoxipotenciál értékekre; az alábbi sorrendben válnak egyre pozitívabbá a mért értékek: síknégyzetes < négyzetalapú piramisos < oktaédes geometria. Az ötödik koordinációs helyre axiálisan bekötődő ligandum donoratombjai szintén befolyásolják a mért értékeket, a legpozitívabb komplexek a kéndonatom, a legnegatívabbak a nitrogén-donoratom jelenlétében mérhetőek. A makrociklusozhoz szubsztitúcióval

kapcsolt benzimidazolcsoportok növelik a kialakuló Cu(II)-komplexek redukálhatóságát<sup>18</sup> (1. táblázat).

Ezen eredményekkel ellentétben pozitív redoxipotenciál értékeket határoztak meg 1,10-fenantrolin származékok és szubsztituált bipiridil vegyületek Cu(II)-komplexei esetében is<sup>99</sup>, amelyek arra utalnak, hogy a Cu(II)-ionok jelenlétében kialakuló komplexek könnyen redukálhatók.

Egyszerű, glicint tartalmazó dipeptidek (általános képlettel: GX, ahol X: glicin, szerin, fenilalanin, izoleucin, triptofán, tirozin, treonin) vizsgálata során<sup>97</sup> nagyon hasonló redoxipotenciál értékeket határoztak meg, mint amilyeneket nem koordinálódó oldalláncot tartalmazó, egyszerű aminosavak esetén is mértek<sup>99</sup>. A negatív értékek azzal magyarázhatók, hogy a terminális aminocsoport és karboxilcsoport koordinációjával nagyobb stabilitású komplexek keletkeznek.

A komplexképződés hatására a redoxipotenciál értéke növekedhet is. A korábban felsorolt ligandumok komplexeihez képest nagyobb redoxipotenciál érték jellemzi a ciklo(L-aszparatil-L-aszparatil-)bisz(hisztamin) és a ciklo(L-glutamil-L-glutamil-)bisz(hisztamin) Cu(II)-komplexeit, melyek redoxi reakciója kvázireverzibilis folyamat. Ez annak a következménye, hogy a kialakuló Cu(I)-komplexben egy szerkezeti átrendeződés figyelhető meg<sup>20</sup>. Mivel a mérések során beállított pH-tartományban egyszerre több komplex van jelen, a kapott redoxipotenciál értékeket átlagolták ezekre a részecskékre.

Szintén pozitív redoxipotenciál értékeket mértek hisztidint tartalmazó ciklopeptidek vizsgálata során<sup>98</sup>. A ciklo(Gly-His)<sub>4</sub> és a ciklo(Gly-His-Gly)<sub>2</sub> ligandumok Cu(II)-komplexei kvázireverzibilis egyelektronos redoxi átalakuláson mennek keresztül, a redukciós és az oxidációs csúcsok távolsága nagyobb, mint 0,059 V. A legnagyobb pozitív redoxipotenciál értékkel a [Cu{ciklo(Gly-His)<sub>4</sub>}]<sup>2+</sup> komplex rendelkezik, amelyben a fémion imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik. Amikor a fémion körüli donoratomok között az amidnitrogén is megtalálható, akkor kisebb értéket mértek.

Azon egyszerű ligandumok Cu(II)-komplexeiben, amelyekben a fémion monodentát módon az aromás nitrogéneken keresztül kapcsolódik a ligandumhoz (imidazol, piridin), a fémcentrumot könnyű redukálni egy egyelektronos folyamatban<sup>99</sup>, pozitív redoxipotenciál érték jellemzi a folyamatot. A hisztidin Cu(II)-komplexei esetében már kisebb redoxipotenciál értéket mértek<sup>99,100</sup>, a meghatározott kisebb érték a képződő komplex nagyobb stabilitásával magyarázható; a fémion az imidazolnitrogén mellett az aminocsoportoz is koordinálódik<sup>99</sup>.

Imidazolszármazékok vizsgálata során főleg oldhatósági okok miatt a ciklikus voltammetriás méréseket szerves oldószerben végezték el<sup>101,102,103</sup>. Ezen komplexek redoxi folyamataira valamennyi esetben pozitív redoxipotenciál értéket kaptak SCE-re vonatkoztatva. Ezen eredményeket nem szerepeltettem a táblázatban, a korábbi eredményekkel való összehasonlítást ugyanis megnehezíti az a tény, hogy különböző szerves oldószerekben történtek ezek a mérések.

### 2.3.2. Hisztidintartalmú peptidok réz(II)komplexeinek redoxi sajátosságai

Hisztidintartalmú peptidok réz(II)komplexeinek vizsgálata során nem védett és védett származékokat is vizsgáltak (1. táblázat). A rendelkezésre álló irodalmi adatok feltérképezése során azt tapasztaltuk, hogy főleg amidnitrogénes koordinációt tartalmazó Cu(II)-komplexeiket vizsgáltak eddig. A legtöbb esetben nagy negatív redoxipotenciál értéket határoztak meg, amely a kialakuló komplexek nagy stabilitására utal. Különböző hisztidintartalmú, nem védett di- és tripeptidek (GH, GHG, GHL, GGH) Cu(II)-komplexeinek redoxipotenciál értékeit ciklikus voltammetria segítségével vizsgálták<sup>104,105</sup>. A vizsgált ligandumok közül a GGH Cu(II)-komplexei esetében mérték a legkisebb negatív redoxipotenciál értéket, de valamennyi esetben  $\sim -0,200$  V értéket kaptak SCE-re vonatkoztatva. A GHG tripeptid Cu(II)-komplexeinek ciklikus voltammetriás vizsgálatát Ertas és munkatársai<sup>106</sup> is elvégezték, és hasonló redoxipotenciál értéket kaptak.

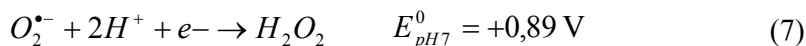
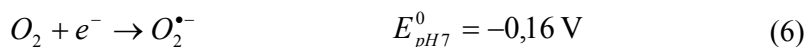
A prion fehérje fémmegkötésért felelős peptidfragmenseinek elektrokémiai vizsgálata során hasonlóan negatív redoxipotenciál értéket mértek az Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> és egy tetrapeptid az Ac-HGGG-NH<sub>2</sub> Cu(II)-komplexeire<sup>107</sup>. Az elvégzett ciklikus voltammetriás mérések azt mutatták, hogy kvázireverzibilis, egyelektronos átalakulás megy végbe. A negatív redoxipotenciál érték pedig azzal magyarázható, hogy a koordinációs szférában helyet foglaló amidnitrogének hozzájárulnak az ekvatoriális tér erősítéséhez, ami nem kedvez a Cu(I)-ionoknak. A két oktapeptid egységet tartalmazó Ac-(PHGGGWGQ)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> ligandum esetében mind az egy-, mind a két Cu(II)-iont tartalmazó komplexet jellemző redoxipotenciál érték is  $\sim -0,450$  V; az anódos csúcsok áramerősség értéke mindig kisebb, mint a katódos csúcsoké, ami a komplexek redukált formáinak kémiai reakciójára utal<sup>108</sup>.

A négy oktapeptid egységet tartalmazó Ac-PEG<sub>11</sub>-(PHGGGWGQ)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> peptiddel három-, négyszeres fémmionfelesleg mellett végeztek redoxi vizsgálatokat<sup>109</sup>. Az Cu<sub>3</sub>L komplex esetében negatív redoxipotenciál értékeket

mérték, amelyek egyre pozitívabbak lettek a pásztázási sebesség csökkentésével. Megfigyelték, hogy minél több Cu(II)-ion kötődik a ligandumhoz, annál könnyebben redukálódnak az egyes fémionok; a mért redoxipotenciál értékek egyre pozitívabbá válnak.

A prion fehérjében az ötödik Cu(II)-ion megkötésében a GGGTH szekvencia játszik szerepet. Ezen peptid védett származékát vizsgálták Hureau és munkatársai<sup>110</sup>. 6,7-es pH-értéken a kialakuló CuLH<sub>2</sub> komplexhez tartozó redoxi folyamatot tanulmányozták, amely egyelektronos, kvázireverzibilis redoxi átalakulás. A kapott redoxipotenciál érték jóval pozitívabb, mint amit egyéb hisztidintartalmú peptidekre eddig mértek.

Mindezen mérések megmutatták azt, hogy hisztidintartalmú ligandumok esetében az amidnitrogének deprotonálódásával kialakuló komplexek fémcentruma nehezebben redukálható, azaz kisebb redoxipotenciál értékek mérhetőek az esetükben. Ahhoz, hogy egy komplex képes legyen a szuperoxid gyökánion elbonátására, úgy a rá jellemző redoxipotenciál érték  $-0,16$  V és  $+0,89$  V közé kell, hogy essen. Ezen két érték jellemzi a következő két részfolyamatot:



A természetes Cu,Zn-SOD enzim redoxipotenciál értékét is megmérték, amely  $+0,360$  V-nak adódott, így ez is beleesik a megadott tartományba<sup>111</sup>. Ugyan figyeltek meg összefüggést komplexek redoxi sajátosságai és azok SOD-aktivitása között, de önmagában nem elegendő az, hogy meghatározzuk egy komplex redoxipotenciál értékét, ha annak aktivitására vagyunk kíváncsiak. Ehhez szükség van SOD-aktivitás vizsgálatok elvégzésére is.

## 2.4. Réz(II)komplexek SOD-aktivitásának vizsgálata

Réz(II)komplexek SOD-aktivitásának mérésére többféle módszer létezik, azonban ezek a módszerek alapvetően két nagy kategóriába sorolhatók: a közvetlen és a közvetett technikák közé<sup>112</sup>. Közvetlen SOD-aktivitásmérésről akkor beszélünk, amikor a szuperoxid koncentrációt követik nyomon az UV-tartományban 245 nm-en impulzus radiolízis segítségével. A módszer pontos mérésre ad lehetőséget, de drága, ezért jobban elterjedtek a laborgyakorlatban a közvetett technikák. Ezek alkalmazásakor enzim segítségével vagy kémiai úton generálják a szuperoxidot és ez reagál a detektormolekulával, amelynek elnyelése van a látható tartományban. Detektormolekulaként leggyakrabban

nitroblue-tetrazólium-kloridot (NBT) vagy citokróm c-t használnak. Az indikátormolekulák alkalmazásakor azt is vizsgálni kell, hogy van-e valamilyen kölcsönhatás a ligandum és az indikátor között. Előfordulhat ugyanis, hogy a vizsgált ligandum redukálja az indikátormolekulát, és így nem a komplex hatását látjuk.

Az elmúlt évtizedek alatt számos réz(II)komplex SOD-aktivitását mérték meg, melyek között voltak funkcionális modellek és az enzim aktív centrumának kötésviszonyait modellező peptidok réz(II)komplexei is. Ezen vizsgálatok alapján megállapították, hogy egy komplex SOD-aktivitását meghatározza az, hogy mennyire gyors a fémcentrumhoz axiálisan kötődő ligandum cseréje, és hogy sztérikusan mennyire gátolt a szuperoxid gyökianion bekötődése<sup>27,113,114</sup>. Azt is megfigyelték, hogy ha a fémion valamelyik koordinációs helyét nitrogén-donoratomot tartalmazó gyűrűs vegyület (például: imidazol vagy piridin) foglalja el, akkor nagyobb SOD-aktivitás mérhető. Amennyiben a Cu(II)-komplex torzult geometriát mutat, ez a tényező kedvezően befolyásolja a komplex aktivitását, ugyanis az enzim működése során a természetes enzimben is geometriaváltás következik be<sup>115</sup>.

A legátfogóbb SOD-aktivitás vizsgálatok során a tanulmányozott komplexek és a Cu,Zn-SOD enzim aktivitása mellett a Cu(II)-ionok aktivitását is megmérték az adott vizsgálat körülményei között. Durackova és munkatársai benzilbisztioszemikarbazon és egy makrociklusos ligandum különböző anionokat tartalmazó Cu(II)-komplexeinek aktivitását vizsgálták, indikátormolekulaként citokróm c-t alkalmaztak, a szuperoxid gyökianiont a xantin-xantin-oxidáz rendszerben generálták<sup>116</sup>. Megmérték önmagában a réz(II)-szulfát aktivitását is, és azt tapasztalták, hogy azon komplexek rendelkeznek ehhez képest nagyobb aktivitással, amelyekben nem annyira merev a fémiont körülvevő koordinációs környezet. A makrociklusos ligandum Cu(II)-komplexe mutatott nagyobb SOD-aktivitást, mely eredmény összhangban van a ciklikus voltametriás mérés eredményeivel is.  $\alpha$ -aminosavak ditiokarbamát származékainak Cu(II)-komplexeit is vizsgálták, és hasonló összefüggést találtak a redoxipotenciál értékek és a meghatározott IC<sub>50</sub> értékek között<sup>117</sup>.

Costanzo és szerzőtársai néhány dipeptid Cu(II)-komplexének tanulmányozása során foszfátpufferben végeztek méréseket, és összehasonlításképpen mind a Cu(II)-foszfát, mind a SOD enzim aktivitását is vizsgálták<sup>118</sup>. Kétféleképpen is generáltak szuperoxid gyökianiont, de mindkét esetben hasonló eredményeket kaptak. A vizsgált dipeptidek közül a ciklo-HH mutatta a legnagyobb aktivitást; az LL dipeptid esetében két diasztereomer Cu(II)-komplexét is vizsgálták, amelyek közül a kevésbé merev szerkezettel

rendelkező bizonyult aktívabbnak. Megállapították, hogy ha kölcsönhatás van a fémion és a ligandum oldalláncában található aromás gyűrű között, az csökkenti a komplex SOD-aktivitását.  $\beta$ -alanil-L-hisztidinnel<sup>119</sup> és etilén származékokkal<sup>120</sup> funkcionizált  $\beta$ -ciklodextrineket is vizsgáltak. A dipeptidhez kapcsolt ciklodextrin molekulák réz(II)komplexei a leghatékonyabb SOD modellek között vannak. Abban az esetben azonban, ha erős ligandumtér alakul ki a funkcionizálás következtében, akkor a vizsgált komplex aktivitása még kisebb is lehet a Cu(II)-foszfát rendszerénél.

A Cu,Zn-SOD enzim modellezése céljából vizsgált vegyületek egy másik csoportját a különböző imidazolátohidas komplexek képezik. Yang és munkatársai egy olyan két Cu(II)-iont tartalmazó komplexet vizsgáltak, amelyben a két fémiont imidazolátohíd köti össze, a fémionok pedig egy makrociklusos ligandum részei<sup>121</sup>. Miután meggyőződtek róla, hogy a komplex stabilis marad a mérés pH-tartományában, meghatározták a komplex SOD-aktivitását NBT alkalmazásával, amely ugyan kilenced része a természetes enzimének, de a leghatékonyabb modellek között van. Patel és kutatócsoportja szintén mért SOD-aktivitást kétmagvú imidazolátohidas komplexek esetében<sup>122</sup>. Azt tapasztalták azonban, hogy az általuk vizsgált pentametildietiléntriámin (PMDT) tartalmazó komplexek kisebb aktivitást mutatnak, mint a szintén kétmagvú glicilglicin és dietiléntriámin komplexek. Ezt azzal magyarázták, hogy a PMDT erősebb ligandumtérrel rendelkezik, mint a másik két felsorolt ligandum.

Dietiléntriámin, imidazol, trisz(2-aminoetil)amin felhasználásával is előállítottak egy réz(II)- valamint cink(II)iont tartalmazó imidazolátohidas komplexet<sup>123</sup>. A komplex már 7-es pH-értéken kialakul az oldatban és 11-es pH-értékig stabilis is marad. A SOD-aktivitás méréshez riboflavinból állították elő a szuperoxid gyökiont, és NBT-vel követték nyomon az abszorbancia-változást. Azt tapasztalták, hogy a kétmagvú komplex jobb aktivitást mutat, mint az egy fémiont tartalmazó komplexek külön-külön, de még így is két nagyságrenddel nagyobb aktivitással rendelkezik az azonos körülmények között megmért természetes enzim.

Mindezen vizsgálatok mellett különböző hisztidintartalmú nem védett és védett peptidek SOD-aktivitását is tanulmányozták. Pogni és munkatársai nem védett glicint és hisztidint tartalmazó di-, tri- és tetrapeptidek Cu(II)-komplexeit tanulmányozták indirekt SOD aktivitást mérő módszer segítségével, foszfátpufferben, citokróm c alkalmazásával<sup>124</sup>. A vizsgált peptidek Cu(II)-komplexeinek aktivitása az alábbi sorrendben változik: GGHG<GGH<GHG<HGG<GG<GGGG<GGG. Ezek alapján megállapították, hogy a hisztidin jelenléte a nemvédett peptidek esetében csökkenti az aktivitást.

Megfigyelték, hogy ahogy növekszik a fémion körüli ekvatoriális sík torzulása, úgy növekszik a komplex SOD-aktivitása. A kialakuló komplexek szerkezetét és a szerkezet torzulását ESR spektroszkópia segítségével is igazolták.

Több kutatócsoport is vizsgálta(ja) a peptidláncban legalább két hisztidint tartalmazó ligandumok réz(II)-komplexeinek SOD-aktivitását. A legtöbb vizsgált komplexben a fémion az imidazolnitrogének mellett a deprotonálódott amidnitrogénekhez is kötődik, amely csökkenti a SOD-aktivitást. A Cu(II)-HGHG és a Cu(II)-Ac-HGHG rendszerben az aktivitásmérésnél beállított 7,4-es pH-értéken  $\text{CuLH}_2$  összetételű komplex alakul ki, amelyben a fémion  $[\text{N}(\text{Im}), 2 \times \text{N}^-, \text{COO}^-]$  donorszettel keresztül koordinálódik<sup>125</sup>. Az N-acetilezett származék esetében mértek nagyobb SOD-aktivitást, amely annak tudható be, hogy kisebb stabilitású a kialakuló komplex, és a fémion körül van szabad koordinációs hely, ahová a szuperoxid gyökanyon bekapcsolódhat. Ugyanezen a pH-értéken végezték el a HVH és az Ac-HVH-NH<sub>2</sub> ligandumok Cu(II)-komplexeinek SOD-aktivitás vizsgálatát is<sup>79</sup>. 7,4-es pH-értéken a fémion a nemvédett származék esetében két amidnitrogénnel, a C-terminális imidazolnitrogénnel és a terminális aminocsoporton keresztül koordinálódik. A védett származék esetében a Cu(II)-ion  $[2 \times \text{N}^-, 2 \times \text{N}(\text{Im})]$  donorszettel keresztül kötődik. Ugyanarra a következtetésre jutottak, mint a tetrapeptid esetében: az N-acetilezett tripeptid Cu(II)-komplexe bontja hatékonyabban a szuperoxid gyökanyont, ami ezekben a rendszerekben is a kialakuló komplexek eltérő stabilitásával magyarázható.

Három hisztidint tartalmazó peptidek Cu(II)-komplexeivel is történtek SOD-aktivitásmérések. Ezek között érdemes megemlíteni a HHGH tetrapeptid N-acilezett származékát, amelynek Cu(II)-komplexeit különböző pH-értékeken vizsgálták<sup>126</sup>. Megállapították, hogy a SOD mérés koncentráció-viszonyai között megváltozik az oldatbeli részecskeeloszlás, de ha legalább tízszeres ligandumfelesleget alkalmaznak, akkor a Cu(II)-ionok ugyanúgy kötött formában vannak jelen az oldatban. 6,8-as pH-értéken mérték a legnagyobb SOD-aktivitás értéket, amely a három imidazolnitrogén koordinálódásával kialakuló CuL komplexhez rendelhető. Ebben a komplexben kisebb az ekvatoriális térerősség, mint a 7,5-ös pH-értéken kialakuló amidnitrogénes koordinációt tartalmazó komplexben. Prolintartalmú ligandumok esetében is végeztek vizsgálatokat; az Ac-HPHH-NH<sub>2</sub> peptid Cu(II)-komplexeit 7,4-es pH-értéken tanulmányozták<sup>127</sup>. Ezen a pH-értéken  $[\text{CuLH}_1]^+$  részecske képződik, amelyben a fémion két imidazol- és egy amidnitrogénnel keresztül koordinálódik. A kapott IC<sub>50</sub>-érték hasonló a korábban mért adatokhoz, a pH-növelésével azonban lecsökken. Amikor több prolint építettek be a peptidláncba (Ac-HPHPPH-NH<sub>2</sub> és Ac-KHPHPPH-NH<sub>2</sub>), a Cu(II)-iont



tartalmazó rendszerek SOD-aktivitásának vizsgálata során 7,5-ös és 8,3-as pH-értéken határozták meg az IC<sub>50</sub> értékeket<sup>76</sup>. Azt látták, hogy a pH növelésével növekszik az aktivitás, amely főleg a CuL komplexnek tulajdonítható, amelyben a fémion három imidazolnitrogénhez és egy hidroxidionhoz kapcsolódik. A kapott IC<sub>50</sub> értékek a vártnál kisebbek, pedig a fémion imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik a komplexekben. Ez azzal magyarázható, hogy nem az aktivitást mutató komplex az uralkodó részecske az adott pH-tartományban.

A több hisztidint tartalmazó modellvegyületek között tartjuk számon a prionfehérje hexa- és oktarepeat tartományának modellezésére előállított peptideket is. Ezen peptidek a következő általános képlettel adhatók meg: Ac-(HNP $GY$ P)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> és Ac-(PHGGGWGQ)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> ahol *n* értéke 1,2 vagy 4 lehet. SOD-aktivitás értékeiket Cu(II)-ionok jelenlétében különböző fémion/ligandum arányoknál és két pH-értéken határozták meg<sup>128</sup>.

Valamennyi esetben 0,10-0,36 μM közé eső IC<sub>50</sub> értéket mértek, és azt találták, hogy a legnagyobb aktivitással a négy ismétlődő egységet tartalmazó ligandumok Cu(II)-komplexei rendelkeznek. Az elvégzett mérések alapján az alábbi következtetéseket vonták le: a) minél több imidazolnitrogén vesz részt a fémion koordinálódásában, annál nagyobb az aktivitás; b) ha amidnitrogének lépnek be a koordinációs szférába vagy a pH csökkentésével megnő a szabad réz(II)ionok mennyisége, akkor csökken a SOD-aktivitás értéke is. Valamennyi komplex közül a legnagyobb aktivitással a Cu(II)-Ac-(PHGGGWGQ)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> rendszerben 6,6-os pH-értéken képződő komplex rendelkezik, amelyben a fémion négy imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik. Ez az adat is alátámasztja azt, hogy az imidazolnitrogénes koordinációt tartalmazó komplexek a legígéretesebb SOD-modell vegyületek.

### 3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

#### 3.1. Felhasznált vegyszerek, vizsgált ligandumok

A  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  és  $\text{KOH}$  oldatokat analitikai minőségű, a Reanal cég által gyártott vegyszerekből készítettük, a pontos fémion-koncentrációkat gravimetriásan oxinát formájában, a sav-, illetve a lúgkoncentrációkat pedig pH-potenciometriásan határoztuk meg.

A titrálásokat  $\sim 0,2 \text{ mol/dm}^3$ , pontosan ismert koncentrációjú, karbonátmentes, argon alatt készített és tárolt  $\text{KOH}$ -oldattal végeztük. Vizsgálataink során az állandó ionerősséget a  $1,0 \text{ mol/dm}^3$  koncentrációjú  $\text{KCl}$ -oldattal biztosítottuk. A ciklikus voltammetriás mérések során  $\text{KNO}_3$ -oldatot használtunk háttéreelektrolitként.

A  $^1\text{H}$  NMR vizsgálatokhoz 99,8%-os izotóptisztaságú, az ISOTEC Inc. cég által előállított  $\text{D}_2\text{O}$ -t,  $\text{DCl}$ - és  $\text{NaOD}$ -oldatot használtunk.

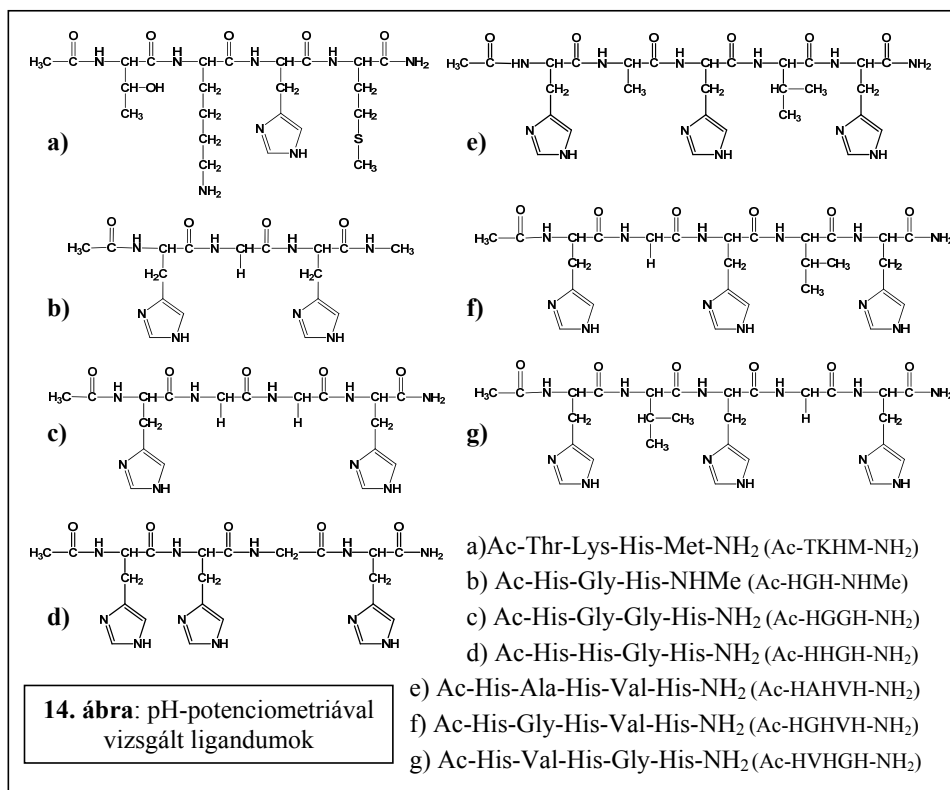
A SOD aktivitás mérésekhez a nitroblue-tetrazólium-klorid sót, a xantint és a xantin-oxidáz enzimet a Sigma cégtől rendeltük.

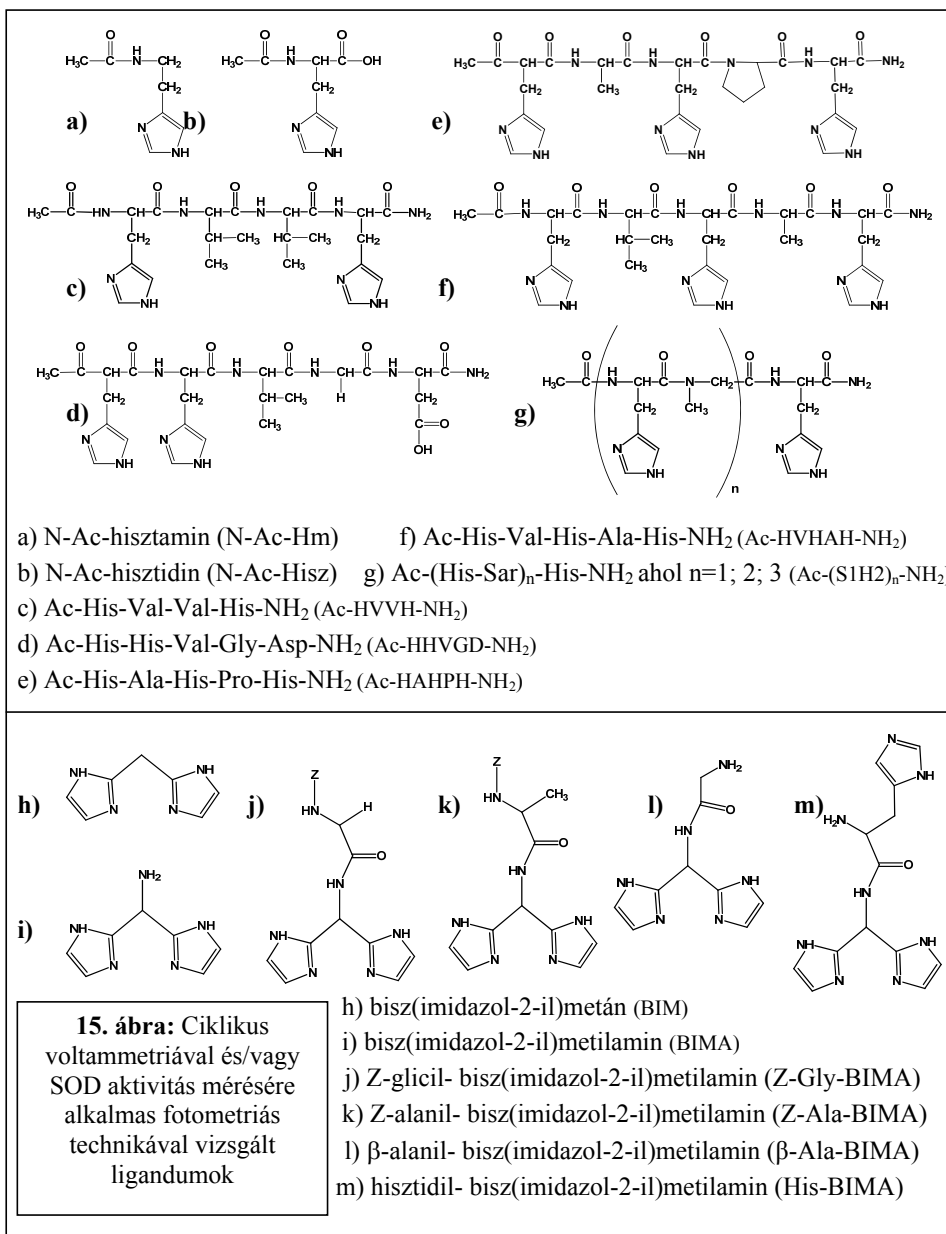
A vizsgált ligandumok egy része kereskedelmi forgalomban kapható volt, ezeket különböző finomvegyszert forgalmazó cégektől szereztük be. Az N-Ac-hisztamint az Aldrich, az N-Ac-hisztidint a Sigma, az Ac-HGH-OH, Ac-HGH-NHMe, Ac-HHGH-OH, Ac-HHGH-NHMe ligandumokat a Bachem, az Ac-HGGH-NH<sub>2</sub> és Ac-HVVH-NH<sub>2</sub> peptideket a Genscript cégektől vásároltuk. A bisz(imidazol-2-il)-származékokat az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportjában Süliné Dr. Vargha Helga és munkatársai állították elő. A Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumát modellező peptideket (Ac-HHVGD-NH<sub>2</sub>, Ac-HAHVH-NH<sub>2</sub>, Ac-HAHPH-NH<sub>2</sub>, Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub>, Ac-HVVAH-NH<sub>2</sub>, Ac-HVHGH-NH<sub>2</sub>, Ac-S1H2-NH<sub>2</sub>, Ac-S2H3-NH<sub>2</sub>, Ac-S3H4-NH<sub>2</sub>) Dr. Kállay Csilla szintetizálta Görögországban, a Ioanninai Egyetemen (University of Ioannina), szilárdfázisú peptidszintézissel.

Ugyanezen technika segítségével állítottam elő az Ac-TKHM-NH<sub>2</sub> tetrapeptidet Catániában a Liberty peptidszintetizáló berendezés segítségével. A peptidszintézishez szükséges vegyszereket kereskedelmi forgalomból szereztük be, és további tisztítás nélkül használtuk fel őket. A Fmoc-védőcsoportot tartalmazó aminosavakat, a 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium tetrafluoroborátot (TBTU) és N-hidroxi-benzotriazol (HOBt) az InBios cégtől, a piperidint, a triizopropil-szilánt (TIS), az ecetsavanhidridet, az N,N-diizopropil-etilamint (DIEA), dietil-étert (Et<sub>2</sub>O) és trifluor-ecetsavat (TFA) a Sigma/Aldrich-től rendeltük. Az N,N-dimetil-formamid (DMF), az acetonitril (ACN) és a diklórmétán (DCM) a Labscan Analytical Sciences írt cégtől érkezett, a Novasyn TGR gyanta pedig a Novabiochem svájci cégtől. A peptid

tisztítását preparatív fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) oldottuk meg.

A munkám során vizsgált ligandumokat foglalja össze az 14. és a 15. ábra.





**15. ábra:** Ciklikus voltammetriával és/vagy SOD aktivitás mérésére alkalmas fotometriás technikával vizsgált ligandumok

### 3.2. Peptidszintézis

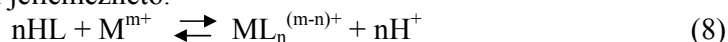
A vizsgált ligandumok közül az Ac-TKHM-NH<sub>2</sub> tetrapeptidet állítottam elő szilárd fázisú peptidszintézis segítségével. Ezt a technikát 1963-ban egy amerikai professzor, R. B. Merrifield publikálta a peptidek szintézisére<sup>129</sup>. A Merrifield-féle szintézis szilárd hordozón (gyantán) történik. Ez olyan finomszemcsés műanyag, amelynek 1 grammjában körülbelül 10 millió szemcse van. A szemcsék felületén és azok belsejében olyan atomcsoportok (funkciócsoportok) vannak, amelyek lehetővé teszik, hogy a szemcsékhez aminosavakat vagy más vegyületeket kapcsolhassunk kémiai kötással. Oldószerként olyan szerves vegyület alkalmazható, amelyben a gyanta jól duzzad, így a reaktánsok könnyen bejuthatnak a szemcsékbe, illetve a melléktermékek elhagyhatják azt. Munkánk során dimetil-formamidot (DMF) használtunk.

A peptid szintézisét automatizált módon egy mikrohullámú Liberty Peptidszintetizáló készülékkel (CEM) végeztük. A szintézishez NovaSyn TGR gyantát használtunk, az aminosavakat a TBTU/HOBt/DIEA technika segítségével aktiváltuk. A Fmoc védőcsoportok eltávolítását a készülék 20% piperidint tartalmazó DMF-oldattal hajtotta végre 180 másodpercig 75°C-on 25 W teljesítményű mikrohullámú sugárzás segítségével. Az aminosavak csatolása 300 másodpercig szintén 75 °C-on, 25 W teljesítményű mikrohullámú sugárzás hatására ment végbe, amelyhez az aminosavakat négyszeres feleslegben alkalmaztuk, aktiválásukra pedig a következő elegyet használtuk: 0,5 mol/dm<sup>3</sup> HOBt, 0,5 mol/dm<sup>3</sup> TBTU DMF-ben oldva, 2,0 mol/dm<sup>3</sup> DIEA-oldat. A szintézis utolsó lépésében az előállított peptidet tartalmazó gyantát – a Fmoc védőcsoport eltávolítása után 6 V/V% ecetsav-anhidridet és 5 V/V% DIEA-t tartalmazó oldat (oldószer: DMF) hozzáadásával kezelte a készülék azért, hogy a peptid N-terminális végére acetil védőcsoportot építhessen ki. A peptid gyantáról történő hasítását és az oldalláncbeli imidazolcsoport védőcsoportjának eltávolítását szobahőmérsékleten végeztük el 94,0 V/V% TFA, 2,5 % EDT, 1 % TIS, 2,5 % H<sub>2</sub>O elegyével. A gyantáról lehasított peptidet szűrőssel kaptuk meg, majd vákuumban 30 °C-on bepároltuk. A nyers peptidet hideg, frissen desztillált dietil-éterből választottuk le, majd a csapadékot leszűrtük, vákuum alatt szárítottuk, vízben feloldottuk és liofilizáltuk. A nyers peptideket fordított fázisú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) technikát alkalmazva, egy Prostar diódasoros detektorral ellátott Varian Prepstar 200 model SD-1 készülék segítségével tisztítottuk. Az elválasztáshoz preparatív Varian Dynamax C<sub>18</sub> (300 Å pórusméret, 10 µm részecskeméret) 250×41,4 mm átmérőjű kolonnát és gradiens elúciót használtunk (az áramlási

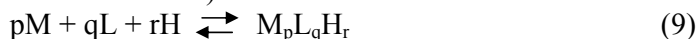
sebesség 10 ml/min volt). Az eluálószer 0,1 % TFA-t tartalmazó víz illetve 0,1 % TFA-t tartalmazó CH<sub>3</sub>CN volt. Az elúció során 8 percen keresztül izokratikus elúciót alkalmaztunk 100 % vízzel, majd 10 perc alatt a CH<sub>3</sub>CN-oldat aránya 0 %-ról 15 %-ra nőtt, és újabb 10 percen keresztül 15 % CH<sub>3</sub>CN és 85 % víz eleggyel izokratikus elúciót folytattunk. Végül az utolsó 5 percben gradiens elúció segítségével visszatértünk a 100 % vízhez. A peptidet ESI-MS analízissel is vizsgáltuk egy Finnigan LCQ-Duo elektroszpré ionizációs, ioncsapda analizátorral rendelkező tömegspektrométer segítségével.

### 3.3. pH-potenciometria

A ligandumok protonálódási állandóit és a komplexek stabilitási állandóit pH-potenciometriás módszer segítségével határoztuk meg. A pH-potenciometria az oldatfázisban lejátszódó komplexképződési folyamatok egyensúlyi vizsgálatának egyik legáltalánosabb módszere. Alkalmazhatóságának feltétele, hogy a fémion koordinációja hatással legyen a ligandum protonálódási egyensúlyára, vagyis a komplexképződés az oldat pH-jának megváltozásával járjon. A H<sup>+</sup>-ion és a fémion közötti kompetíciós folyamat az alábbi egyensúllyal jellemezhető:



A bruttó komplexképződési folyamat általános formája (az egyszerűség kedvéért a töltéseket nem tüntettem fel):



ahol *M*: fémion, *L*: teljesen deprotonált ligandum, *H*: proton  
*p*, *q*, *r*: sztöchiometriai együtthatók

A képződő komplexek stabilitási szorzata:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_pL_qH_r]}{[M]^p[L]^q[H]^r} \quad (10)$$

A kísérleti adatokból a fémkomplexekre meghatározott stabilitási szorzatokat a SUPERQUAD<sup>130</sup> és a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén kifejlesztett PSEQUAD<sup>131</sup> számítógépes programok segítségével számítottuk ki. A kiértékelés során a térfogat – pH adatpárok mellett bemenő adatként meg kell adnunk a komponensek (*M*, *L*, *H*), valamint az asszociátumok (a ligandum különböző protonáltsági fokú részecskéi, a különböző M<sub>p</sub>L<sub>q</sub>H<sub>r</sub> fémkomplexek, illetve hidroxokomplexek) számát, azok összetételét az *M*, *L* és *H* komponensekre nézve (*p*, *q*, *r*), és az asszociátumok ismert protonálódási állandóit vagy stabilitási szorzatait. Az ismeretlenek

esetében közelítő értékekre van szükség. További szükséges paraméterek a komponensek kiindulási teljes koncentrációi, a titráló oldat koncentrációja, a vízionszorzat és a műszer által kijelzett pH-értéknek egyensúlyi koncentrációval kifejezett pH-értékre történő átszámításához szükséges ún. Irving korrekciós tényező<sup>132</sup>. A keresett stabilitási szorzatok értékeit a kiindulási komponensekre felírható anyagmérleg-egyenletek megoldásai adják:

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

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

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

ahol  $n$  a rendszerben képződő asszociátumok számát,  $p$ ,  $q$  és  $r$  pedig a sztöchiometriai együtthatókat jelöli. A kiindulási adatok alapján a program Newton-Raphson iterációval közelíti az ismeretlen stabilitási állandók értékét mindaddig, amíg az ismert koncentrációjú titrálóoldatra megadható  $\Sigma(V_{\text{mért}} - V_{\text{számított}})$  összefüggés értéke minimumot nem ér el. A számítási sorozat végén megkapjuk a keresett állandók finomított értékeit és azok hibáit, melyek alapján a program a titrálási görbe minden egyes pontjában kiszámítja az egyes részecskék egyensúlyi koncentrációját, valamint a hozzájuk tartozó standard deviáció értékét. A  $|V_{\text{mért}} - V_{\text{számított}}|$  átlagértéke fogja megadni a közelítés jóságát, amit illesztési paraméternek nevezünk. A stabilitási állandók megadásakor az utolsó tizedesjegy hibáját zárójelben tüntetjük fel. Ezt követően a program egy általunk kiválasztott komponensre vonatkozóan (általában a fémion) a pH függvényében kirajzolja a részecskék koncentráció-eloszlási görbéjét. A dolgozatban szereplő koncentráció-eloszlási görbéket a SED program<sup>133</sup> Windows alatt futó változata, a MEDUSA segítségével készítettük. A program működéséhez szükség van a kiindulási koncentrációkra, valamint az asszociátumok stabilitási szorzataira.

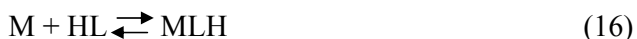
A fémkomplexek protonálódási folyamatainak jellemzése során gyakran használunk ún. származtatott állandókat. A számítógépes programmal kiszámított értékek megfelelő kombinációjával olyan állandókhöz juthatunk, amelyek lehetővé teszik a különböző ligandumokkal képzett komplexek összehasonlítását. A komplexben kötött ligandum hisztidin imidazolnitrogénjének, majd amidnitrogénjének deprotonálódását a  $pK(\text{MLH}_n/\text{MLH}_{n-1})$  értékkel jellemezzük, amelyet az alábbi általános egyenlettel számíthatunk ki:

$$\log \beta(MLH_n) - \log \beta(MLH_{n-1}) = pK(MLH_n / MLH_{n-1}) \quad (14)$$

Abban az esetben, ha az amidnitrogének kooperatív módon deprotonálódnak, deprotonálódásuk jellemzésére egy átlagos  $pK$ -értéket adhatunk meg. Ezt az alábbi egyenlet szerint számoljuk:

$$\frac{\log \beta(ML) - \log \beta(MLH_{-2})}{2} = pK(ML / MLH_{-2})_{\text{átlag}} \quad (15)$$

Az imidazolnitrogének koordinálódásával kialakuló makrokelátot tartalmazó komplexek stabilitásának jellemzésére vezettük be a  $\log \beta(M + 2N(\text{Im}))$  és  $\log \beta(M + 3N(\text{Im}))$  állandókat. Abban az esetben, ha valamennyi oldalláncban megtalálható imidazolgyűrű deprotonált formában van jelen, és koordinálódik, ezen állandók értéke megegyezik az  $ML$  komplex  $\log \beta$  értékével. A három hisztidint tartalmazó peptidokban a  $\log \beta(M + 2N(\text{Im}))$  állandó értékét a



folyamatra vonatkozó állandó számításával adjuk meg:

$$\log \beta(M + 2N) = \log \beta(MLH) - \log \beta(HL) \quad (17)$$

A kisebb tagszámú ligandumok esetében lehetőség van biszkomplexek kialakulására is. Azt, hogy mennyire kedvező a biszkomplex kialakulása, a  $\log(K_1/K_2)$  érték mutatja meg. Kiszámítása a következő egyenlet alapján történik:

$$2 \cdot \log \beta(ML) - \log \beta(ML_2) = \log(K_1 / K_2) \quad (18)$$

Valamennyi általunk vizsgált vegyület vízoldható, ezért vizes oldatokat tanulmányoztunk. A ligandumok kis mennyiségben álltak rendelkezésre, így a mérések kivitelezésére egy számítógép által vezérelt automata MOL-AcS bürettát és egy MOLSPIN pH-mérőt használtunk, amihez egy Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektrod csatlakozott. A  $\sim 0,2 \text{ mol/dm}^3$  koncentrációjú KOH-mérőoldat adagolását  $1 \text{ cm}^3$  végtérfogatú Hamilton fecskendővel végeztük.

A mérések kiértékelését számítógéppel végeztük el. A lúgdat koncentrációját valamennyi esetben ismert koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát-oldat titrálási görbéjének Gran-féle linearizálásával határoztuk meg<sup>134</sup>.

A pH-mérőt  $0,050 \text{ mol/dm}^3$  kálium-hidrogén-ftalát oldattal kalibráltuk, melynek pH-ja  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on  $4,008$ . Az állandó hőmérsékletet ( $T = 278 \text{ K}$ ) ultratermosztáttal, az oxigén kizárását pedig az argongáz oldat fölé való vezetásával biztosítottuk. Az oldat kevertetését mágneses keverővel oldottuk meg.



A mérésekhez készített minták térfogata 3-4 cm<sup>3</sup> volt. A ligandumok kezdeti teljes koncentrációját 4·10<sup>-4</sup>-8·10<sup>-3</sup> mol/dm<sup>3</sup> között változtattuk. A ligandumok koncentrációját beméréssel és a potenciometriás titrálási görbe ekvivalenciapontjai alapján, a SUPERQUAD program segítségével határoztuk meg.

A fémion/ligandum arányt 1:5 és 2:1 között változtattuk. A titrálás során fellépő térfogatnövekedést a kiértékelésre használt számítógépes program figyelembe vette.

A minták állandó ionerősségét (0,20 mol/dm<sup>3</sup>) úgy biztosítottuk, hogy megfelelő mennyiségű 1,0 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú KCl-oldatot adtunk a titrálendő oldathoz. Ez az ionerősség jó pontossággal megegyezik a mérőoldat koncentrációjával, ugyanakkor jóval nagyobb, mint a titrálendő oldat fémion- és ligandum-koncentrációjának az összege. Ez biztosítja azt, hogy a mérés során az ionerősség gyakorlatilag ne változzon.

A pH-potenciometria az egyik legfontosabb komplexkémiai vizsgálómódszer, azonban vannak hiányosságai: például ha két részecske képződése azonos pH-effektussal jár, akkor azok nem különböztethetők meg ezzel a módszerrel. Egyes esetekben egy rendszer több, kémiaileg reális modellel is jól leírható. Ezenkívül a meghatározott stabilitási állandók nem adnak felvilágosítást arról, hogy a képződő komplexekben milyen kötőmód valósul meg, milyen a komplex geometriája. Legtöbbször különböző spektrális mérések (pl. spektrofotometria, CD) szükségesek a pH-potenciometriás mérések eredményeinek bizonyításához, kiegészítéséhez.

### 3.4. UV-látható spektrofotometria

Spektrális vizsgálatokat végeztünk a réz(II)-, a nikkell(II)- és a kobalt(II)ionokat tartalmazó rendszereken. Az említett fémionok komplexeinek spektroszkópiái sajátosságait már sokan vizsgálták, így az irodalomban rengeteg adat áll rendelkezésünkre.

A **réz(II)komplexekre** jellemző tetragonálisan torzult, oktaéderes térben négyfelé hasadnak az energiaszintek, az így létrejött négy energiaszint között háromféle d-d átmenetnek kellene megjelennie  $d_{xz}(d_{yz}) \rightarrow d_{x^2-y^2}$ ;  $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ ;  $d_{z^2} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ . Azonban ezen átmenetek gyakran egyetlen sávva olvadnak össze, és energiájukat illetve intenzitásukat nagyban befolyásolja a koordinált donatoratomok száma és minősége (2. táblázat). Ez utóbbit Sigel és Martin<sup>39</sup>, valamint Pettit és munkatársai<sup>135</sup> vizsgálták. Vizsgálataik alapján felállítottak egy empirikus összefüggést, amelynek segítségével a  $\lambda_{\max}$  értékek megjósolhatók<sup>39</sup>, ha nincs axiális koordináció.

**2. táblázat:** A réz(II)komplexek spektrális paramétereinek függése a koordinált nitrogénatomok számától<sup>135</sup>

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

A számításhoz szükséges donoratomok ún. hozzájárulási tényezőit ( $x_i$ ) számos aminosav és peptid kiterjedt spektrofotometriás vizsgálata alapján határozták meg<sup>136</sup>:

$$\lambda_{\max} = \frac{1000}{\sum_{i=1}^n x_i} [nm] \quad (19)$$

A vizes oldatban jelenlévő  $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$ -ion négy ekvatoriális vízmolekulájának oxigén- vagy nitrogéndonoratomokkal történő helyettesítése az abszorpciós maximumot a rövidebb hullámhosszak felé tolja el. Több tényező is nehezíti azonban a kvantitatív összefüggés megadását; az effektus nagysága a donoratom természetén kívül függ a kelátgyűrű méretétől, valamint a ligandumhoz kapcsolódó, de a koordinációban részt nem vevő szubsztituensektől is. Érdeemes megemlíteni, hogy az összefüggés nem használható axiális koordináció esetén sem, mert az axiális koordináció a  $\lambda_{\max}$  értékek kismértékű eltolódását eredményezi a nagyobb hullámhosszak felé (vörös eltolódás).

A **nikkel(II)komplexekre** leginkább a 4-es és a 6-os koordinációs szám jellemző.

A 6-os koordinációs számú oktaéderes komplexekhez három spinmegengedett d-d átmenet tartozik, de ezek valamennyien elég gyengék ( $\epsilon < 30 M^{-1}cm^{-1}$ ):  $\lambda_1 = 1430-770$  nm ( ${}^3A_2 \rightarrow {}^3T_2$  átmenet);  $\lambda_2 = 910-500$  nm ( ${}^3A_2 \rightarrow {}^3T_1 (F)$  átmenet);  $\lambda_3 = 520-370$  nm ( ${}^3A_2 \rightarrow {}^3T_1 (P)$  átmenet). A középső oktaéderes sáv felhasadása a komplex geometriai torzulását mutatja. Ezen sávok mellett létezik egy még kisebb intenzitású, spintiltott ( ${}^3A_2 \rightarrow {}^1E$ ) átmenet is, amely általában csak vállként jelenik meg valamelyik csúcson.

A 4-es koordinációs számú, tetraéderes nikkel(II)komplexek spektrumára már nagyobb intenzitású ( $\epsilon = 10^2-10^3 M^{-1}cm^{-1}$ ) sávok jellemzőek a 900-500 nm-es hullámhossztartományban.

Szintén 4-es koordinációs számúak a diamágneses, síknégyzetes komplexek, amelyek főleg erős terű ligandumokkal (például peptidok amidnitrogénjei) való kölcsönhatásban képződnek. Ezen komplexekre jellemző 550-400 nm-en egy elég intenzív sáv ( $\epsilon \sim 50 - 500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), és sárga, vörös vagy narancssárga szín. Emellett egy második, még intenzívebb sáv található 430 nm alatt, amely gyakran töltésátviteli eredetű<sup>137</sup>.

A **kobalt(II)komplexek** esetében oktaédes és tetraédes szerkezetek kialakulására van lehetőség. Az előbbieket általában rózsaszíntől az ibolyáig terjedő színűek, míg a tetraédes komplexek többnyire kékek<sup>137</sup>. A tetraédes komplexeknek 600 nm fölött van elnyelése, az oktaédes komplexek esetén pedig rövidebb hullámhosszon:  $\sim 400\text{-}600$  nm-en tapasztaltak elnyelést.

Spektrofotometriás méréseinket 200-900 nm-es hullámhossz tartományban kiviteleztek. A spektrumokat Hewlett-Packard HP 8453 típusú egysugaras, diódasoros, valamint Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras fotométereken, 1,000 cm-es küvettában vettük fel különböző pH-értékeken, különböző fémion/ligandum arányoknál. A fémion-ligandum arányokat valamennyi esetben a pH-potenciometriás méréseink alapján választottuk meg.

A kapott spektrumok elemzését egyrészt a gyártó cég által biztosított kezelő- és kiértékelő programmal végeztük, másrészt a PSEQUAD<sup>131</sup> program segítségével az egyes komplexek spektrumát is meghatároztuk. A spektrumok elemzésével a képződött komplexek szerkezetére, geometriájára tudunk következtetni.

### 3.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia egyike azoknak a spektroszkópiái módszereknek, amelyek a polarizált fény és egy optikailag aktív anyag kölcsönhatásán alapulnak. A síkban polarizált fény egy balra és egy jobbra cirkulárisan polarizált fénysugár összegének tekinthető. Az optikailag aktív anyagok abszorpciós koefficiense és törésmutatója különbözik a kétféle cirkulárisan polarizált fénysugárra, azon áthaladva az abszorpcióban különbség mutatkozik. Ezt az abszorpciós különbséget nevezzük cirkuláris dikroizmusnak, vagy más néven Cotton-effektusnak. Az abszorpcióban mutatkozó különbség a teljes abszorpcióhoz viszonyítva igen kicsi, annak kb. 1%-a. A cirkuláris dikroizmus görbét akkor kapjuk, ha a kétféle fénysugár abszorpciójának különbségét ( $\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$ ) ábrázoljuk a hullámhossz függvényében. A CD görbe maximumai és minimumai az elektrongerjesztési abszorpciós spektrum maximuma helyén, illetve ahhoz igen közel jelentkeznek,

és viszonylag keskeny Gauss-görbék, ellentétben az elektrongerjesztési spektrummal.

A fémkomplexek optikai aktivitása a komplexmolekula aszimmetriájától vagy a ligandum saját – a komplexképződés előtt is meglévő – aszimmetriájától származhat. Ha a komplex optikai aktivitása a komplexképződés alatt alakul ki, akkor a komplexképződéssel a két enantiomer racém elegyét kapjuk, melyekhez ellentétes előjelű, azonos értékű Cotton-effektus tartozik, így kioltják egymást. Ezeket az enantiomereket csak kinetikailag inert komplexek esetében lehet elválasztani és vizsgálni.

Számos komplex szerkezetének vizsgálatában azonban eredményesen használták a CD spektroszkópiát, melyek között említhetjük a Cu(II), Ni(II) és a Pd(II) peptidkomplexeit. A különböző di- és tripeptidok tanulmányozása során bizonyos törvényszerűségeket figyeltek meg, amelyeket Sigel és Martin foglalt össze<sup>39</sup>. Megállapították, hogy ezen peptidok komplexeinek CD spektrumai jól értelmezhetők az ún. dupla-oktán vagy hexadekán szabállyal. Eszerint ha a komplex koordinációs síkja alatti és feletti teret 8-8 szektorra osztjuk, és minden szomszédos szektornak ellentétes előjelet tulajdonítunk, akkor az adott szektorban található optikailag aktív csoport hatására bekövetkező Cotton-effektus előjelét a szektor előjele adja meg. A komplexek CD spektrumának 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, egy alaninból és két glicinből felépülő tripeptidok esetén tapasztalt intenzitások összegével. Ez az összefüggés nemcsak az alanin esetén igaz, hanem valamennyi nemkoordinálódó oldalláncot tartalmazó peptidre érvényes<sup>138,139,140</sup>. Ezek alapján felállítottak egy összefüggést, amelynek segítségével egy X-Y-Z tripeptid fém komplexének várható Cotton-effektusa adott hullámhosszon kiszámítható:

$$\Delta\epsilon_{\lambda}^{X-Y-Z} = \Delta\epsilon_{\lambda}^{X-Gly-Gly} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{Gly-Y-Gly} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{Gly-Gly-Z} \quad (20)$$

ahol  $\Delta\epsilon_{\lambda}^{X-Y-Z}$  az adott X-Y-Z tripeptid fémkomplexének  $\lambda$  hullámhosszon mért Cotton-effektusa.

Megállapították, hogy a komplexben különböző helyzetben lévő, de azonos kémiai minőségű optikailag aktív csoportok különböző nagyságú Cotton-effektust eredményeznek:

$$\Delta\epsilon_{\lambda}^{Gly-X-Gly} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{Gly-Gly-X} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{X-Gly-Gly} \quad (21)$$

Ennek oka az, hogy a központi fémionhoz, mint kromofor csoporthoz kapcsolódó különböző donorcsoportok nem azonos hatásfokkal továbbítják a

királis információt. Hatásuk alapján a következő sorrend állítható fel: amidnitrogén > karboxilátóxigén > aminonitrogén.

A CD méréseket a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén egy JASCO J-810 spektrométeren végeztük. A spektrumokat szobahőmérsékletű vizes oldatokban vettük fel különböző pH-értékeknél illetve 1:1, 1:2 fémion-ligandum arányoknál. Méréseinkhez 0,1 és 1,0 cm úthosszúságú küvettákat használtunk, a spektrumokat 200-800 nm hullámhossz tartományban rögzítettük. Az oldatok koncentrációját úgy állítottuk be, hogy az abszorbancia 0,6-1 között legyen.

A kapott CD görbék elemzését egyrészt a gyártó cég által biztosított kezelő- és kiértékelő programmal végeztük, másrészt a PSEQUAD<sup>131</sup> program segítségével az egyes komplexek spektrumát is meghatároztuk. A spektrumok elemzésével a képződött komplexek szerkezetére, geometriájára, a koordinálódó donoratomok számára és kémiai jellegére lehet következtetni.

### 3.6. <sup>1</sup>H NMR spektroszkópia

Az általunk vizsgált komplexek közül egyes nikkell(II)komplexek esetében végeztünk <sup>1</sup>H NMR méréseket. Valamennyi esetben a síknégyszetes NiLH<sub>3</sub> összetételű komplex spektrumát vizsgáltuk erősen lúgos oldatokban. A <sup>1</sup>H NMR spektrumban megjelenő jelek pontos asszignálása érdekében felvettük a teljesen deprotonált ligandumok spektrumát is. Az NMR időskálájához viszonyítva ezekben a komplexekben a ligandumcsere sebessége többnyire lassú, ami azt eredményezi, hogy a szabad és a koordinált ligandum mágneses rezonanciajelei különböző kémiai eltolódás (δ) értékeknél jelennek meg. A kémiai eltolódás értékének változása (a szabad ligandumhoz viszonyítva), a jelek száma és felhasadása információt szolgáltat a komplexek koordinációs módjáról, illetve az esetleges izomerekről.

A ligandumokat 99,8 %-os izotóptisztaságú D<sub>2</sub>O-ban oldottuk fel. A spektrumok felvételéhez 0,003 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú oldatokat készítettünk, és minden esetben 1:2 fémion-ligandum arányt alkalmaztunk. Az oldatok pH\* értékeit DCI- és NaOD-oldatok segítségével állítottuk be a kívánt értékre. A mérések során vizes közegbeli pufferre kalibrált pH-mérő által kijelzett értékek a D<sub>2</sub>O-oldatokban pH\* értékeknek felelnek meg. A pH\* értékeket az alábbi egyenlet<sup>141</sup> segítségével tudjuk átszámolni a pH-skálára:

$$\text{pH} = 0,930 \text{ pH}^* + 0,40 \quad (22)$$

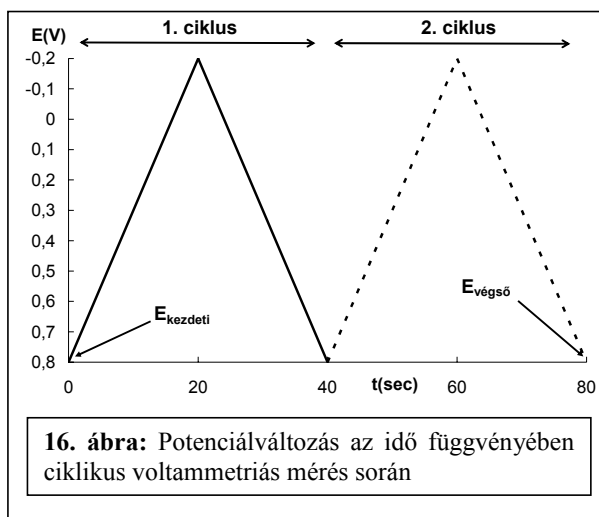
A <sup>1</sup>H NMR spektrumokat BRUKER AM360 MHz FT-NMR készüléken vettük fel, standardként nátrium-2,2-dimetil-2-szilapentán-5-szulfonsavat

(DSS) használtunk. A kapott spektrumokat az NMR spektrométer saját szoftverjével, illetve az 1D WINNMR programmal értékeltük ki.

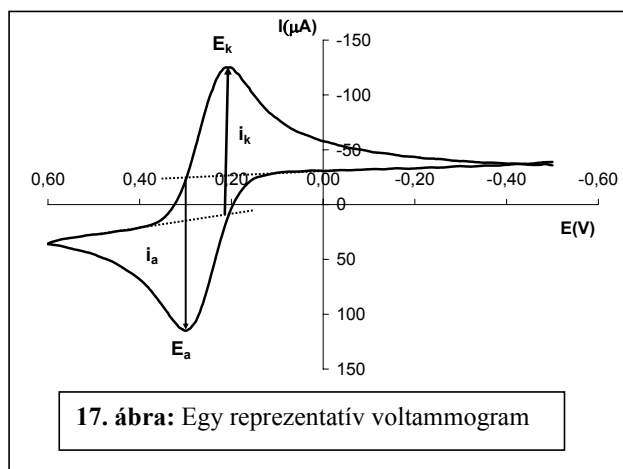
### 3.7. Ciklikus voltammetria

A Cu(II)-komplexek redoxipotenciál értékeit ciklikus voltammetria segítségével határoztuk meg. A ciklikus voltammetria egy sokoldalúan használható elektroanalitikai technika. Egyike azon vizsgálati módszereknek, mely segítségével a különböző kémiai vegyületek, biológiai anyagok vagy elektródák felületének elektrokémiai sajátosságát fel lehet térképezni (formálpotenciál meghatározás, komplexek látszólagos stabilitási állandójának meghatározása, reakciók mechanizmusának felderítése). Hatékonyságának köszönhetően széles potenciáltartományban lehet gyorsan elektrokémiai információkhoz jutni.

A ciklikus voltammetriában egy munkaelektrodon lineárisan változtatjuk a feszültséget egy kezdeti potenciál értéktől ( $E_{\text{kezdeti}}$ ) egy meghatározott feszültség értékig ( $E_{\lambda 1}$ ), melyet forduló potenciálnak nevezünk<sup>142,143,144</sup>. A potenciál változását egy referenciaelektrod potenciáljához képest mérjük, mely általában telített kalomel (SCE) vagy Ag/AgCl elektród. A 16. ábra segítségével nyomon követhetjük, hogy hogyan változik a potenciál az induló potenciálról a forduló értékig, majd vissza az eredeti értékre és a második ciklusban mindezen lépések ismétlődnek az idő függvényében.



Amennyiben a munkaelektrodon átfolyó áramerősségét ábrázoljuk a feszültség függvényében ciklikus voltammogramot kapunk. Egy reprezentatív voltammogramot mutatok be az 17. ábrán.



A kapott voltammogramból meghatározható a katódos ( $E_k$ ) és az anódos ( $E_a$ ) csúcspotenciál, amelyek számtani középértéke adja az ún. féllépcsőpotenciál-értéket.

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

A végbemenő folyamatra jellemző redoxipotenciál értéket a normál hidrogénelektrodra vonatkoztatva akkor kapjuk meg, ha ezt a féllépcsőpotenciál-értéket korrigáljuk az Ag/AgCl referenciaelektrod potenciálértékével.

$$E^0 = E_{1/2} + E^0(\text{Ag} / \text{AgCl}) \quad (24)$$

Lényeges információt hordoz a katódos és az anódos csúcspotenciálok különbsége, amelyet csúcsszeparációnak is nevezünk.

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

A csúcsszeparáció értékéből következtetni lehet a reakció mechanizmusára és a redoxi folyamatban résztvevő elektronok számára. Amennyiben a reakció reverzibilis, (vagyis a diffúziós koefficiens azonos az oxidált és a redukált formára), akkor a  $\Delta E$  érték  $0,059/n$  V lesz, ahol  $n$  a résztvevő elektronok száma.

A csúcspotenciálok mellett információ értékű a katódos és az anódos csúcsáram ( $i_k$  és  $i_a$ ) aránya is. Amennyiben egy folyamat reverzibilis, a két csúcsáram aránya egy.

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

Ciklikus voltammetriás méréseinket egy Metrohm gyártmányú 746 VA Trace Analyzer készülékkel végeztük el, amelyhez egy 747 VA Stand csatlakozott. A minták méréséhez klasszikus háromelektrodos rendszert használtunk. Referenciaelektródunk egy Ag/AgCl elektród volt 3 mol/dm<sup>3</sup>-es KCl háttélektrolittal (Metrohm: 6.0728.010 és elektroiltartó: 6.1245.010), segédelektrodként platina elektródot (Metrohm: 6.1247.010, elektródtartó: 6.1241.020), míg munkaelektrodként az adott rendszer várható redoxipotenciál értékének függvényében 3 mm átmérőjű szén (Metrohm: 6.1204.110) vagy platina (Metrohm: 6.1204.120) munkaelektrodot használtunk. Valamennyi esetben vizes oldatokat vizsgáltunk 25° C-on, az oldatok pH-ját KOH-oldattal és HNO<sub>3</sub>-oldattal állítottuk be a kívánt értékre, melyet a Medusa<sup>145</sup> program segítségével számolt eloszlási görbék alapján választottunk ki. A pH ellenőrzésére Metrohm 827 mobil pH-mérő készüléket és 6.0234.100 kombinált üvegelektrodot használtunk.

Minden esetben rögzítettük a deprotonált ligandum voltammogramját erősen bázikus közegben, és azt tapasztaltuk, hogy nem jelennek meg redoxi folyamatra utaló jelek a voltammogramban. A minták térfogata 10 cm<sup>3</sup> volt, a vizsgált komplexekben a réz(II)-ion koncentrációját 1·10<sup>-3</sup> mol/dm<sup>3</sup> és 1·10<sup>-4</sup> mol/dm<sup>3</sup> közötti értékre állítottuk be. A mérések során a legtöbb esetben tízszeres ligandumfelesleget alkalmaztunk. Bizonyos ligandumok esetében azonban csak igen kis mennyiség állt rendelkezésünkre, így le kellett csökkentenünk a mérendő minta térfogatát, hogy a szükséges ligandumfelesleget biztosítani tudjuk. Egy mikrocellát terveztünk ezen vizsgálatokhoz, amelyhez új elektródokat vásároltunk. Referenciaelektrodunk ugyancsak



**18. ábra:** Az általunk kifejlesztett mikrocella

egy Ag/AgCl elektród volt (BASI Instr. RE-5B, MF-2079), de ebben az esetben 3 mol/dm<sup>3</sup>-os NaCl-oldat volt a háttélektrolit. Segédelektrodként egy mikrocellában is alkalmazható platinaelektrodot használtunk (ALS Co. Japan), munkaelektrodként pedig 2 mm átmérőjű szén- (CHI104) és platinaelektrodot (CHI102). Mind a normálcéllát, mind a mikrocellát a [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>/[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> redoxi rendszerrel kalibráltuk, a mért redoxipotenciál



érték ( $E^0 = 0,452$  V) jó egyezésben volt a korábbi irodalmi adattal ( $E^0 = 0,458$  V)<sup>146</sup>.

A minták oxigénmentesítése argongázzal történt, amelyet minden mérés előtt legalább 5 percig buborékkoltattunk át a vizsgálni kívánt komplexek oldatán. A voltammogramokat az egyes réz(II)komplexek várható redoxipotenenciál értékeinek megfelelően megválasztott feszültségtartományban rögzítettük. Általánosan elmondhatjuk, hogy +0,800 V és -1,000 V közötti tartományban dolgoztunk. A feszültségtartomány pásztázására 10 mV/s és 200 mV/sec közötti pásztázási sebességet használtunk. A mérések vezérlését a gyártó cég által biztosított szoftverrel valósítottuk meg számítógép segítségével. A kapott voltammogramokat a CACYVO programmal értékeltük ki, és a leolvasott adatokból az (23), (24) és (26) egyenletek segítségével számoltuk ki a szükséges paramétereket.

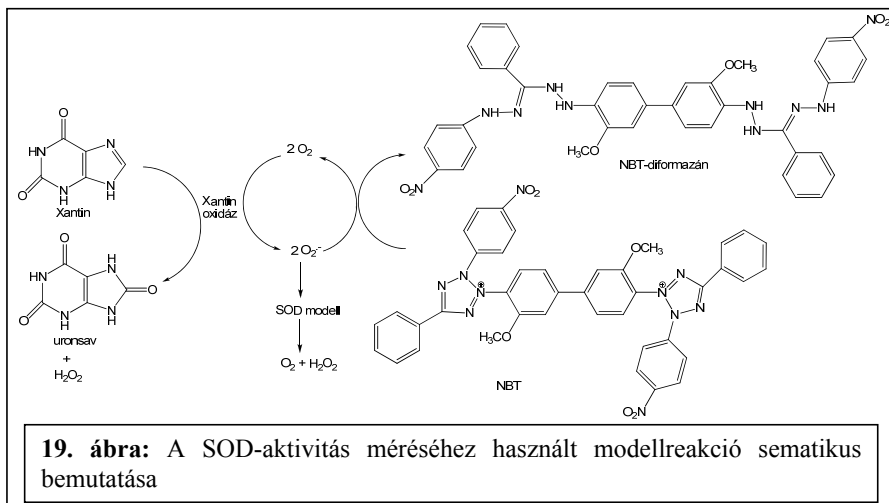
### 3.8. Szuperoxid-diszmutáz aktivitás vizsgálatok

A Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzim a szuperoxid gyökkanion diszproporcióját katalizálja ( $k \sim 2 \cdot 10^9$  s<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>dm<sup>3</sup>, pH = 7,4). Az enzim működését utánzó fémkomplexek aktivitása mérhető közvetlenül és közvetve is. A közvetlen mérés azonban elég költséges, emiatt ritkán használt eljárás<sup>112</sup>. A közvetett technikák közül az egyik legelterjedtebb módszer a xantin-xantin-oxidáz reakciójában *in situ* előállított szuperoxid gyökkanion és a nitroblue-tetrazólium-klorid (NBT) közötti reakció spektrofotometriás nyomon követése. SOD aktivitást mutató fémkomplex hiányában az NBT a keletkező szuperoxid hatására redukálódik diformazánná, és ez a redukció színváltozással jár, amelyet 560 nm-en lehet nyomon követni. Amennyiben aktívnek bizonyuló fémkomplexet adunk a mintához, az 560 nm-en mért abszorbancia csökkenést mutat. A modellreakció bemutatása a 19. ábrán látható.

A SOD akvititás méréseket H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> - HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> puffert tartalmazó közegben végeztük el ( $c = 5,0 \cdot 10^{-2}$  mol/dm<sup>3</sup>), az NBT-ből  $5,0 \cdot 10^{-2}$  mol/dm<sup>3</sup> oldatot készítettünk, a xantin koncentrációja  $1,0 \cdot 10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup> volt. A xantin oxidáz mennyiségét úgy állítottuk be, hogy az abszorbancia változás 560 nm-en 0,025 – 0,028 min<sup>-1</sup> érték közé essen. Az NBT redukcióját 480 másodpercig követtük nyomon változó koncentrációjú réz(II)komplex jelenlétében illetve annak távollétében, a [Cu(II)<sub>teljes</sub> = 0 –  $2,1 \cdot 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>] között változott. Összehasonlítás céljából a natív enzim SOD aktivitását is vizsgáltuk (pH 6,8:  $c_{\text{enzim}} = 3,75 \cdot 10^{-7}$  mol/dm<sup>3</sup> pH = 7,4:  $c_{\text{enzim}} = 4,92 \cdot 10^{-7}$  mol/dm<sup>3</sup>).

A SOD-aktivitással rendelkező vegyületek aktivitását az IC<sub>50</sub> értékkel szokás jellemezni. Ez azt a komplexkoncentrációt jelöli, amelynél a diformazán

képződése az enzimutató vegyület távollétében mért értékhez képest a felére csökken.



Gyakorlatilag ez azt jelenti, hogy adott pH-értéknél ábrázoljuk a Cu(II)-komplex koncentráció függvényében az inhibíció % görbét, és az 50 %-os inhibícióhoz tartozó komplexkoncentrációt határozzuk meg. Az inhibíció % definíció szerint:

$$\text{inhibíció}\% = \frac{\left(\frac{\Delta A}{idő}\right)^{vak} - \left(\frac{\Delta A}{idő}\right)^{komplex}}{\left(\frac{\Delta A}{idő}\right)^{vak}} \times 100 \quad (27)$$

ahol  $\left(\frac{\Delta A}{idő}\right)^{vak}$  = a fémkomplex hiányában mért abszorbanciaváltozás 560 nm-en

$\left(\frac{\Delta A}{idő}\right)^{komplex}$  = a fémkomplex jelenlétében mért abszorbanciaváltozás 560 nm-en

A  $c_{Cu(II)-komplex}$  és a kiszámított inhibíció adatokra Scientist program segítségével telítési görbét illesztettünk az alábbi egyenlet szerint<sup>112</sup>:

$$\text{inhibíció} = \frac{A \times c_{Cu(II)-komplex}}{B + A \times c_{Cu(II)-komplex}} \quad (28)$$

ahol A és B paraméterek. Az eredmények jobb összehasonlíthatósága érdekében az  $IC_{50}$  értékekből relatív aktivitás értékeket számoltunk, a következő egyenlet szerint:

$$\text{relatív aktivitás} = \frac{IC_{50}(\text{Cu, Zn} - \text{SOD})}{IC_{50}(\text{komplex})} \times 100 \quad (29)$$

## 4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

### 4.1. Oldategyensúlyi vizsgálatok

#### 4.1.1. A vizsgált ligandumok sav-bázis sajátosságai

Doktori munkám során valamennyi esetben védett peptidek sav-bázis és komplexképző sajátosságait vizsgáltam, ezért csak az oldallánc deprotonálódására jellemző állandók határozhatók meg. Ennek megfelelően az egy hisztidint tartalmazó tetrapeptid: az Ac-TKHM-NH<sub>2</sub> esetében a két deprotonálódási állandó az imidazolcsoport és a lizin aminocsoportja deprotonálódásához rendelhető. A két illetve három hisztidint tartalmazó peptidek esetében a kapott állandók az imidazolcsoportok deprotonálódását jellemzik. A három hisztidint tartalmazó ligandumok protonálódási állandóit korábban már meghatározták, így a méréseim során kapott értékeket összevetettük az irodalmi adatokkal, amelyekkel jó egyezést mutattak. Az egy- illetve két hisztidint tartalmazó ligandumok deprotonálódási állandóit a 3. táblázat, a három hisztidint tartalmazó ligandumokét a 4. táblázat foglalja össze.

Az Ac-TKHM-NH<sub>2</sub> tetrapeptid szintézisére azért került sor, mert munkám részben kapcsolódott a prion protein peptidfragmenseinek vizsgálatához. Ezen vizsgálatok során megállapították, hogy a 111-es helyen hisztidint tartalmazó fragmensekben az –MKHM– szekvenciának köszönhetően a 109-es helyen található metionon tioéter kénatomja is gyengén koordinálódik<sup>147</sup>. Ebből arra következtettek, ha más gyengén koordinálódó oldalláncot tartalmazó aminosavra cserélik le a metionint, akkor az szintén eredményezheti a kialakuló komplexek stabilitásának növekedését. Első lépésben szerinre cserélték a metionint; ebben az esetben is megfigyelték a stabilitás növekedését. Annak igazolására, hogy valóban az oldalláncbeli –OH-csoportnak tulajdonítható ez a viselkedés, a szerint treoninra cseréltük az Ac-TKHM-NH<sub>2</sub> vizsgált tetrapeptidben.

**3. táblázat:** Az egy- illetve két hisztidint tartalmazó ligandumok deprotonálódási állandói (I = 0,20 mol/dm<sup>3</sup>, T = 298 K)

	Ac-TKHM-NH <sub>2</sub>	Ac-HGH-NHMe	Ac-HGGH-NH <sub>2</sub>
pK <sub>1</sub>	6,18(2)	6,07(3)	6,04(1)
pK <sub>2</sub>	–	6,80(4)	6,84(1)
pK(Lys)	10,25(2)	–	–

**4. táblázat:** A három hisztidint tartalmazó ligandumok deprotonálódási állandói ( $I = 0,20 \text{ mol/dm}^3$ ,  $T = 298 \text{ K}$ )

	Ac-HHGH-NH <sub>2</sub>	Ac-HAHVH-NH <sub>2</sub>	Ac-HGHVH-NH <sub>2</sub>	Ac-HVHGH-NH <sub>2</sub>
pK <sub>1</sub>	5,79(1)	5,76(1)	5,66(2)	5,73(1)
pK <sub>2</sub>	6,27(1)	6,31(1)	6,41(3)	6,26(1)
pK <sub>3</sub>	6,90(1)	7,00(1)	6,81(3)	6,86(1)

A pK-értékek közötti kis különbség arra utal, hogy az imidazolnitrogének deprotonálódása egymással átfedő lépésekben játszódik le. A treonint tartalmazó tetrapeptidben a lizin pK-értéke jó egyezést mutat az azonos pozícióban lizint tartalmazó peptidre publikált adattal (pK(Lys) = 10,28<sup>148</sup>).

#### 4.1.2. A vizsgált ligandumok réz(II)komplexei

Két ligandum esetében tanulmányoztuk a réz(II)ionok jelenlétében bekövetkező komplexképződést. Ezen vizsgálatok eredményeit két részre bontva mutatom be.

##### 4.1.2.1. A Cu(II)-Ac-TKHM-NH<sub>2</sub> rendszer vizsgálata

A Cu(II)-Ac-TKHM-NH<sub>2</sub> rendszer esetében 1:1,1 fémion/ligandum aránynál 10%-os ligandumfelesleg mellett végeztünk vizsgálatokat. Az 5. táblázatban a kialakuló komplexek stabilitási állandóit foglaltam össze, összehasonlításképpen pedig az N-terminális részen szerint valamint metoxiszerint tartalmazó tetrapeptidek adatai szerepelnek.

**5. táblázat:** A Cu(II)-Ac-TKHM-NH<sub>2</sub> képződő komplexek stabilitási állandói összehasonlítva két hasonló szerkezetű peptiddel ( $I = 0,20 \text{ mol/dm}^3$ ,  $T = 298 \text{ K}$ )

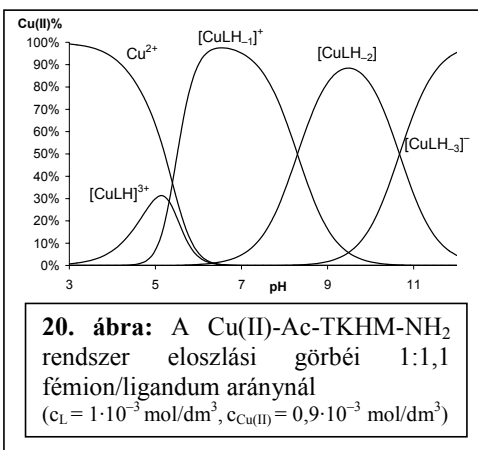
	Ac-TKHM-NH <sub>2</sub>	Ac-SKHM-NH <sub>2</sub> <sup>149</sup>	Ac-S(Ome)KHM-NH <sub>2</sub> <sup>149</sup>
[CuHL] <sup>3+</sup>	14,29(4)	13,52(2)	13,70(2)
[CuH <sub>-1</sub> L] <sup>+</sup>	3,65(2)	3,34(2)	2,29(1)
[CuH <sub>-2</sub> L]	-4,65(2)	-4,41(3)	-6,37(1)
[CuH <sub>-3</sub> L] <sup>-</sup>	-15,32(3)	-15,19(4)	-16,87(1)
pK([CuLH] <sup>3+</sup> / [CuLH <sub>-1</sub> ] <sup>+</sup> ) <sub>átlag</sub>	5,32	5,09	5,71
pK([CuLH <sub>-1</sub> ] <sup>+</sup> / [CuLH <sub>-2</sub> ])	8,30	7,75	8,66
pK(Lys)	10,67	10,78	10,50

A komplexképződés már 3-as pH-n megkezdődik (20. ábra), első lépésben a  $[\text{CuLH}]^{3+}$  komplex alakul ki, amelyben a fémion-kötőhely a hisztidin imidazolnitrogénje. Ezt a kötőmódot az is alátámasztja, hogy a CD spektrumban nem látunk aktivitást, és a spektroszkópiás paraméterek is 1N-es koordinációra utalnak. Látható, hogy a legstabilisabb  $[\text{CuLH}]^{3+}$  komplex a treonint tartalmazó peptiddel képződik (5. táblázat).

Az imidazolnitrogénhez való koordinálódás lehetővé teszi a hisztidint megelőző két amidnitrogén kooperatív deprotonálódását és koordinációját. Az amidnitrogének deprotonálódása már 5,5-ös pH-értéken elkezdődik, és az  $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  koordinációval kialakuló részecske az uralkodó az 5,5-7,0-es pH-tartományban.

Hasonló kooperativitást figyeltek meg olyan peptidok esetében, amelyek a peptidlánc belső pozíciójában tartalmaznak hisztidint<sup>150</sup>. A kialakuló  $[\text{CuLH}_1]^+$  (valójában:  $[\text{Cu}(\text{LH}_2)\text{H}]^+$ ) részecske szabad koordinációs helyeinek köszönhetően a gyengén koordinálódó  $-\text{OH}$ -csoportot tartalmazó oldallánc is fémion-megkötőként lép fel. Az alkoholos  $-\text{OH}$ -csoport gyenge axiális kölcsönhatása elősegíti az amidnitrogének deprotonálódását. Ezt jól tükrözik az Ac-TKHM-NH<sub>2</sub> és az Ac-SKHM-NH<sub>2</sub> esetén kapott amidnitrogének deprotonálódását jellemző állandók, amelyek kisebbek, mint a metoxi-származékokra jellemző adat, ahol erre a koordinációra nincs lehetőség.

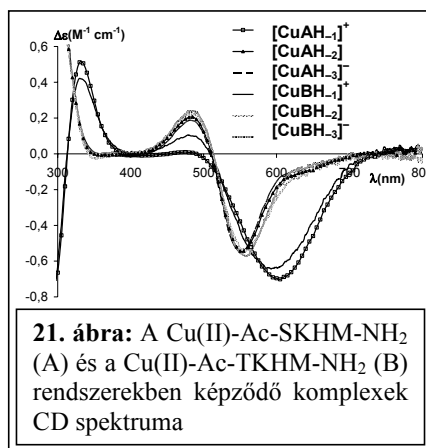
Még egy további amidnitrogén deprotonálódásával 4N-es koordináció alakul ki,  $[\text{CuLH}_2]$  komplex képződik. Mindkét említett komplexben a lizin protonált formában van jelen. Mind a  $[\text{CuLH}_2]$ , mind a  $[\text{CuLH}_3]^-$  komplex CD és abszorpciós spektruma hasonló lefutású (6. táblázat), ami arra utal, hogy a nemkoordinálódó lizin oldallánc deprotonálódása játszódik le a  $[\text{CuLH}_2] = [\text{CuLH}_3]^- + \text{H}^+$  folyamatban. Ezt támasztja alá az is, hogy a deprotonálódásra jellemző pK-érték megfelel a szabad ligandum lizin csoportjának deprotonálódását jellemző pK-értéknek.



**6. táblázat:** A Cu(II)-Ac-TKHM-NH<sub>2</sub> rendszerben képződő komplexek spektrális adatai ( $\lambda_{\max}$  (nm),  $\epsilon$  (dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) a: széles jel

	kötésmód	Ac-TKHM-NH <sub>2</sub>	Ac-SKHM-NH <sub>2</sub> <sup>149</sup>	Ac-S(OMe)KHM-NH <sub>2</sub> <sup>149</sup>
UV-Vis ( $\lambda_{\max}/\epsilon$ )	N <sup>-</sup> , N <sup>-</sup> , N(Im)	591/57	592/68	610/89
	N <sup>-</sup> , N <sup>-</sup> , N <sup>-</sup> , N(Im)	551/83	554/80	520/104
CD ( $\lambda_{\max}/\epsilon$ )	N <sup>-</sup> , N <sup>-</sup> , N(Im)	592/-0,66	605/-0,70	635/-0,28 525/+0,29
	N <sup>-</sup> , N <sup>-</sup> , N <sup>-</sup> , N(Im)	558/-0,57	550/-0,54	665/+0,32
		479/+0,24	480/+0,19	570/-0,50 <sup>a</sup> 495/-0,66

Ugyancsak erre utal, hogy az Ac-TKHM-NH<sub>2</sub> [CuLH<sub>1</sub>]<sup>+</sup> komplexének CD spektruma hasonló az Ac-SKHM-NH<sub>2</sub> [CuLH<sub>1</sub>]<sup>+</sup> spektrumához (21. ábra), ugyanakkor mindkettő jelentősen eltér más tetrapeptidekétől. Összességében megállapíthatjuk, hogy a lizin -NH<sub>2</sub>-csoportja és treonin vagy a szerin -OH-csoportja között kialakuló hidrogénkötés konformációváltozást okoz, ami szintén felelős lehet az amidnitrogének deprotonálásáért.



#### 4.1.2.2. A Cu(II)-Ac-HGGH-NH<sub>2</sub> rendszer vizsgálata

Szintén a Cu(II)-ionok jelenlétében való komplexképződést vizsgáltuk az Ac-HGGH-NH<sub>2</sub> tetrapeptid esetében, 1:3, 1:2, 1:1 és 2:1 fémion/ligandum arányoknál. Az oldatban kialakuló komplexekre számított stabilitási állandókat a 7. táblázat foglalja össze.

A [CuL]<sup>2+</sup> komplex nagy termodinamikai stabilitása összhangban van a korábban vizsgált, két- illetve három hisztidint tartalmazó védett peptidek hasonló komplexére jellemző értékkel. A meghatározott állandó azonban

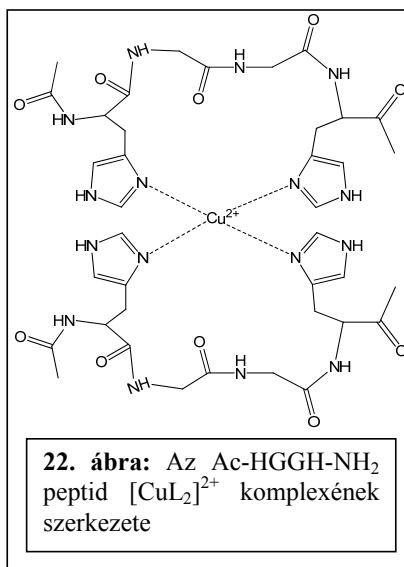
kisebb, mint amit a HXH szekvenciát tartalmazó peptidokra korábban meghatároztak.

**7. táblázat:** A vizsgált és összehasonlításként használt ligandumok Cu(II)-komplexeinek stabilitási állandói ( $I = 0,20 \text{ mol/dm}^3$ ,  $T = 298 \text{ K}$ )

	Ac-HGGH-NH <sub>2</sub>	Ac-HGH-NHMe <sup>80</sup>	Ac-HVVH-NH <sub>2</sub> <sup>81</sup>	Ac-HHGH-NH <sub>2</sub> <sup>80</sup>
[CuLH] <sup>3+</sup>	–	10,69	–	12,79
[CuL] <sup>2+</sup>	5,97(1)	6,32	5,79(1)	7,22
[CuLH <sub>1</sub> ] <sup>+</sup>	–	–0,11	–1,05(2)	0,79
[CuLH <sub>2</sub> ]	–7,88(2)	–5,91	–9,21(2)	–6,12
[CuLH <sub>3</sub> ] <sup>–</sup>	–16,10(3)	–16,01	–17,60(3)	–15,24
[CuLH <sub>4</sub> ] <sup>2–</sup>	–	–	–	–26,43
[CuL <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	9,79(3)	10,62	9,52(4)	–
pK([CuLH] <sup>3+</sup> / [CuL] <sup>2+</sup> )	–	4,37	–	5,57
pK([CuL] <sup>2+</sup> / [CuLH <sub>1</sub> ] <sup>+</sup> )	6,925	6,43	6,84	6,43
pK([CuLH <sub>1</sub> ] <sup>+</sup> / [CuLH <sub>2</sub> ])	–	5,80	8,16	6,91
pK([CuLH <sub>2</sub> ] / [CuLH <sub>3</sub> ] <sup>–</sup> )	8,22	10,10	8,39	9,12
pK([CuLH <sub>3</sub> ] <sup>–</sup> / [CuLH <sub>4</sub> ] <sup>2–</sup> )	–	–	–	11,19
lg(K <sub>1</sub> /K <sub>2</sub> )	2,15	2,02	2,06	–

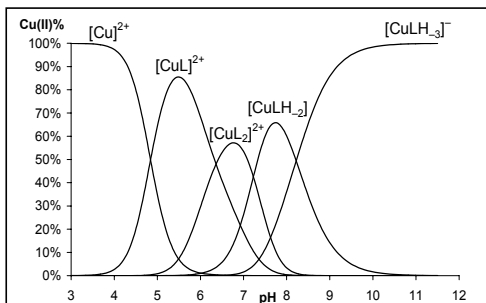
A [CuL<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> összetétellel leírható biszkomplex mennyisége jelentős, ami a tetrapeptid kis méretével magyarázható. Ebben a komplexben a fémion négy imidazolnitrogénon keresztül koordinálódik (22. ábra).

Az imidazolnitrogének koordinációja nem tudja megakadályozni az amidnitrogének deprotonálódását, amely nagyobb pH-értékeken lejátsszódik. [CuLH<sub>1</sub>]<sup>–</sup> komplex képződését nem sikerült kimutatni, ezen ligandum esetében is kooperatív módon deprotonálnak az amidnitrogének. 8-as pH-értéken a [CuLH<sub>2</sub>] komplex az uralkodó részecske az oldatban (23. ábra). Ezen részecske

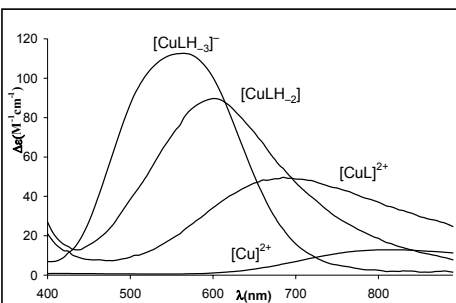


képződését a kisebb hullámhosszak felé való jelentős eltolódás kíséri az UV-látható spektrumban, és az abszorpciós maximum intenzitása megnövekszik. A jellemző abszorpciós maximum értéke PSEQUAD programmal kiszámítható, 600 nm-nél van (24. ábra), ami jó egyezést mutat az [N<sup>–</sup>, N<sup>–</sup>, N(Im)]





**23. ábra:** A Cu(II)-Ac-HGGH-NH<sub>2</sub> rendszer eloszlási görbéi 1:2 fémion/ligandum arányánál ( $c_L = 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ ,  $c_{\text{Cu(II)}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ )



**24. ábra:** A Cu(II)-Ac-HGGH-NH<sub>2</sub> rendszerben képződő részecskék felbontott UV-látható spektruma 1:1 fémion/ligandum arányánál

koordinációs módra vonatkozó empirikus képlettel számolt értékkel<sup>136</sup>. Ez a maximum arra utal, hogy a HXH szekvenciát tartalmazó peptidekkel ellentétben az N-terminális hisztidin koordinációja nem feltételezhető. Korábban az Ac-HVVH-NH<sub>2</sub> peptid vizsgálatánál is hasonló következtetésre jutottak<sup>81</sup>.

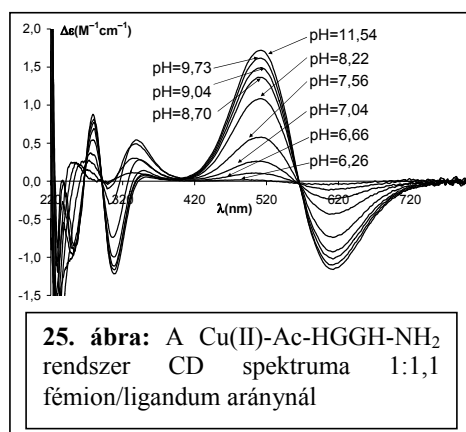
A harmadik amidnitrogén deprotonálódása a [CuLH<sub>3</sub>]<sup>-</sup> komplex képződéséhez vezet. A folyamatot jellemző pK(amid)-érték kisebb, mint amit a HXH szekvenciát tartalmazó peptidok esetén kaptak. Ez alátámasztja azt a tényt, hogy a [CuLH<sub>2</sub>] komplexet nem stabilizálja az N-terminális hisztidin koordinációja. Az abszorpciós spektrumban 565 nm-nél jelentkező elnyelési maximum torzult síknégyszetes geometriára utal. Ez a hullámhosszérték nagyobb, mint amit Billo egyenlete (3.4. fejezet, (19) egyenlet) alapján kiszámolhatunk ( $\lambda_{\text{max}} = 521 \text{ nm}$ )<sup>136</sup> vagy amit az Ac-HVVH-NH<sub>2</sub><sup>81</sup> és az Ac-HXH<sub>2</sub>YH-NH<sub>2</sub><sup>82</sup> peptidok [CuLH<sub>3</sub>]<sup>-</sup> komplexeire kaptak. A különböző ligandumok [CuLH<sub>2</sub>] és [CuLH<sub>3</sub>]<sup>-</sup> komplexeire jellemző spektrális adatokat a 8. táblázat foglalja össze.

Egy lehetséges magyarázat a  $\lambda_{\text{max}}$  értékek eltérésére az N-terminális hisztidin imidazolnitrogénjének gyenge axiális kölcsönhatása, a komplexben ugyanis a fémion három amid- és egy imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik. Hasonló eltolódást figyeltek meg az abszorpciós spektrumban a Cu(II)-Z-GGH-OH rendszerben a [CuLH<sub>3</sub>]<sup>-</sup> komplex képződésével párhuzamosan<sup>62</sup>. Ebben az esetben is azt feltételezték, hogy a három amid- és egy imidazolnitrogén koordinációjával kialakuló komplex szerkezete nem planáris, hanem torzult.

**8. táblázat:** Cu(II)komplexek látható és CD spektroszkópiás adatai ( $\lambda_{\max}$  (nm),  $\epsilon$  (dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>))

	[CuLH <sub>2</sub> ]		[CuLH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	
	UV	CD	UV	CD
	$\lambda_{\max}$ ( $\epsilon$ )	$\lambda_{\max}$ ( $\epsilon$ )	$\lambda_{\max}$ ( $\epsilon$ )	$\lambda_{\max}$ ( $\epsilon$ )
<b>Ac-HGH-NHMe</b> <sup>80</sup>	566 (105)	575 (+0.30) 502 (+0.32) 350 (+1.08) 303 (-1.04)	torzult	592 (+1.41) 475 (-0.64) 318 (+1.87) 281 (-0.70)
<b>Ac-HGGH-NH<sub>2</sub></b>	600 (85)	608 (-0.43) 513 (+0.58) 302 (-0.30) 275 (+0.37)	565 (114)	612 (-1.16) 512 (+1.72) 308 (-1.16) 279 (+0.88)
<b>Ac-HVVH-NH<sub>2</sub></b> <sup>81</sup>	590 (87)	–	515 (121)	636 (+0.66) 488 (-1.82) 320 (+2.10) 259 (+5.91)
<b>Ac-HHGH-NH<sub>2</sub></b> <sup>80</sup>	568 (108)	573 (+0.41) 347 (+1.53) 300 (-1.25)	torzult	588 (+0.94) 473 (-0.42) 331 (+1.66) 291 (-0.77)
<b>Ac-HVHGH-NH<sub>2</sub></b> <sup>82</sup>	560 (139)	550-600 (széles jel) 500 (+0.26) 330 (+0.45)	545 (132)	600 (+1.13) 480 (-0.94) 320 (+2.08)

A 25. ábrán a Cu(II)-Ac-HGGH-NH<sub>2</sub> rendszer CD spektrumának pH-függését mutatom be 1:1,1 fémion/ligandum arányánál. A CD vizsgálatok során aktivitást csak az amidnitrogének deprotonálódásával párhuzamosan tudtunk mérni. A CD spektrum különbözik a korábban vizsgált hisztidint tartalmazó peptidek CD spektrumától; a d-d átmenethez tartozó Cotton-effektus előjele ellentétes azzal, mint amit például a Cu(II)-Ac-HVVH-NH<sub>2</sub> rendszerben felvett CD spektrumokon látunk. Abban az esetben, ha a peptid a C-terminális végtől számított harmadik pozícióban tartalmaz glicint, ezt már korábban is megfigyelték<sup>151</sup>.



**25. ábra:** A Cu(II)-Ac-HGGH-NH<sub>2</sub> rendszer CD spektruma 1:1,1 fémion/ligandum arányánál

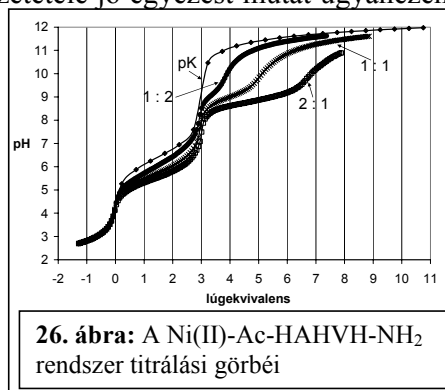
### 4.1.3. A vizsgált ligandumok nikkel(II)komplexei

Két- illetve három hisztidint tartalmazó ligandumok esetében a nikkel(II)- és a kobalt(II)ionok jelenlétében való komplexképződési sajátosságokat tanulmányoztuk. Először a nikkel(II)komplexek vizsgálata során kapott eredményeket és az ezekből levont következtetéseket mutatom be.

A nikkel(II) komplexeket az Ac-HGH-NHMe, Ac-HGGH-NH<sub>2</sub>, Ac-HHGH-NH<sub>2</sub>, Ac-HAHVH-NH<sub>2</sub>, Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub>, Ac-HVHGH-NH<sub>2</sub> ligandumok esetében vizsgáltuk. A nikkel(II)iont tartalmazó rendszerek vizsgálata során különböző fémion/ligandum aránynál végeztünk pH-potenciometriás és spektroszkópiás méréseket, amelyeket 1:3 és 2:1 között állítottunk be. A kialakuló komplexek összetétele jó egyezést mutat ugyanezen ligandumok réz(II)komplexeivel.

Valamennyi ligandum esetén 1:1 összetételű komplexek keletkeznek mind ekvimoláris, mind ligandumfelesleget tartalmazó oldatban. Biszkomplexek képződése csak a rövidebb peptidok esetében feltételezhető. A pentapeptidok oldataiban fémionfelesleget tartalmazó rendszerekben kétmagvú komplexek is megjelennek. A képződő komplexek stabilitási állandóit a 9. táblázatban foglaltam össze. A vizsgált pentapeptidok nikkel(II)iont tartalmazó oldataiban a komplexképződés egy egységgel nagyobb pH-n indul el, mint ahogy az a réz(II)iont tartalmazó rendszerek esetében megfigyelhető volt. Ezt jól szemléltetik a Ni(II)-Ac-HAHVH-NH<sub>2</sub> rendszer titrálási görbéi is a 26. ábrán.

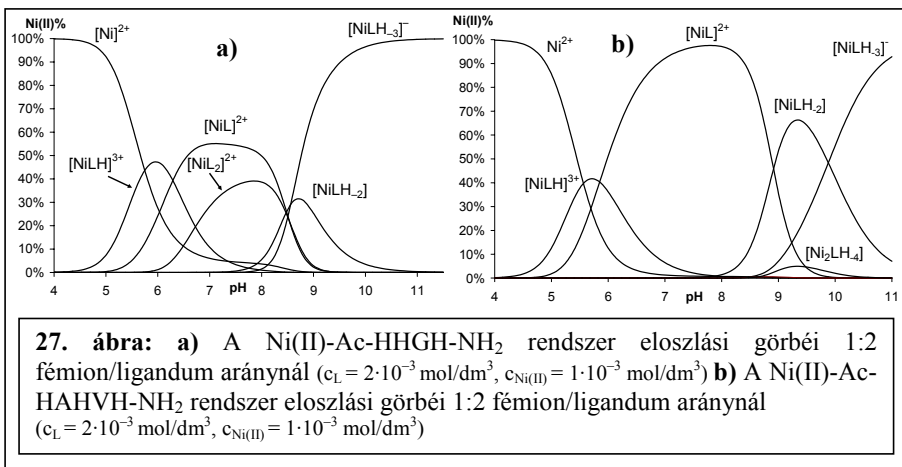
Minden peptid (kivéve: Ac-HGGH-NH<sub>2</sub>) esetében [NiLH]<sup>3+</sup> komplex van jelen a gyengén savas pH-tartományban, míg a fiziológiás pH-tartományban (pH 6-7) a [NiL]<sup>2+</sup> és az Ac-HGH-NHMe valamint az Ac-HHGH-NH<sub>2</sub> ligandumok esetében a [NiL<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> komplex az uralkodó (27. ábra). A különböző peptidokkal képződő két imidazolnitrogénes koordinációt tartalmazó komplexek stabilitása hasonló egymáshoz, amit a 9. táblázat logK(M+ 2N(Im)) állandói is mutatnak (3.3 fejezet, (17) egyenlet). Ezek az értékek nagyobbak, mint ami az egy imidazolnitrogénes koordinációt tartalmazó komplexekre jellemző (például: Ni(II)-Ac-His-NHMe, logK (NiL) = 2,48<sup>147</sup>).



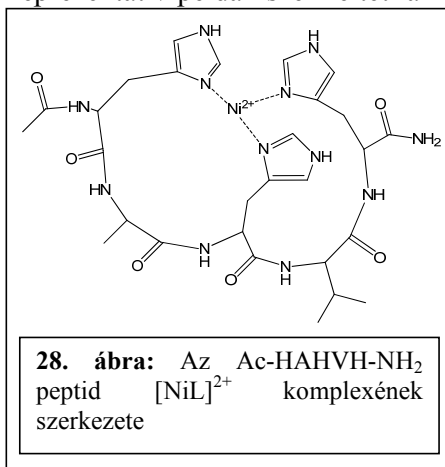
9. táblázat: A vizsgált ligandumok Ni(II)-komplexjeinek stabilitási állandói ( $I = 0,20 \text{ mol/dm}^3$ ,  $T = 298 \text{ K}$ )

	Ac-HGH-NHMe	Ac-HGGH-NH <sub>2</sub>	Ac-HHGH-NH <sub>2</sub>	Ac-HAHVH-NH <sub>2</sub>	Ac-HGHVH-NH <sub>2</sub>	Ac-HVHGH-NH <sub>2</sub>
[NiLH] <sup>3+</sup>	9,32(5)	-	10,65(2)	11,04(1)	10,80(2)	10,83(2)
[NiL] <sup>2+</sup>	4,02(1)	3,70(5)	4,36(2)	5,20(1)	5,36(1)	4,80(2)
[NiLH <sub>2</sub> ]	-13,28(1)	-	-12,60(3)	-12,62(2)	-13,17(2)	-12,59(3)
[NiLH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-22,17(1)	-21,81(5)	-21,16(2)	-22,49(2)	-22,46(1)	-22,04(4)
[NiL <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	6,93(3)	-	7,47(7)	-	-	-
[Ni <sub>2</sub> LH <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	-	-	-	-9,24(3)	-9,75(9)	-8,91(8)
[Ni <sub>2</sub> LH <sub>4</sub> ]	-	-	-	-26,55(1)	-26,60(1)	-25,73(3)
[Ni <sub>2</sub> LLH <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	-	-	-	-36,74(2)	-	-35,64(6)
$pK([NiLH]^{3+} / [NiL]^{2+})$	5,30	-	6,29	5,84	5,44	6,03
$pK([NiL]^{2+} / [NiLH_2])$ átlag	8,65	-	8,48	8,91	9,265	8,70
$pK([NiLH_2] / [NiLH_3]^{-})$	8,89	8,50	8,56	9,87	9,29	9,45
$pK([Ni_2LH_2]^{2+} / [Ni_2LH_4])$ átlag	-	-	-	10,19	8,43	8,41
$\log K(M + 2N(Im))$	4,02	3,70	3,75	4,21	3,87	3,91
$\log K(M + 3N(Im))$	-	-	4,36	5,20	5,36	4,80

Hasonlóan ezen peptidek Cu(II)-komplexeihez a három imidazolnitrogénes koordinációt tartalmazó komplexek stabilitása nagyobb, mint az egy- illetve a két imidazolnitrogénes koordinációt tartalmazó komplexeké. Ezek a komplexek a fő részecskék a három hisztidint tartalmazó peptidek esetében (27. ábra) mind ekvimoláris, mind fémionfelesleget tartalmazó oldatban.



Ezen komplex kötésviszonyait egy reprezentatív példán szemlélteti a 28. ábra. Ha összehasonlítjuk a különböző vizsgált peptidek  $[NiL]^{2+}$  komplexeinek stabilitási állandóit, azt látjuk, hogy a koordinált imidazolnitrogének számának növekedése növeli a kialakuló komplex stabilitását. Abban az esetben, ha a hisztidinek egymástól két aminosav távolságra helyezkednek el, csökken a komplex stabilitása, amit jól szemléltet az, hogy az Ac-HGH-NHMe peptid  $[NiL]^{2+}$  komplexének  $\log \beta$  értéke 4,02, amíg az Ac-HGGH-NH<sub>2</sub> peptid azonos összetételű komplexét 3,70-es  $\log \beta$  érték jellemzi. Ezen komplexek oktaéderez geometriájúak, amelyet az abszorpciós spektrumban 370 és 600 nm-nél megjelenő kis intenzitású sáv is alátámaszt (10. táblázat).



8-9-es pH-tartományban újabb lúgfogyasztó folyamatok indulnak el mindegyik rendszer esetében (26. ábra), amelyek az amidnitrogének deprotonálódására és koordinálódására utalnak. Ez azt jelenti, hogy a  $[NiL]^{2+}$  komplexek nagyobb stabilitása nem tudja megakadályozni a peptidnitrogének

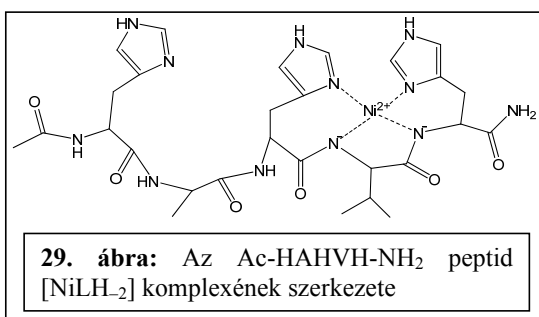
10. táblázat: Nikkel(II)komplexek látható és CD spektroszkópiás adatai ( $\lambda_{\max}$  (nm),  $\epsilon$  (dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), aa: torzult jel

	[NiL] <sup>2+</sup>		[NiLH <sub>2</sub> ]		[NiLH <sub>3</sub> ]	
	UV $\lambda_{\max}$ ( $\epsilon$ )	CD $\lambda_{\max}$ ( $\epsilon$ )	UV $\lambda_{\max}$ ( $\epsilon$ )	CD $\lambda_{\max}$ ( $\epsilon$ )	UV $\lambda_{\max}$ ( $\epsilon$ )	CD $\lambda_{\max}$ ( $\epsilon$ )
<b>Ac-HGH-NHMe</b>	635 (12)	-	470 (166)	-	485 (176) széles jel 445 (208)	499 (+3.69) 422 (-2.85) 278 (+4.44)
<b>Ac-HGGH-NH<sub>2</sub></b>	638 (10)	-	-	-	434 (165) aa	502 (-3.91) 420 (+5.71) 228 (-8.45)
<b>Ac-HHGH-NH<sub>2</sub></b>	638 (11)	-	442 (143)	505 (+2.55) 420 (-2.80) 255 (+8.97)	443 (187) aa	230 (+10.59) 500 (+2.55) 425 (-4.37) 265 (+8.07)
<b>Ac-HAHVH-NH<sub>2</sub></b>	615 (25) 365 (61)	-	450 (121)	505 (+1.24) 425 (+0.40) 295 (-3.82)	440 (196)	255 (+11.5) 535 (+0.41) 425 (-2.19) 260 (+7.83)
<b>Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub></b>	593 (13) 370 széles jel	-	465 (147)	515 (+2.21) 430 (+1.45) 300 (-1.87)	445 (245)	250 (+9.66) 500 (+2.88) 425 (-2.18) 280 (+4.50)
<b>Ac-HVHGH-NH<sub>2</sub></b>	624 (15) 374 (54)	-	442 (132)	505 (+3.60) 420 (-2.40) 255 (14.51)	442 (207) aa	255 (+14.51) 500 (+3.60) 425 (-3.77) 275 (+7.68)

deprotonálódását. A  $[\text{NiLH}_1]$  komplex képződését a szabad karboxilcsoportot tartalmazó peptideknél megfigyelték, de a védett származékoknál ezen komplex mennyisége elhanyagolható. Így a  $[\text{NiLH}_2]$  komplex képződése egy kooperatív deprotonálódási folyamat eredménye, és a deprotonálódáshoz tartozó átlagos  $\text{pK}$ -értékek összehasonlíthatóak. Ezek az értékek 8,6 és 9,4 közé esnek, ami azt jelenti, hogy a  $[\text{NiL}]^{2+}$  komplex képződése nagyobb  $\text{pH}$ -értékek felé tolja el az amidnitrogének deprotonálódását (összehasonlításképpen: oligoglicinek esetében  $(\text{Gly})_4$ :  $\text{pK}_{\text{átlag}}(\text{amid}) = 7,9^{152}$ ;  $(\text{Gly})_3$ :  $\text{pK}_{\text{átlag}}(\text{amid}) = 8,3^{153}$ ).

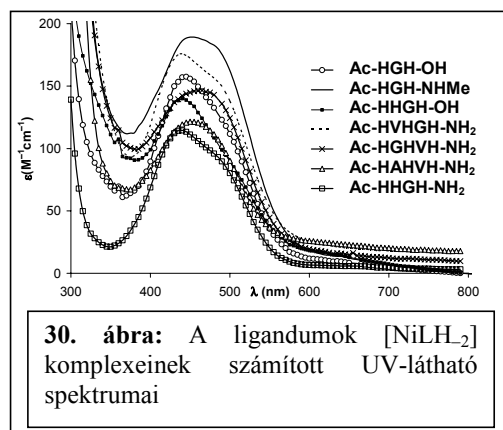
A  $[\text{NiLH}_2]$  komplexben az  $[\text{N}(\text{Im}), \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  donorszetten keresztül koordinálódik a fémion (29. ábra), ez a koordinációs mód pedig

síknégyszetes geometria kialakulásához vezet. A komplex képződését egy intenzív sáv megjelenése kíséri az UV-látható spektrumban 440-470 nm-nél (10. táblázat). A  $\text{Ni}(\text{II})$ -peptid rendszerek 27. ábrán bemutatott eloszlási görbéiből látszik, hogy a  $\text{pH}$ -tartományban nem találunk olyan  $\text{pH}$ -értéket, amelyen a  $\text{Ni}(\text{II})$ -ionok teljes mennyisége a  $[\text{NiLH}_2]$



komplexben lenne jelen, ezért a mérések során kapott UV-látható spektrumokat a PSEQUAD számítógépes program

segítségével bontottuk fel, és meghatároztuk az egyes részecskék egyedi spektrumát. A 30. ábrán bemutatott spektrumok elemzése során megfigyelhetjük, hogy a kisebb és a nagyobb tagszámú peptidek spektrumai között vannak különbségek (a jobb összehasonlítás céljából két nemvédett származék (Ac-HGH-OH és az Ac-HHGH-OH  $[\text{NiLH}_2]$  komplexének spektrumát is feltüntettem). A tripeptidek

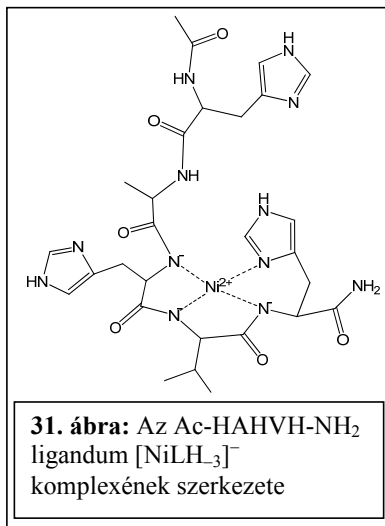


esetében egy keskeny abszorpciós sáv jelenik meg, míg a tetrapeptidek és a pentapeptidek esetében egy széles, vállal rendelkező sávot látunk. Ezen spektrális viselkedést azzal magyarázzuk, hogy a  $[\text{NiLH}_2]$  összetételhez

többféle izomerkomplex tartozhat. Hasonlóan széles elnyelési sávok jelentek meg a pentapeptidok Cu(II)-komplexeinek abszorpciós spektrumában is.

A pH további növelésével (9-10-es pH-tartomány) egy újabb amidnitrogén deprotonálódása játszódik le, amely a  $[\text{NiLH}_3]^-$  komplex képződéséhez vezet erősen lúgos oldatban. A deprotonálódásra jellemző pK-érték 1-2 logaritmus egységgel nagyobb, mint ami a Ni(II)-(Gly)<sub>4</sub> rendszert jellemzi (pK<sub>3</sub>(amid) = 8,1<sup>152</sup>). A komplexben a fémion az  $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  donorszettel keresztül koordinálódik (31. ábra), ahol a tetra- és a pentapeptidok esetében a harmadik amidnitrogén egy belső vagy N-terminális amidnitrogén, és egy acetamidonitrogén a tripeptidok komplexében. Ez azt jelenti, hogy a  $[\text{N}(\text{Im}), \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  koordinációs mód stabilizálja a  $[\text{NiLH}_2]$  komplexet 7, 5 és 6-tagú csatolt kelátrendszer képződése közben. Ezenkívül azt is tudjuk, hogy az acetamidocsoport deprotonálódása általában nagyobb pH-n játszódik le, mint a peptid amidcsoportjának deprotonálódása. Ugyan a fémion körüli koordinációs szférában változnak a donorcsoportok, a komplex geometriája nem változik meg. Mindegyik peptid esetében hasonló lefutású spektrumokat kaptunk, amelyekben egy széles sáv jelenik meg 400 nm környékén az abszorpciós spektrumban. Ez a sáv alátámasztja a kialakuló komplexek síknégyzetes geometriáját. Hasonlóan széles sáv jelent meg korábban az Ac-GGH-OH, GGH és GGGH peptidok Ni(II)-komplexeinek spektrumában is; egy nagyobb intenzitású sáv 425-430 nm környékén egy 480-485 nm-nél jelentkező vállal<sup>154</sup>. Két másik ligandum: a GGGG és az AAA esetében keskenyebb sávok jelentek meg 412 nm-nél és 426 nm-nél. Az UV-látható spektrumaink felbontása során NiLH<sub>3</sub> komplexekre kapott spektrumok hasonlóak a korábban kapott spektrumokhoz, amely egyértelműen a nikkel(II)ion körüli azonos koordinációs környezetre  $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  utal.

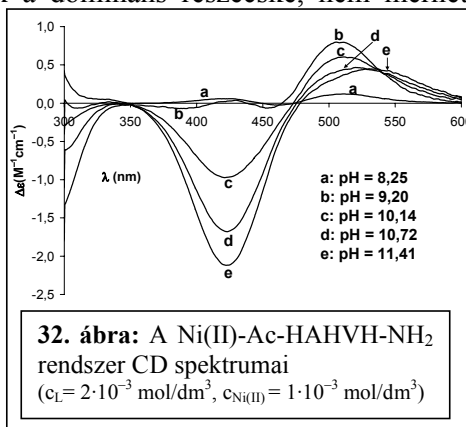
A komplexek szerkezetének pontosabb megadása céljából CD spektroszkópiás méréseket is végeztünk. Ezeket a méréseket 1:1 illetve 1:2 fémion/ligandum arányánál végeztük el, ugyanis az 1:1 összetételű komplexek ezeknél az arányoknál vannak jelen a legnagyobb mennyiségben. CD-aktivitás csak a négynitrogénes koordinációt tartalmazó komplexek megjelenésével párhuzamosan figyelhető meg a spektrumban (32. ábra). Mivel abban a pH-





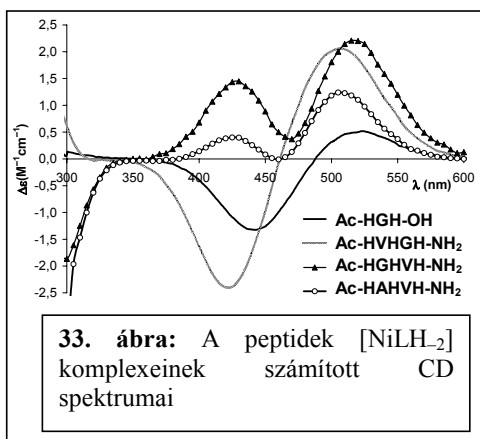
tartományban, ahol a  $[\text{NiL}]^{2+}$  komplex a domináns részecske, nem mérhető CD-aktivitás, ez megerősíti, hogy a komplexben a fémion csak imidazolnitrogénekén keresztül koordinálódik, makrokelátot kialakítva.

A CD spektrumokat valamennyi ligandum esetében felbontottuk a PSEQUAD program segítségével, hogy megkapjuk az egyes komplexekhez tartozó egyedi spektrumokat. A peptidok  $[\text{NiLH}_2]$  komplexeihez tartozó spektrumokat mutatja be a 33. ábra néhány



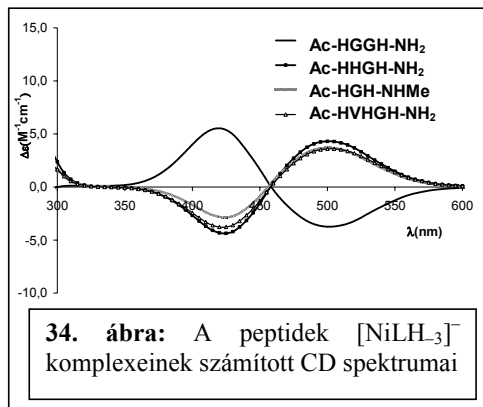
reprezentatív példán keresztül. Ha összehasonlítjuk a különböző tagszámú hisztidint tartalmazó peptidok  $[\text{NiLH}_2]$

komplexeinek CD spektrumait látható, hogy a CD aktivitás értékek jelentősen különböznek egymástól. Az Ac-HAHVH-NH<sub>2</sub> és az Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub> peptidok esetében két intenzív pozitív CD sáv látható. A másik két peptidre (Ac-HVHGH-NH<sub>2</sub> és Ac-HGH-OH) a 430 nm-nél jelentkező CD aktivitás negatív érték. Ezek a paraméterek izomer szerkezetek kialakulására utalnak a pentapeptidok esetében, de az izomerek aránya különböző a peptid aminosav szekvenciájától függően. Az Ac-HAHVH-NH<sub>2</sub> és az Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub> peptidok esetében, ahol a peptid C-terminális végén található a nagyméretű oldallánc, mindkét izomer összemérhető koncentrációban van jelen. Ezen két izomer CD spektruma különböző kell, hogy legyen; együttes jelenlétüknek köszönhető, hogy két pozitív elnyelési sávot látunk a CD spektrumban. Az Ac-HVHGH-NH<sub>2</sub> pentapeptidnél, melyben a glicin a peptid C-terminális részén található a fémion koordinációja a C-terminális részen kedvezményezett. Ezt mutatja a CD spektrum is, aminek lefutása hasonlít a hasonló koordinációs környezettel rendelkező Ac-HGH-OH tripeptid  $[\text{NiLH}_2]$  komplexének spektrumához.



A peptidok  $[\text{NiLH}_3]^-$  komplexeként hasonló lefutásúak a CD spektrumok, egyedül az Ac-HGGH-NH<sub>2</sub> peptid esetében látunk különbséget (34. ábra).

Megfigyeltük, hogy amennyiben a peptid C-terminális végétől számolva a harmadik pozícióban glicin foglal helyet, úgy ellentétes előjelű Cotton-effektus mérhető. Ezt már a peptid Cu(II)-komplexek CD vizsgálatánál is tapasztaltuk; ezen megállapítás összhangban van Klewpatinond és munkatársai



34. ábra: A peptidok  $[\text{NiLH}_3]^-$  komplexeként számított CD spektrumai

szisztematikus kísérletsorozatának eredményeivel<sup>151</sup>. A többi ligandum esetében 500 nm-nél egy pozitív elnyelési sáv jelenik meg, és egy negatív sáv 422-425 nm-nél. Ezek az adatok az  $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  típusú koordinációs módra utalnak. Hasonló lefutású CD spektrumokat publikáltak más hisztidintartalmú peptidok  $[\text{NiLH}_3]^-$  komplexeként is (például: Ac-HVVH-NH<sub>2</sub> és Ac-HAAHVH-NH<sub>2</sub><sup>81</sup> valamint Ac-TEHAK-NH<sub>2</sub> és Ac-TEAHHK-NH<sub>2</sub><sup>155</sup>). Ezek a CD paraméterek összhangban vannak azzal a megállapítással, hogy ha a Ni(II)-ion hisztidint tartalmazó peptidhez kötődik, és 4N-es komplexet képez, akkor nagyobb hullámhosszánál pozitív, a kisebb hullámhosszánál negatív Cotton-effektus mérhető az XZH összetételű peptidre (ahol X lehet bármilyen aminosav kivéve glicin vagy prolin).

Mivel a deprotonálódott amidnitrogént tartalmazó komplexek síknégyzetes geometriájúak, így lehetőségünk nyílt a Ni(II)-iont tartalmazó rendszerek <sup>1</sup>H NMR vizsgálatára is. Erősen lúgos pH-tartományban végeztünk méréseket, ahol a  $[\text{NiLH}_3]^-$  komplex az uralkodó részecske. A <sup>1</sup>H NMR spektrumokat 1:2 fémion/ligandum arányt tartalmazó mintáknál vettük fel, és összehasonlításképpen 11-es pH-érték felett a teljesen deprotonálódott ligandum spektrumát is rögzítettük. A ligandumfeleslegnek köszönhetően mind a szabad ligandum, mind a kötött ligandum jelei megjelennek a spektrumban. Az NMR spektrum aromás régiójából származó paramétereket a 11. táblázat, az alifás régióból származó jeleket a 12. táblázat foglalja össze. Mindkét táblázatban az egy protontípushoz tartozó jeleket három oszlopban mutatom be: az első oszlop tartalmazza a szabad ligandum kémiai eltolódás értékeit, a második a Ni(II)-iont tartalmazó mintában a szabad ligandumhoz tartozó jeleket, míg a harmadik a Ni(II)-ionhoz kötődő ligandum jeleit.

A 11. táblázat adataiból kitűnik, hogy az imidazolnitrogének minden esetben kötődnek, és a kötött imidazolprotonok jelei általában a kisebb kémiai eltolódás értékek felé tolódnak. Ugyanakkor az Ac-HHGH-OH tetrapeptid és az Ac-HVHGH-NH<sub>2</sub> pentapeptid esetében az egyik aromás proton jele a nagyobb kémiai eltolódás értékek felé tolódott le. Ezt az eltolódást okozhatja a nemkoordinálódó imidazolgyűrű aromás  $\pi$ -elektronjainak és a Ni(II)-ion  $d_{z^2}$  pályájának kölcsönhatása<sup>156</sup>.

**11. táblázat:** Hisztidint tartalmazó ligandumok és a nikkel(II)iont tartalmazó rendszerek <sup>1</sup>H NMR-rel mért kémiai eltolódás értékei (az aromás régió imidazolil protonjai) *a*: átfedő NMR jelek; *b*: nagyobb ppm értékek felé való eltolódás; *c*: széles, nehezen azonosítható jel

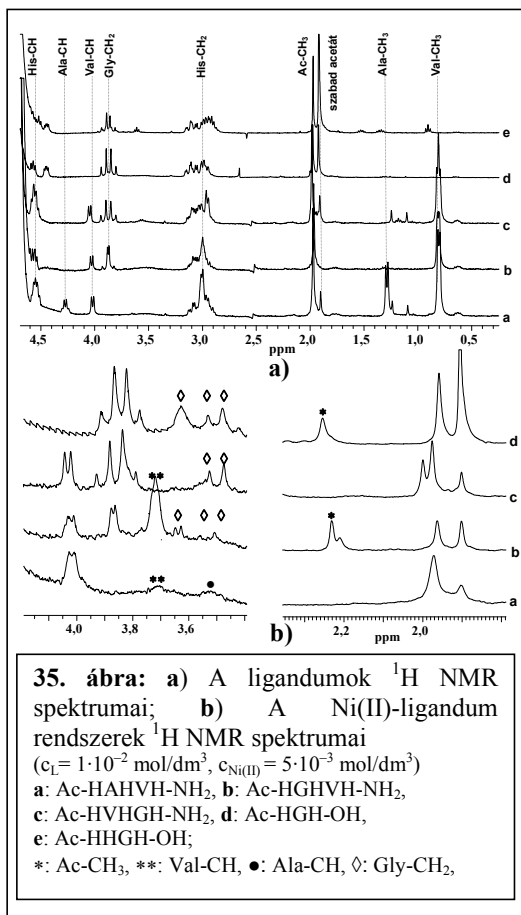
	C(2)H	+Ni(II)		C(5)H	+Ni(II)	
<b>Ac-HGH-OH</b>	7,65	7,65	7,35	6,92	6,93	6,85 <sup>a</sup>
	7,63	7,63	7,29	6,84	6,85 <sup>a</sup>	6,75
<b>Ac-HHGH-OH</b>	7,65	7,65	7,31	6,89	6,89	6,73
	7,61	7,61	7,22	6,85	6,85	6,65
	7,60	7,60				
			7,70 <sup>b</sup>			6,95 <sup>b</sup>
<b>Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub></b>	7,65	7,65	7,64 <sup>a</sup>	6,95	6,95	6,94 <sup>a</sup>
	7,64	7,64 <sup>a</sup>	7,39	6,94	6,94 <sup>a</sup>	6,85
	7,64	7,64 <sup>a</sup>	7,25	6,81	6,82	6,73
<b>Ac-HVHGH-NH<sub>2</sub></b>	7,65	7,65	7,37	6,94	6,94	6,80
	7,65	7,65	7,23	6,92	6,92	6,61
	7,64	7,64		6,82	6,82	
			7,69 <sup>b</sup>			6,95 <sup>b</sup>
<b>Ac-HAHVH-NH<sub>2</sub></b>	7,65	7,64	<i>c</i>	6,95	6,95	<i>c</i>
	7,65	7,64		6,91	6,91	
	7,65	7,64		6,83	6,83	

A <sup>1</sup>H NMR spektrum alifás régiójának jelei alátámasztják az UV-látható és CD spektroszkópiás mérésekből levont következtetéseket. A deprotonálódott amidnitrogén koordinálódása a nikkel(II)ionhoz a nagyobb térerősség felé tolhatja el az amidnitrogénhez közel elhelyezkedő protonok jeleit. Ez azt jelenti, hogy a peptid HGH egységének koordinációjára a Gly-CH<sub>2</sub> protonok, a HVH egység koordinációjára az  $\alpha$ -Val proton és a HAH egységére az Ala-CH proton eltolódása utalhat. A 12. táblázatban bemutatott adatok és a 35. ábrán szemléltetett spektrumok elemzése azt mutatja, hogy minden glicint tartalmazó peptid esetében eltolódik a Gly-CH<sub>2</sub> protonok jele. Ennek eredményeképpen

megállapíthatjuk, hogy mindkét pentapeptidet tartalmazó oldatban jelen van olyan izomerkomplex, amelyben a fémionhoz a ligandum a HGH egységén keresztül kötődik.

A valinproton jele eltolódik az Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub> peptidnél, de nem változik a pozíciója az Ac-HVHGH-NH<sub>2</sub> peptid esetében (35. ábra c) spektrum), ami azt mutatja, hogy a kétféle izomer össze-mérhető mennyiségben van jelen az Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub> peptidnél. Az Ac-HVHGH-NH<sub>2</sub> peptid esetében az a komplex van túlnyomórészt jelen, amelyben a fémion a ligandum C-terminális végén koordinálódik. Ezeket a megállapításokat az acetamido-metil protonok jeleit jellemző paraméterek is alátámasztják. Mind az Ac-HGH-OH, mind az Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub> ligandum esetében a Ni(II)-ion koordinációja hatására a kisebb térerősség felé tolnak el az acetamido-metil protonok jelei. Egyrészt ezt vártuk a korábbi vizsgálataink alapján, ugyanis a deprotonálódott acetamido-nitrogén koordinálódik a fémionhoz. Az Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub> pentapeptid esetében azonban az acetamido-metil protonok jelének eltolódása arra utal, hogy jelentős mennyiségben jelen van az az izomerkomplex, amelyben a fémion az N-terminális Ac-HGH egységhez kötődik. Az Ac-HAHVH-NH<sub>2</sub> peptid esetében is mindkét izomer megjelenik, ugyan rosszabb minőségű a spektrum felbontása. A csillaggal jelölt  $\alpha$ -Val-CH jelének megjelenése és az Ala-CH jelének eltolódása a két izomer együttes jelenlétére utal.

Az Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub> peptid spektrumában a kötött ligandum  $\alpha$ -Val-CH, Gly-CH<sub>2</sub> és Ac-CH<sub>3</sub> protonjai integrál értékeinek aránya 1,0 : 0,43 : 0,63, ami –



**35. ábra:** a) A ligandumok <sup>1</sup>H NMR spektrumai; b) A Ni(II)-ligandum rendszerek <sup>1</sup>H NMR spektrumai (c<sub>L</sub> = 1 · 10<sup>-2</sup> mol/dm<sup>3</sup>, c<sub>Ni(II)</sub> = 5 · 10<sup>-3</sup> mol/dm<sup>3</sup>)  
a: Ac-HAHVH-NH<sub>2</sub>, b: Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub>,  
c: Ac-HVHGH-NH<sub>2</sub>, d: Ac-HGH-OH,  
e: Ac-HHGH-OH;  
\*: Ac-CH<sub>3</sub>, \*\*: Val-CH, •: Ala-CH, ◊: Gly-CH<sub>2</sub>,

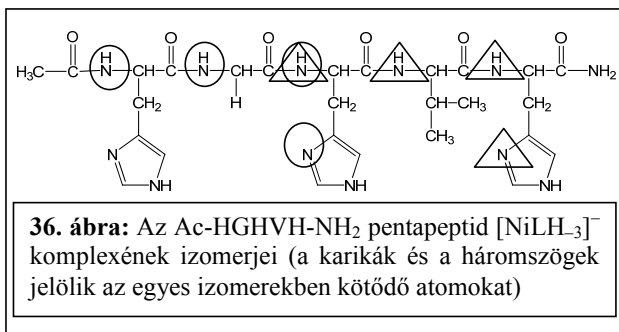
**12. táblázat:** Hisztidint tartalmazó ligandumok és a nikkel(II)iont tartalmazó rendszerek  $^1\text{H}$  NMR-rel mért kémiai eltolódás értékei (alifás régió) c: széles jel

	Ala- CH	+Ni(II)	Val-CH	+Ni(II)	Gly- CH <sub>2</sub>	+Ni(II)	Ac- CH <sub>3</sub>	+Ni(II)	Ala- CH <sub>3</sub>	+Ni(II)
Ac-HGH-OH					3,92	3,64	1,96	1,96		
					3,87	3,49		1,90		2,25
					3,83	3,83				
					3,78	3,78				
Ac-HHGH-OH					3,92	3,91	1,96	1,96		
					3,88	3,88	3,41			
					3,84	3,84	3,36			
Ac-HGHVH-NH <sub>2</sub>			4,04	4,03	3,92	3,88	3,65	1,96	1,98	2,23
			4,01	4,01	3,88	3,87	3,63			2,21
					3,86	3,51				
					3,82					
Ac-HVHGH-NH <sub>2</sub>			4,05	4,05	3,93	3,93	3,53	1,96	1,98	
			4,03	4,03	3,89	3,89	3,48			
					3,84	3,84	3,35			
Ac-HAHVH-NH <sub>2</sub>			4,03	4,03				1,97	1,97	
	4,28	4,28	c	4,01						1,30
	4,26	4,26								1,28
										1,30
										1,28

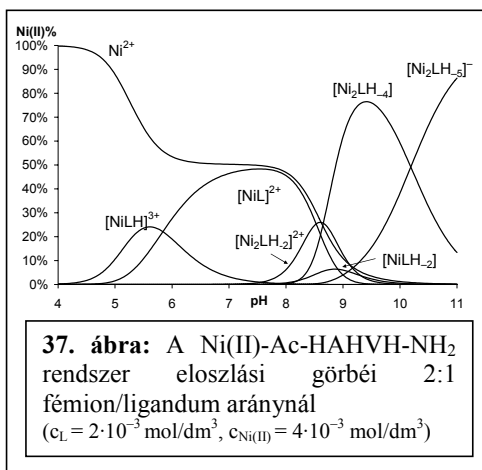
ha figyelembe vesszük a protonok számát – 1,00 : 0,215 : 0,21 aránynak felel meg a kötött csoportokra.

Ez az arány lehetővé teszi, hogy megbecsüljük a  $[\text{NiLH}_3]^-$  komplex koordinációs izomereinek arányát (36. ábra):  $[\text{NiLH}_3]^-$  (a HVH szekvenciánál kötődő izomer) :  $[\text{NiLH}_3]^-$  (az Ac-HGH szekvenciánál kötődő izomer) = 1,0 : 0,21 = 83 % : 17 %.

Összességében megállapíthatjuk, hogy a fémion kötődése a ligandum C-terminális részén a kedvezményezett, azonban ha a C-terminális részen nagyobb térkitöltésű oldallánccal rendelkező aminosav található, a ligandum N-terminális részén is megfigyelhetjük a fémion koordinálódását.

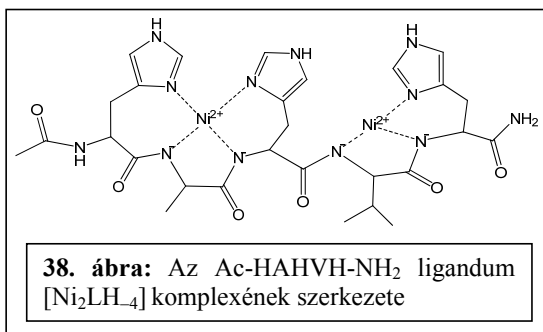


Fémionfelesleg jelenlétében 8-as pH-érték felett kétmagvú komplexek alakulnak ki az oldatban (37. ábra). A  $[\text{Ni}_2\text{LH}_2]^{2+}$  komplex mennyisége kevés (~20%). A pH 8 felett 440 nm-nél megjelenő elnyelési sáv arra utal, hogy a kötött fémionok közül legalább az egyik körül síknégyszetes geometria alakul ki. Az egyik nikkell(II)ion valószínűleg az  $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  donorszetteen keresztül koordinálódik, amíg a másik fémiont egy vagy két imidazolnitrogén köti. A pH



további növelésével  $[\text{Ni}_2\text{LH}_4]$  komplex keletkezik újabb amidnitrogének deprotonálódásának köszönhetően. A komplexben mindkét fémion két amid- és egy vagy két imidazolnitrogénhez kapcsolódnak (38. ábra). Ez azt jelenti, hogy a két amidnitrogén deprotonálódása és koordinálódása kooperatív módon megy végbe, és kisebb pH-n játszódik le, mint az egymagvú komplexeknél. Ezt a megállapítást azzal magyarázhatjuk, hogy a fémion eltérő kémiai környezetben van az egymagvú és a kétmagvú részecskékben. A  $[\text{NiLH}_2]$  komplexben a második imidazol-nitrogén koordinációja stabilizálja a komplexet és makrokelát alakul ki; a kétmagvú  $[\text{Ni}_2\text{LH}_2]^{2+}$  komplexben ezt a kötési helyet

egy második fémion foglalja el. 10,5-ös pH-érték felett egy újabb lúgfogyasztó folyamat figyelhető meg, amely nagy valószínűséggel egy újabb amidnitrogén deprotonálódásához rendelhető. Ennek eredményeképpen alakul ki a  $[\text{Ni}_2\text{LH}_5]^-$  komplex, amelyben a fémionok az  $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  és az  $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  donorszettekben keresztül koordinálódnak.



#### 4.1.4. A vizsgált ligandumok (Ac-HAHVH-NH<sub>2</sub>, Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub>, Ac-HVHGH-NH<sub>2</sub>) kobalt(II)komplexei

Néhány ligandum esetében a kobalt(II)ionokkal való komplexképződési folyamatokat is vizsgáltuk. A stabilitási állandókat és a származtatott paramétereket a 13. táblázatban foglaltam össze.

**13. táblázat:** A vizsgált és összehasonlításként bemutatott ligandumok Co(II)-komplexeinek stabilitási állandói ( $I = 0,20 \text{ mol/dm}^3$ ,  $T = 298 \text{ K}$ )

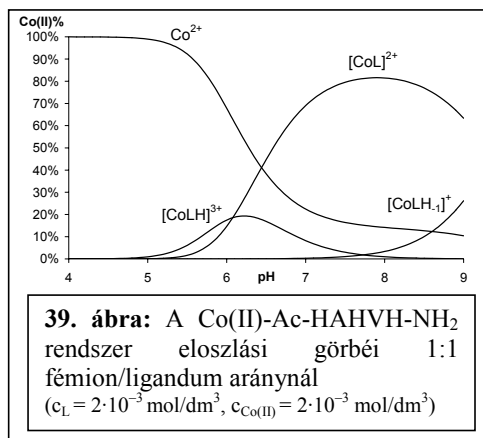
	Ac-HAHVH-NH <sub>2</sub>	Ac-HGHVH-NH <sub>2</sub>	Ac-HVHGH-NH <sub>2</sub>	Ac-HGH-OH <sup>157</sup>	Ac-HHG-OH <sup>157</sup>
$[\text{CoLH}]^{3+/2+}$	9,82(2)	10,0(5)	10,33(7)	–	–
$[\text{CoL}]^{2+/+}$	3,74(1)	3,9(1)	4,16(4)	3,40(5)	4,40(7)
$[\text{CoL}_2]^{2+/+}$	–	–	–	5,85(3)	–
$[\text{CoLH}_1]^{+/0}$	-5,64(2)	-4,6(2)	-5,64(2)	-5,54(7)	–
$[\text{CoLH}_2]^{0/-1}$	–	–	–	-15,42(1)	–
<b>pK(CoLH/CoL)</b>	6,08	6,1	6,17	–	–
<b>pK(CoL/CoLH<sub>1</sub>)</b>	9,38	8,5	8,76	9,41	–
<b>lgK(M+2 N(Im))</b>	2,99	3,1	3,41	3,40	
<b>lgK (M+3 N(Im))</b>	3,74	3,9	4,16		4,40

Ezek az adatok azt mutatják, hogy az 1:1 összetételű komplexek az uralkodók az oldatban; csak a tripeptid esetében alakul ki biszkomplex.

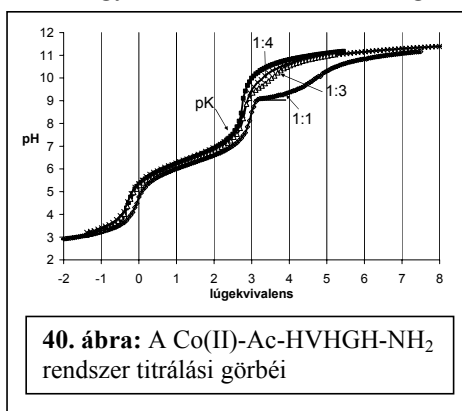
Azonban a két vagy három imidazolgyűrű jelenléte megnöveli a kialakuló komplexek stabilitását, amit legjobban a 13. táblázatban bemutatott  $\log K(M + 2N(\text{Im}))$  és  $\log K(M + 3N(\text{Im}))$  értékek szemléltetnek. A pentapeptidok  $[\text{CoLH}]^{3+}$  komplexében a két imidazolnitrogén koordinációjával makrokelát alakul ki, lehetőség van izomer szerkezetek kialakulására is. Ezen koordinációs módot jellemző egyensúlyi adat (a  $\log K(M + 2N(\text{Im}))$  érték) 3,0 és 3,4 között van. Ezek az értékek kisebbek, mint az ugyanezen peptidok nikkell(II)komplexeire vonatkozó állandók, de nagyobbak, mint az Ac-GTHS-NH<sub>2</sub> ( $\log K(\text{CoL}) = 2,41$ ) peptid egy imidazolnitrogénes koordinációval kialakuló CoL komplexének stabilitási állandója. A szabad karboxilcsoport hatással van a komplexek termodinamikai stabilitására, ami azt is mutatja, hogy a karboxilátcsoport részt vesz a fémion megkötésében.

A három hisztidint tartalmazó pentapeptidok esetében lehetőség van még egy imidazolnitrogén kötődésére, így egy még stabilisabb  $[\text{CoL}]^{2+}$  komplex alakul ki (39. ábra). Ezt tükrözik a  $\log K(M + 3N(\text{Im}))$  értékek. Mind a  $[\text{CoLH}]^{3+}$ , mind a  $[\text{CoL}]^{2+}$  összetételű komplexek oktaéderes geometriáját a fotometriás mérések is alátámasztották, kis intenzitású sáv jelent meg ~ 500 nm körül a látható spektrumban. pH > 9 fölött extra lúgfogyasztó folyamat játszódott le, deprotonálódásával vagy a hidrolízis megjelenésével is (40. ábra).

Az enyhén lúgos pH-tartományban viszont liláskék csapadék képződését figyeltük meg, amely nagy valószínűséggel  $\text{Co}(\text{OH})\text{Cl}$  képződésének eredménye. Ez azt is mutatja, hogy a  $[\text{CoL}]^{2+}$  komplex stabilitása nem elegendő ahhoz, hogy megakadályozza a fémion hidrolízisét.



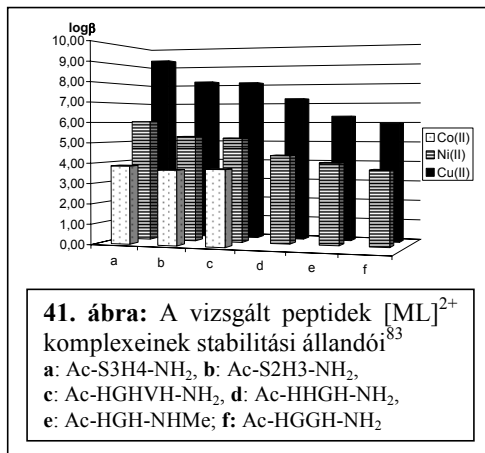
ami magyarázható az amidnitrogének





Ennek következményeként a  $[\text{CoLH}_1]^+$  és a  $[\text{CoLH}_2]$  összetételű komplexek vegyes hidroxokomp-lexek. Ez utóbbi részecske jelenlétét akkor tudtuk detektálni, amikor nagyobb ligandumfelesleg mellett és kisebb koncentrációjú oldatban végeztünk méréseket. Ekkor a rendszer pH > 11-ig mérhető volt, és  $[\text{CoLH}_2]$  komplex kialakulását is feltételeztük.

A vizsgált peptidek Ni(II)- és Co(II)-komplexeire kapott eredményeket összehasonlítva ugyanezen peptidek Cu(II)-komplexeire közölt adatokkal<sup>82,83</sup>, általánosan megállapíthatjuk, hogy a különböző tagszámú peptidek  $[\text{CuL}]^{2+}$ ,  $[\text{NiL}]^{2+}$  és  $[\text{CoL}]^{2+}$  komplexeinek stabilitása az imidazolnitrogének számának csökkenésével csökken (41. ábra). Másrészt mindhárom fémion esetén a legnagyobb stabilitású komplexek akkor alakulnak ki, amikor a hisztidinek egy aminosav távolságban vannak egymástól. Az egyes fémionokkal képződő komplexek stabilitásának változása összhangban van az Irving-Williams sorral:  $\text{Cu(II)} > \text{Ni(II)} > \text{Co(II)}$ .



## **4.2. Elektrokémiai vizsgálatok**

A pH-potenciometriás vizsgálatok alapján azt láttuk, hogy több ligandum esetében is kialakulnak olyan komplexek, amelyekben a fémion imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik. Ezen komplexek szerkezeti szempontból a Cu,Zn-SOD enzim Cu(II)-kötőhelyének megfelelő modelljei lehetnek. Ennek alapján a munka folytatásaként az imidazolnitrogénes koordinációjú komplexek redoxi paramétereinek vizsgálatát végeztük el. Az egyensúlyi vizsgálatok alapján három ligandumtípus Cu(II)-komplexeit tanulmányoztuk ciklikus voltammetria segítségével:

- egyszerű hisztidinszármazékok;
- multihisztidin peptidok;
- bisz(imidazol-2-il) származékok.

A kapott redoxipotenciál értékek információt adhatnak a Cu(II)-komplexek SOD aktivitásáról. Ahhoz, hogy egy komplex képes legyen a szuperoxid gyökánion elbontására redoxipotenciál értéke  $-0,16$  V és  $+0,89$  V közé kell, hogy essen (2.3.2. fejezet, (6) és (7) egyenletek).

### **4.2.1. Aminosavak és egyszerű hisztidinszármazékok réz(II)komplexeinek vizsgálata**

Kutatócsoportunkban korábban nem foglalkoztak Cu(II)-komplexek redoxi paramétereinek vizsgálatával, ezért mielőtt az összetett rendszerek vizsgálatára rátértünk volna, két egyszerű hisztidinszármazék (N-Ac-hisztidin, N-Ac-hisztamin) és összehasonlításképpen néhány egyszerű aminosav Cu(II)-komplexének redoxipotenciál értékeit is meghatároztuk. A vizsgált rendszerekben az aminosavak oldalláncainak hatását tanulmányoztuk a Cu(II)-komplexek redoxipotenciál értékeire.

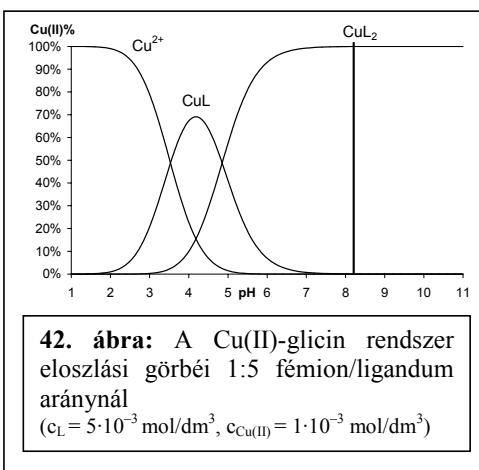
A 14. táblázatban foglaltam össze a mérések során alkalmazott körülményeket, illetve a voltammogramokból leolvasható primer adatokat. Minden esetben rögzítettük a ligandum teljesen deprotonált formájának ciklikus voltammogramját, és nem tapasztaltunk redoxi átalakulást, így feltételezhattük, hogy a Cu(II)-tartalmú rendszerek ciklikus voltammetriás vizsgálatánál sem kell a ligandum redoxi reakciójával számolni. Valamennyi Cu(II)-ion/ligandum rendszer esetében ligandumfelesleget alkalmaztunk, ekkor kaptunk értékelhető voltammogramokat. Általában azt tapasztaltuk, hogy a katódos és az anódos csúcspotenciál értékek különbsége nagyobb, mint a  $0,059$  V, ami jellemzi az egyelektronos (3.7. fejezet, (25) egyenlet), reverzibilis redoxi átalakulásokat. Így az általunk vizsgált Cu(II)-komplexekben a végbemenő redoxi reakciók

kvázireverzibilisek. Az egyszerű aminosavak esetében az aminosavszerű koordinációval kialakuló komplexeket vizsgáltuk, és azt a pH-értéket választottuk ki, ahol az ilyen koordinációt tartalmazó komplex a legnagyobb mennyiségben van jelen. Példaként mutatom be a 42. ábrán a Cu(II)-glicin rendszerre 1:5 fémion/ligandum aránynál elkészített eloszlási görbét, amelyen a függőleges vonal jelöli a ciklikus voltammetriás méréshez beállított pH-értéket.

**14. táblázat:** Az aminosavak és egyszerű hisztidinszármazékok Cu(II)-komplexeinek ciklikus voltammetriás mérése során beállított körülmények és a voltammogramokból leolvasható adatok

	Cu(II)/ligandum arány	pH	$E_k$ (V)	$E_a$ (V)	$i_a/i_k$	Pásztázási sebesség (mV/sec)
<b>G</b>	1:5	8,21	-0,391	-0,172	1,76	100
<b>A</b>	1:5	10,25	-0,372	-0,183	0,92	100
<b>K</b>	1:5	12,28	-0,391	-0,071	0,67	25
<b>Y</b>	1:5	7,32	-0,137	0,061	4,49	25
<b>S</b>	1:5	7,56	-0,442	-0,144	1,39	100
<b>H</b>	1:10	9,18	-0,508	-0,336	0,73	50
<b>N-Ac-Hisz</b>	1:10	6,43	0,0416	0,217	0,89	50
<b>N-Ac-Hm</b>	1:10	8,83	0,0169	0,151	0,97	100

A glicin esetében egy csúcspár jelent meg a voltammogramon, ami a Cu(II)/Cu(I) átalakuláshoz tartozik. Néhány másik aminosav (alanin, szerin, tirozin) esetében ugyanakkor, a glicintől eltérően, a  $CuL_2$  komplex ciklikus voltammogramján 2 csúcspár volt megfigyelhető. A második csúcshoz tartozó értékek jelentős pozitív értékek, amelyekről az feltételezhető, hogy a Cu(I)/Cu(0) átalakuláshoz tartozhatnak. Ez a tapasztalat összhangban van az irodalmi adatokkal is, mivel a vizes oldatban a Cu(I)/Cu(0) – re jellemző  $E^0 = 0,520$  V, ahogy azt a dolgozat (5) egyenlete is mutatja. Ilyen átalakulást már a korábban irodalomban közölt vizsgálatoknál is tapasztaltak<sup>158</sup>.



A hisztidin és a hisztidinszármazékok Cu(II)-komplexeinek vizsgálata során jól értékelhető voltammogramokat kaptunk, ugyancsak egy csúcspár megjelenésével. Ezen ligandumok esetében a fémion az imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik, a vizsgált komplexekben (a hisztidint kivéve) ez az oldallánc a fő kötőhely. A primer adatokból (23) és (24)-es egyenletekkel számolt redoxipotenciál értékeket a 15. táblázat tartalmazza.

**15. táblázat:** A vizsgált aminosavak és egyszerű hisztidinszármazékok redoxipotenciál értékei normál hidrogénelektrodra vonatkoztatva

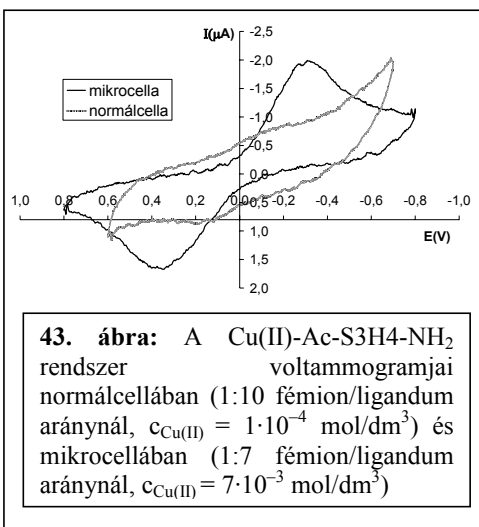
	G	A	K	Y	S	H	N-Ac-Hisz	N-Ac-Hm
$E^\circ$ (V) (ML <sub>2</sub> )	-0,072	-0,068	-0,021	-	-0,061	-0,213	0,338	0,293
$E^\circ$ (V) (ML <sub>2</sub> H <sub>2</sub> )				0,172				

Látható, hogy közel 0 a különböző aminosavak CuL<sub>2</sub>, illetve a tirozin esetén CuL<sub>2</sub>H<sub>2</sub> komplexeinek redoxipotenciál értéke. Vagyis az oldalláncnak nincs jelentős hatása a redoxipotenciálra. A nagyobb méretű oldallánc csökkenti valamelyest a kialakuló komplex stabilitását; így a glicin–alanin valamint a szerin–tirozin párban megfigyeltünk növekedést az egymáshoz viszonyított redoxipotenciál értékekben. A legnagyobb hatása az imidazol oldalláncnak volt, hisztidin estében -0,2 V körüli értéket kaptunk, amely mutatta, hogy stabilisabb részecske keletkezik ebben a rendszerben. A két hisztidinszármazék esetében, ahol az imidazolnitrogén a fő fémion-kötőhely, pozitív értékeket kaptunk. Ez azt mutatja, hogy itt a fémcentrum könnyen redukálható illetve oxidálható.

Ezen vizsgálatokat követően a peptidláncban különböző helyen és számban hisztidint tartalmazó peptidek Cu(II)-komplexeinek ciklikus voltammetriás vizsgálatát végeztük el. Szembesültünk azonban azzal a problémával, hogy a legtöbb ligandum esetében csak kis mennyiség áll a rendelkezésünkre, amely nem tette lehetővé, hogy az értékelhető mérésekhez szükséges ligandumfelesleget biztosítsuk a nagy térfogatú mérőcellában. Problémánkra megoldásnak az kínálkozott, ha lecsökkentjük a vizsgálandó minta térfogatát, ezért egy mikrocellát fejlesztettünk ki (18. ábra). A mikrocella segítségével lecsökkentettük a korábbi 10 cm<sup>3</sup>-es mintatérfogatot 1-1,5 cm<sup>3</sup>-re, amely azt jelentette, hogy minden vizsgált ligandum esetében sikerült a kívánt ligandumfelesleget alkalmaznunk. Az összeállított mikrocellát is a [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>/[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> redoxi rendszerrel kalibráltuk a kísérleti körülmények részben leírtak szerint.

A mikrocella működését egy Cu(II)-ligandum rendszeren, a Cu(II)-Ac-S3H4-NH<sub>2</sub> rendszeren is ellenőriztük.

A készülékhez tartozó (gyári) normálcellával és a mikrocellával is rögzítettük a [CuL]<sup>2+</sup> komplex voltammogrammját. A két esetben felvett voltammogramot a 43. ábra mutatja be. Alapvetően megegyezik a két görbe lefutása, bár azt láthatjuk, hogy a normálcellában alig jelennek meg a redukciót és az oxidációt jellemző áramcsúcsok. Ez annak köszönhető, hogy a vizsgált fémion igen kis mennyiségben van jelen. A számolt redoxipotenciál értékek közel esnek egymáshoz: a normálcellával mért érték 0,190 V, míg a mikrocellával mért érték 0,194 V. Ezek alapján arra következtettünk, hogy használható a mikrocella további méréseinkhez.



#### 4.2.2. Hisztidintartalmú peptidek réz(II)komplexeinek vizsgálata

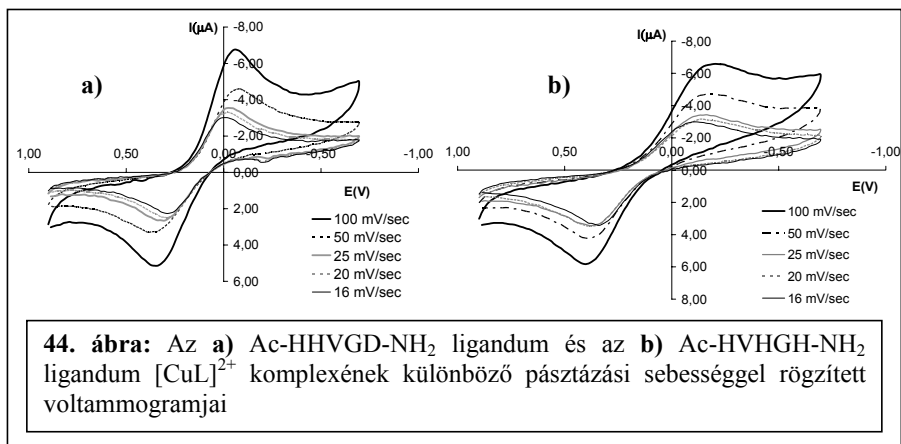
Munkánk folytatásaként – felhasználva az aminosavak Cu(II)-komplexeinek vizsgálata során szerzett tapasztalatokat – olyan hisztidintartalmú peptidek Cu(II)-komplexeinek elektrokémiai vizsgálatával foglalkoztunk, amelyekben a fémion csak imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik. Minden esetben rögzítettük a teljesen deprotonált ligandum ciklikus voltammogramját, és azt tapasztaltuk, hogy a ligandum nem vesz részt redoxi folyamatban. A voltametrias mérések során beállított körülményeket és a voltammogramokból leolvasható primer adatokat a 16. táblázatban foglaltam össze.

Ezen adatok alapján megállapíthatjuk, hogy valamennyi esetben közel egy az anódos és a katódos csúcsáram aránya, amely arra utal, hogy a folyamatok egyelektronos, reverzibilis redoxi átalakulások. Ez az arány a legkisebb az Ac-S1H2-NH<sub>2</sub> peptid Cu(II)-komplexe esetében, ami nagy valószínűséggel a kisebb alkalmazott Cu(II)-koncentrációnak tudható be ( $c_{\text{Cu(II)}} = 5 \cdot 10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup>).

**16. táblázat:** Hízítidintartalmú peptidek Cu(II)-komplexeinek ciklikus voltammetriás mérése során beállított körülmények és a voltammogramokból leolvasható adatok

Ligandum	Cu(II)-ligandum arány	pH	E <sub>k</sub> (V)	E <sub>a</sub> (V)	i <sub>a</sub> /i <sub>k</sub>	Pásztázási sebesség (mV/sec)
Ac-HGH-NHMe	1:5	5,24	-0,0023	0,273	0,96	100
Ac-HGH-NHMe	1:5	6,33	-0,0454	0,201	1,03	100
Ac-SIH2-NH <sub>2</sub>	1:10	7,02	-0,0389	0,225	0,67	100
Ac-HGGH-NH <sub>2</sub>	1:5	5,21	0,0786	0,278	0,99	25
Ac-HGGH-NH <sub>2</sub>	1:5	6,69	0,0302	0,239	0,96	25
Ac-HVVH-NH <sub>2</sub>	1:5	5,25	0,0741	0,287	0,96	25
Ac-HVVH-NH <sub>2</sub>	1:5	6,78	-0,0443	0,339	0,90	50
Ac-HHGH-NHMe	1:5	5,98	-0,0554	0,263	1,16	25
Ac-HHVGD-NH <sub>2</sub>	1:5	5,30	-0,0148	0,292	0,94	20
Ac-S2H3-NH <sub>2</sub>	1:10	5,84	-0,0725	0,241	1,22	100
Ac-HAHVH-NH <sub>2</sub>	1:10	5,82	-0,0226	0,189	0,96	50
Ac-HVVAH-NH <sub>2</sub>	1:5	5,75	-0,148	0,258	1,06	20
Ac-HAHPH-NH <sub>2</sub>	1:5	6,00	-0,273	0,338	1,05	50
Ac-HVHGH-NH <sub>2</sub>	1:5	5,11	-0,137	0,348	1,15	16
Ac-S3H4-NH <sub>2</sub>	1:7	7,38	-0,305	0,352	0,81	10

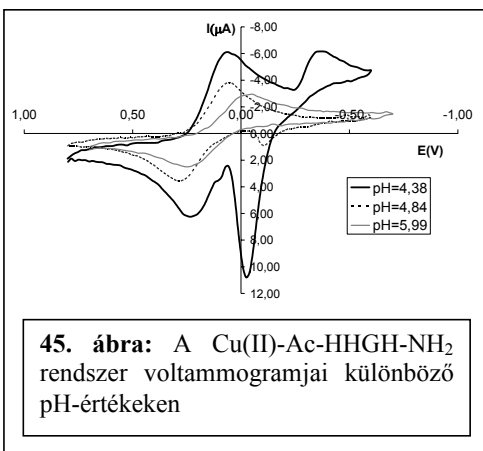
Az irodalom alapján a Cu(II)-komplexekre a két potenciál érték közötti különbségre általában 59 mV-nál nagyobb érték adódik, az elfogadott érték 180 mV körül van. A nagy csúcscszeptaráció értékek oka lehet az elektród felületén lejátszódó lassú elektrontranszfer folyamat<sup>143</sup>. Annak eldöntésére, hogy tényleg reverzibilis folyamatokat vizsgálunk-e, pásztázási sebességfüggő vizsgálatokat végeztünk. A 44. ábrán két ligandum [CuL]<sup>2+</sup> komplexének pásztázási sebességfüggő voltammogramjai láthatók.



A katódos és az anódos csúc távolsága folyamatosan csökkent a pásztázási sebesség csökkentésével, a ciklikus voltammogram alakja és a leolvasott redoxipotenciál értékek viszont nem változtak meg. Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy az általunk tanulmányozott rendszerek kvázireverzibilis rendszerek.

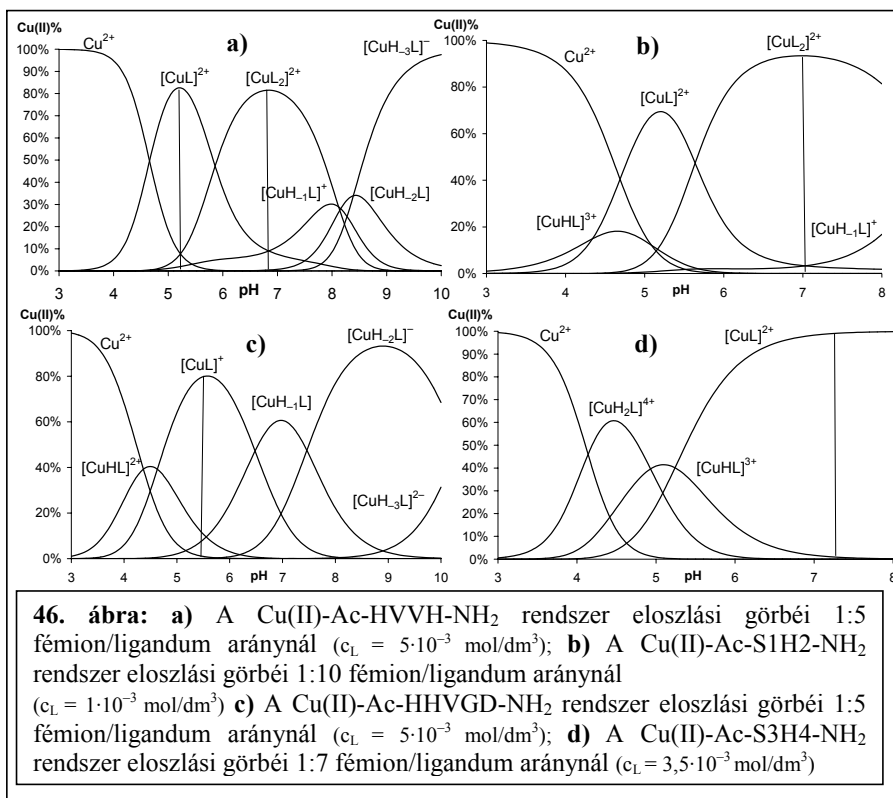
Mivel a voltammogram alakja nem változott, azt állapítottuk meg, hogy nem megy végbe a fémion diszproporciója, és a redukció során a Cu(II)-komplex → Cu(I)-komplex átmenet játszódik le. A féllépcsőpotenciál értékek jó egyezésben vannak a korábban vizsgált rendszerekben végbemenő Cu(II)/Cu(I) átmenetre jellemző redoxipotenciál értékekkel<sup>99,104,98</sup>.

A pH folyamatos változtatása befolyásolja a voltammogramok alakját. A 45. ábrán a Cu(II)-Ac-HHGH-NH<sub>2</sub> rendszerben különböző



pH-értékeken felvett voltammogramokat mutatom be. pH 4,38-as értéken két csúcspár jelenik meg a voltammogrammon. A negatív feszültségtartományba eső csúcspár a szabad réz(II)ionok redukciójához és oxidációjához tartozik.

Ezen a pH-értéken a fémion közel fele akvaionként van jelen. Ahogy a szabad fém mennyisége csökken, a réz(II)akvaionok redoxi reakcióját jellemző csúcspár fokozatosan eltűnik. Ennek következményeként az 5,99-es pH-értéken kapott voltammogram a  $[\text{CuL}]^{2+}$  komplexben található Cu(II)-ion redukcióját és oxidációját jellemzi. Mindezen megállapítások figyelembevételével vizsgáltuk a különböző peptidok imidazolnitrogénes koordinációt tartalmazó komplexeit. Az egyes ligandumok Cu(II)-komplexeinek sztöchiometriája, stabilitási állandói és szerkezete már ismert volt számunkra<sup>78,80,81,82,83</sup>, így a ciklikus voltammetriás mérések koncentrációviszonyainak megfelelően eloszlási görbéket készítettünk. Néhány reprezentatív példát mutatok be a 46. ábrán. Az ábrákon függőleges vonalak jelölik azokat a pH-értékeket, amelyeken a mérést elvégeztük.

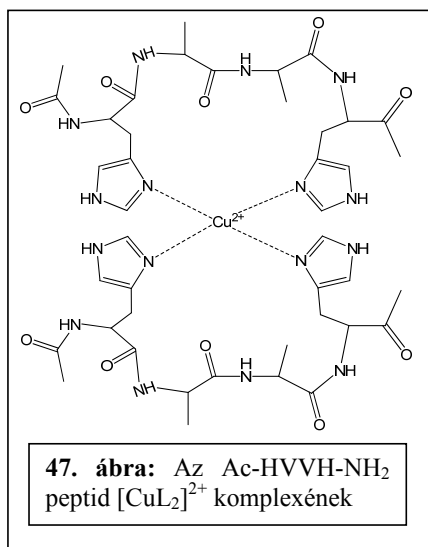




Az eloszlási görbék azt mutatják, hogy a két hisztidint tartalmazó peptidek esetében (kivéve az Ac-HHVGD-NH<sub>2</sub> pentapeptidet) [CuL]<sup>2+</sup> és [CuL<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> komplexek keletkeznek az enyhén savas és a semleges pH-tartományban. A [CuL]<sup>2+</sup> komplexben a fémion koordinációja két-, míg a [CuL<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> komplexben négy imidazolnitrogéneken keresztül valósul meg (47. ábra). A több mint két hisztidint tartalmazó ligandumok csak 1:1 összetételű komplexeket képeznek Cu(II)-ionokkal; a [CuL]<sup>2+</sup> komplex az uralkodó részecske az 5-7-es pH-tartományban (46. ábra). A szarkozintartalmú peptidek esetében a [CuL]<sup>2+</sup> komplex képződése eltolódik a fiziológiás pH-tartományba (46. d) ábra). Ezen ligandumokra is igaz az, hogy a fémion koordinációja az oldalláncbeli imidazolnitrogéneken keresztül valósul meg.

A HXH és a HXXH szekvenciájú peptidek esetében a különböző pH-értékeken rögzített voltammogramok jelentősen különböznek egymástól, ami alátámasztja az oldategyensúlyi vizsgálatok eredményeit is, miszerint mind [CuL]<sup>2+</sup>, mind [CuL<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> komplexek keletkeznek. Így mindkét komplex redoxi paramétereit meg tudtuk határozni (17. és 18. táblázat).

A [CuL<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> komplexekre kapott redoxipotenciál értékeket a 17. táblázatban foglaltam össze. A különböző ligandumok komplexeire kapott értékek hasonlóak egymáshoz, 0,300 V köré esnek, a csúcsezeparáció értéke ezekben az esetekben is nagyobb, mint 0,180 V. Ha ezt összehasonlítjuk az egyszerű hisztidinszármazékok CuL<sub>2</sub> komplexeinek vizsgálatánál mért értékekkel (14. táblázat), azt láthatjuk, hogy ott kisebb csúcsezeparáció értékeket kaptunk. Ez két tényezővel magyarázható: egyrészt a nagyobb komplexmolekula diffúziója lassabb az elektród felületén, másrészt a Cu(II)-ion körül kialakuló koordinációs környezet is eltérő. Az egyszerű hisztidinszármazékoknál a ligandum egyfogú koordinációval kötődik a fémionhoz egy imidazolnitrogéneken keresztül (az N-Ac-Hisz esetében feltételezhetjük a karboxilátcsoport gyenge axiális koordinációját is), ami azt jelenti, hogy a fémion körül nem telített a koordinációs környezet. Ez azt eredményezi, hogy a Cu(II)-ion redukciója a geometriai viszonyok megváltozása nélkül megy végbe. Ezen komplexek



redukciós folyamatai nagy valószínűséggel gyors, reverzibilis redoxi folyamatok.

**17. táblázat:** A vizsgált ligandumok  $[\text{CuL}_2]^{2+}$  komplexjeinek redoxipotenciál értékei normál hidrogénelektrodra vonatkoztatva irodalmi adatokkal kiegészítve

Ligandum	Koordinációs mód	$E^0(\text{V})$
Ac-HVVH-NH <sub>2</sub>	2 × [2 N(Im)]	0,339 (±0,006)
Ac-HGGH-NH <sub>2</sub>	2 × [2 N(Im)]	0,341 (±0,003)
Ac-HGH-NHMe	2 × [2 N(Im)]	0,287 (±0,001)
Ac-S1H2-NH <sub>2</sub>	2 × [2 N(Im)]	0,303 (±0,002)
Imidazol <sup>20</sup>	2 × N(Im)	0,317
Ciklo(AspAspHm) <sup>99</sup>	2 × [N(Im), CO]	0,214
Ciklo(GluGluHm) <sup>99</sup>	2 × [N(Im), CO]	0,344

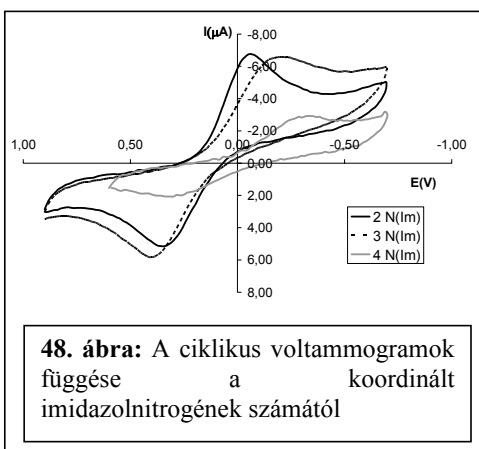
A peptidek  $\text{CuL}_2$  komplexjeinek redukálhatósága hasonló az egyszerű hisztidinszármazékokéhoz, de a két ligandum kétfogú koordinációval négy imidazolnitrogénen keresztül köti a fémiont (47. ábra). Ez a koordinációs mód telíti a Cu(II)-ion koordinációs szféráját az ekvatoriális síkban. Így ezen komplexek redoxi átalakulása során szükség van arra, hogy a fémion körüli koordinációs környezet átrendeződjön. A Cu(I)-komplexekben ugyanis a lineáris, síkháromszöges vagy tetraédes geometria a kedvezményezett. Ez az átrendeződés azt eredményezi, hogy kvázireverzibilis redoxi folyamatok játszódhatnak le, a katódos és anódos csúcsok távolsága nagyobb lesz a voltammogramon. A legnagyobb csúcscsепaráció-értéket az Ac-S1H2-NH<sub>2</sub> és az Ac-HVVH-NH<sub>2</sub> ligandumok  $[\text{CuL}_2]^{2+}$  komplexjeire határoztuk meg. Nagy valószínűséggel ez az érték azzal magyarázható, hogy a komplexek merev szerkezetűek, ami a nagyobb méretű oldalláncoknak köszönhető (szarkozin, valin).

A ligandumok  $[\text{CuL}]^{2+}$  komplexjeinek redoxipotenciál értékei a 0,200-0,400 V-os tartományba esnek. Ezek az értékek függenek a peptidláncban helyetfoglaló hisztidinek számától és egymáshoz viszonyított pozíciójától is. Minden komplexben minden oldalláncbéli imidazolnitrogén kötődik, így a mérésekhez kiválasztott pH-értékeken 2, 3 vagy 4 nitrogéndonoratómot tartalmazó komplexeket vizsgáltunk. A vizsgált  $[\text{CuL}]^{2+}$  komplexek redoxipotenciál értékeit a 18. táblázat foglalja össze.

**18. táblázat:** A vizsgált ligandumok  $[CuL]^{2+}$  komplexeinek redoxipotenciál értékei normál hidrogénelektrodra vonatkoztatva irodalmi adatokkal kiegészítve

Ligandum	Koordinációs mód	$E^0$ (V)
Ac-HVVH-NH <sub>2</sub>	2 × N(Im)	0,389 (±0,002)
Ac-HGGH-NH <sub>2</sub>	2 × N(Im)	0,390 (±0,002)
Ac-HHVGD-NH <sub>2</sub>	2 × N(Im)	0,346 (±0,0045)
Ac-HGH-NHMe	2 × N(Im)	0,351 (±0,001)
Ac-HHGH-NHMe	3 × N(Im)	0,313 (±0,006)
Ac-HVHGH-NH <sub>2</sub>	3 × N(Im)	0,311 (±0,003)
Ac-HAHPH-NH <sub>2</sub>	3 × N(Im)	0,244 (±0,002)
Ac-HAHVH-NH <sub>2</sub>	3 × N(Im)	0,295 (±0,001)
Ac-S2H3-NH <sub>2</sub>	3 × N(Im)	0,293 (±0,01)
Ac-HVHAH-NH <sub>2</sub>	3 × N(Im)	0,253 (±0,009)
Ac-S3H4-NH <sub>2</sub>	4 × N(Im)	0,194 (±0,014)
Cyclo(AspAspHm) <sup>19</sup>	2 × N(Im)	0,229
Cyclo(GluGluHm) <sup>19</sup>	2 × N(Im)	0,199

Az értékeket összehasonlítva azt láthatjuk, hogy amennyiben nő a koordinálódott imidazolnitrogének száma a Cu(II)-ion koordinációs környezetében, úgy csökkennek a komplexek redoxipotenciál értékei, azaz a redukálhatóságuk (48. ábra). Az imidazolnitrogének számának növekedésével egyre telítettebb lesz a fémion koordinációs szférája, ami stabilisabbá teszi a komplexek szerkezetét. Így azon komplexekben, amelyekben a fémion három- illetve négy imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik, a koordinációs

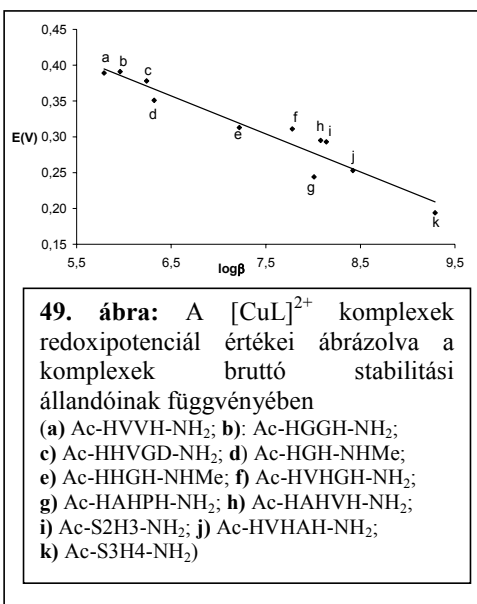


környezetben jelentős átrende-ződés játszódik le. Ez magyarázza a katódos és az anódos csúcsok nagyobb szeparációját. Másrészt, ha összehasonlítjuk az azonos számú hisztidint tartalmazó ligandumok komplexek redoxipotenciál értékeit, azt látjuk, hogy a legkisebb értékek a HXH szekvenciát tartalmazó ligandumok  $[\text{CuL}]^{2+}$  komplexeihez tartoznak.

Ez összhangban van azzal a megállapítással, amelyet az oldategyensúlyi vizsgálatok során tettek: azok a makrokelátot képező, imidazolnitrogénes koordinációjú komplexek termodinamikailag a legstabilisabbak, amelyekben a peptidszekvencia  $(\text{HX})_n\text{-H}$  ( $n = 1\text{-}3$ )<sup>83</sup>. A komplexek redoxipotenciál értékeinek változása szorosan összefügg tehát az egyes komplexek stabilitásával. A 49. ábrán látható diagramon a  $[\text{CuL}]^{2+}$  komplexek redoxipotenciál értékeit ábrázoltuk a bruttó stabilitási állandók függvényében. Az ábrázolt adatok jól illeszkednek egy egyenesre. Az ábráról is leolvasható, hogy minél nagyobb a komplex stabilitása, annál kisebb redoxipotenciál érték jellemzi az adott komplexet, azaz annál nehezebb redukálni a fémcentrumot.

Mind a  $[\text{CuL}]^{2+}$ , mind a  $[\text{CuL}_2]^{2+}$  komplexekre kapott redoxipotenciál értékek 0,200 és 0,400 V közé esnek. Ezek a pozitív értékek azt mutatják, hogyha a fémion 2, 3 vagy 4 imidazolnitrogénes keresztül koordinálódik, akkor könnyebben lehet redukálni, mintha deprotonált amidnitrogénesen keresztül kapcsolódna a ligandumhoz. Ha összehasonlítjuk a  $[\text{CuL}]^{2+}$  és a  $[\text{CuL}_2]^{2+}$  komplexre kapott értékeket, akkor azt látjuk, hogy a  $[\text{CuL}]^{2+}$  komplexek nehezebben redukálhatók.

Azzal azonban, hogy valamennyi érték a pozitív potenciáltartományba esik, azt feltételezhetjük, hogy ezek a komplexek potenciális SOD modellek. Azok a komplexek lehetnek hatékony modellek, amelyek a természetes enzimhez hasonló módon bontják el a szuperoxid gyökianiont. A természetes Cu,Zn-SOD enzimet jellemző redoxipotenciál érték szintén a 0,200 és 0,400 V-os feszültségtartományba esik, a mért értékek attól függően változnak, hogy milyen forrásból származik a vizsgált enzim<sup>111,159</sup>.



### 4.2.3. Bisz(imidazol-2-il) származékok réz(II)komplexeinek vizsgálata

A Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzim aktív centruma olyan komplexekkel is modellezhető, amelyek tartalmazzák a két fémion-kötőhelyet összekötő imidazolátohidat. Ilyen típusú modellvegyületnek szánták kutatócsoportunkban a bisz(imidazol-2-il) metánt és annak származékait. Mivel ezen ligandumok Cu(II)-iont tartalmazó rendszereinek oldategyensúlyi vizsgálata során azt tapasztalták, hogy kialakulnak imidazolnitrogénes koordinációt valamint imidazolátohidas szerkezetet tartalmazó komplexek, érdemes tovább folytatni a komplexek vizsgálatát a redoxipotenciál értékek meghatározásával.

A ciklikus voltammetriás mérésekhez ezen komplexek vizsgálata során is a kifejlesztett mikrocellát használtuk (18. ábra), és ezekben az esetekben is csak nagy ligandumfelesleg alkalmazása mellett kaptunk értékelhető voltammogramokat. Minden esetben rögzítettük a teljesen deprotonált ligandum ciklikus voltammogramját, és azt tapasztaltuk, hogy a ligandum nem vesz részt redoxi folyamatban. A voltammetriás mérések során beállított körülményeket és a voltammogramokból leolvasható primer adatokat a 19. táblázatban foglaltam össze.

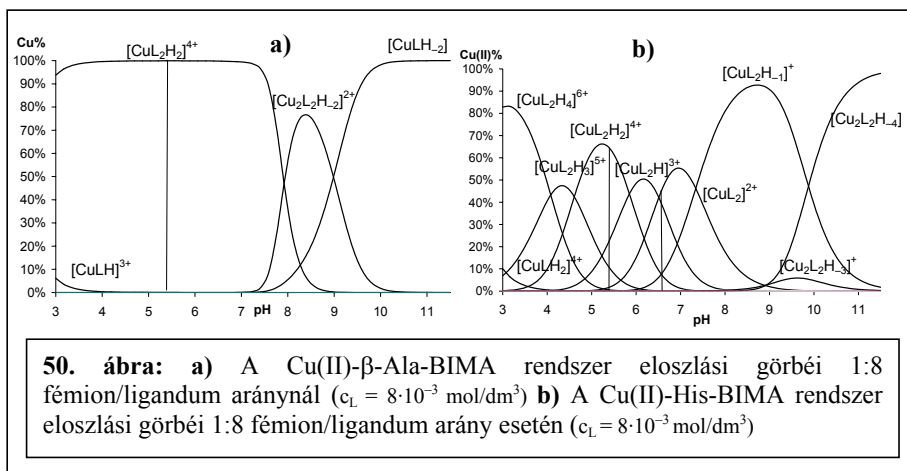
**19. táblázat:** Bisz(imidazol-2-il) származékok Cu(II)-komplexeinek ciklikus voltammetriás mérése során beállított körülmények és a voltammogramokból leolvasható adatok

ligandumok	Cu(II)/ligandum arány	pH	$E_k$ (V)	$E_a$ (V)	$i_a/i_k$	Pásztázási sebesség (mV/sec)
<b>BIM</b>	1:10	6,90	-0,377	-0,183	0,68	50
<b>BIMA</b>	1:8	6,30	-0,358	-0,248	1,40	100
<b>Z-Gly-BIMA</b>	1:10	5,04	-0,280	-0,0161	0,61	50
<b>Z-Ala-BIMA</b>	1:10	5,87	-0,449	-0,0430	1,66	50
<b><math>\beta</math>-Ala-BIMA</b>	1:8	5,30	-0,311	-0,211	1,03	50
<b>His-BIMA</b>	1:8	5,33	-0,243	-0,102	0,99	100
<b>His-BIMA</b>	1:8	6,49	-0,277	-0,148	1,10	100

Ezen adatok alapján megállapítható, hogy a bisz(imidazol-2-il) származékok esetében is nagyobb a katódos és az anódos csúcsok távolsága, mint az 59 mV. Az anódos és a katódos csúcsáram értékek aránya viszont közel egy, így azt

mondhatjuk, hogy a rendszerek kvázireverzibilis redoxi átalakuláson mennek keresztül.

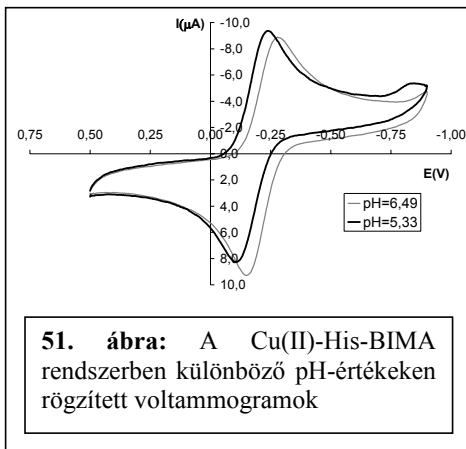
A vizsgált Cu(II)-ligandum rendszerekben képződő komplexek stabilitási állandói ismeretében eloszlási görbéket készítettünk a ciklikus voltammetriás mérés koncentrációviszonyainak megfelelően. Ezen görbék segítségével állítottuk be azokat a pH-értékeket, amelyeken kialakuló részecskék redoxipotenciál értékét meghatároztuk (19. táblázat.). Példaként az 50. ábrán a Cu(II)- $\beta$ -Ala-BIMA és a Cu(II)-His-BIMA rendszerek eloszlási görbéit tüntettem fel, amelyeket 1:8 fémion/ligandum arány mellett ábrázoltunk. A függőleges vonalak jelölik a mérésekhez beállított pH-értékeket. Az 50. ábra és a 19. táblázat adatai alapján látható, hogy minden esetben savas illetve semleges körülmények között rögzítettük a voltammogramokat. Valamennyi rendszerben az alkalmazott ligandumfelesleg mellett biszkomplexek képződnek, amelyekben a fémion négy imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik. Ezen komplex általános szerkezetét a dolgozat 10. ábrája szemlélteti.



Néhány rendszer esetében különböző pH-értékeken is rögzítettünk voltammogramokat. A pH növelésével a nemkoordinálódó donorcsoportok ( $\text{NH}_2$ , Im) deprotonálódnak, ami a Cu(II)-His-BIMA rendszerben nincs hatással a voltammogramok alakjára (51. ábra), azaz mindössze kismértékű változást eredményez a mért redoxipotenciál értékekben. Amennyiben tovább növeljük a pH-t, jelentősen megnő a két csúcs közötti távolság, majd a komplex elbomlik. A  $\beta$ -Ala-BIMA esetében a deprotonálódás együtt jár egy kétmagvú komplex kialakulásával  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_2]^{2+}$ , amelynek megjelenése növeli az oxidáló képességet, így kismértékben növekszik a redoxipotenciál érték is. A lúgos

tartományban ezen ligandum esetében sem lehetett ciklikus voltammetriás mérést végezni.

Általában elmondhatjuk azt, hogy egyik rendszer esetében sem tudunk 1:1 fémion ligandum aránynál voltammogramot rögzíteni. Ahogy azt a dolgozat irodalmi áttekintés részében bemutattam, fémionfelesleg mellett kétmagvú komplexek is keletkezhetnek a bisz(imidazol-2-il) ligandumok aminosav származékai esetében. A Cu,Zn-SOD enzim modellezése szempontjából igen ígéretesnek tűnő imidazolátohidas  $[Cu_3L_2H_4]^{2+}$  komplex redoxipotenciál értékét azonban nem tudtuk meghatározni, 3:2 fémion/ligandum aránynál nem kaptunk értékelhető voltammogramot. A ligandumfelesleg mellett meghatározott redoxipotenciál értékeket a 20. táblázat foglalja össze.



**51. ábra:** A Cu(II)-His-BIMA rendszerben különböző pH-értékeken rögzített voltammogramok

**20. táblázat:** A vizsgált bisz(imidazol-2-il) származékok komplexeinek redoxipotenciál értékei normál hidrogénelektrodra vonatkoztatva

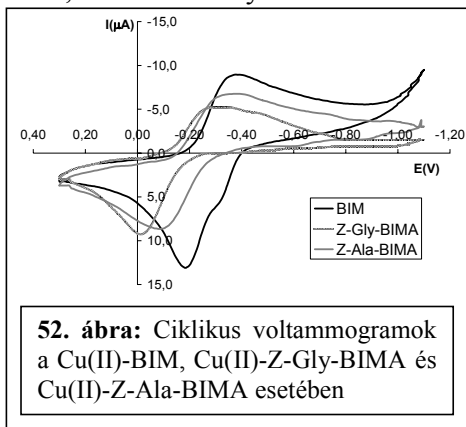
ligandumok	$E^0$ (V) Komplex: $CuL_2$	$E^0$ (V) Komplex: $CuL_2H_2$
<b>BIM</b>	-0,075 ( $\pm 0,005$ )	–
<b>BIMA</b>	-0,091 ( $\pm 0,001$ )	–
<b>Z-Gly-BIMA</b>	0,055 ( $\pm 0,005$ )	–
<b>Z-Ala-BIMA</b>	-0,023 ( $\pm 0,009$ )	–
<b><math>\beta</math>-Ala-BIMA</b>	–	-0,051 ( $\pm 0,002$ )
<b>His-BIMA</b>	-0,024 ( $\pm 0,002$ )	0,039 ( $\pm 0,002$ )

Valamennyi esetben a redoxipotenciál értékek 0 körüli értékek. A legkisebb érték a BIMA  $CuL_2$  komplexéhez tartozik, ami azt mutatja, hogy ezen komplex esetében a legnehezebb redukálni a fémcentrumot. Ez magyarázható azzal, hogy ebben a rendszerben képződik a legstabilisabb komplex; a fémion az imidazol-nitrogének mellett az amino-csoporthoz is koordinálódik. Ennek köszönhető a megnövekedett stabilitása. Általában megállapíthatjuk, hogy minél kisebb egy komplexhez tartozó redoxipotenciál érték, az annál nagyobb stabilitással rendelkezik. Ha a meghatározott adatok közül kiemeljük a BIMA, BIM, Z-Ala-BIMA és Z-Gly-BIMA  $CuL_2$  komplexéhez tartozó adatokat, láthatjuk, hogy ezek ebben a sorrendben növekednek. Ez a sorrend ismét összhangban van a kialakuló komplexek stabilitásával; minél nagyobb

oldallánc kapcsolódik az alapvegyülethez, annál könnyebb redukálni a fémcentrumot. Az 52. ábrán látható voltammogramok is szemléltetik a stabilitással összefüggő változást, folyamatosan tolódnak a pozitív tartomány felé a görbék.

Összefoglalásképpen megállapíthatjuk, hogy a vizsgált bisz(imidazol-2-il) származékok Cu(II)-komplexei jó SOD modellek lehetnek, hiszen 0 V körüli redoxipotenciál értékeik belesznek a  $-0,16$  V és  $+0,89$  V-os tartományba ((6)

és (7) egyenlet). A több hisztidint tartalmazó ligandumok Cu(II)-komplexeihez képest azonban kevésbé hatékonyak tűnnek, hiszen kisebb redoxipotenciál érték jellemzi őket, ezek az értékek jóval közelebb vannak a fenti redoxipotenciál tartomány alsó határához. Az elektrokémiai vizsgálat azonban nem elegendő ahhoz, hogy egy komplexről egyértelműen kijelenthessük, megfelelő SOD modell vegyület. Ehhez elengedhetetlen a Cu(II)-komplekek SOD-aktivitásának vizsgálata, így doktori dolgozatom következő fejezetében az elvégzett aktivitás vizsgálatok eredményeit mutatom be.



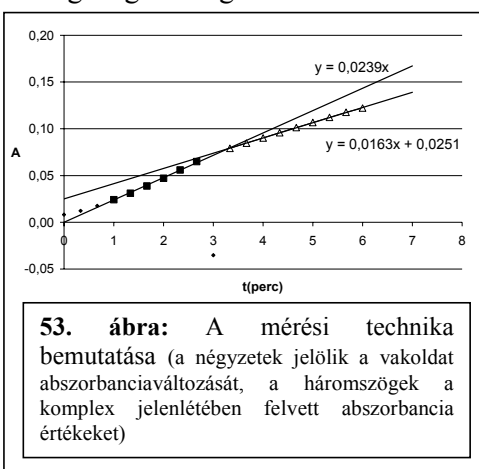


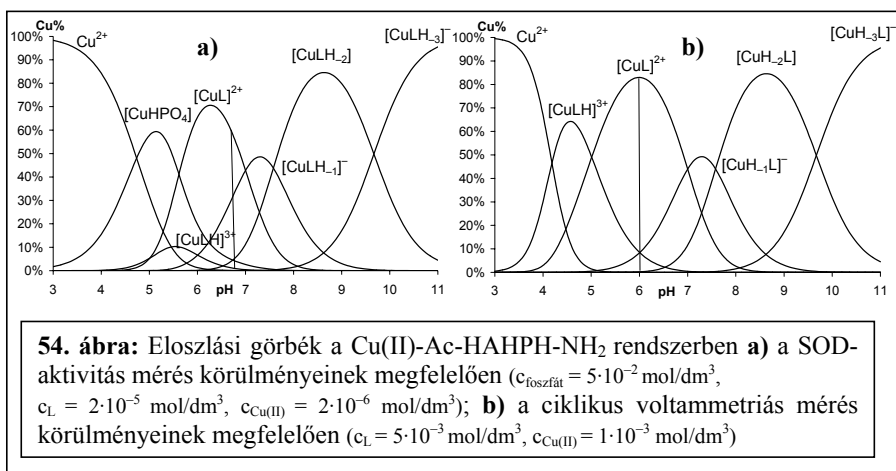
### 4.3. Szuperoxid-diszmutáz aktivitás vizsgálatok

Elektrokémiai vizsgálatainkat követően a redoxi szempontból ígéretesnek tűnő imidazolnitrogénes koordinációt tartalmazó Cu(II)-komplexek (bisz(imidazol-2-il) származékok és multihisztidin peptidek Cu(II)-komplexei) szuperoxid-diszmutáz aktivitását mértük meg. Kiegészítettük a tanulmányozott komplexek körét a Cu(II)-His-BIMA rendszerben képződő imidazolátohidas komplex vizsgálatával is.

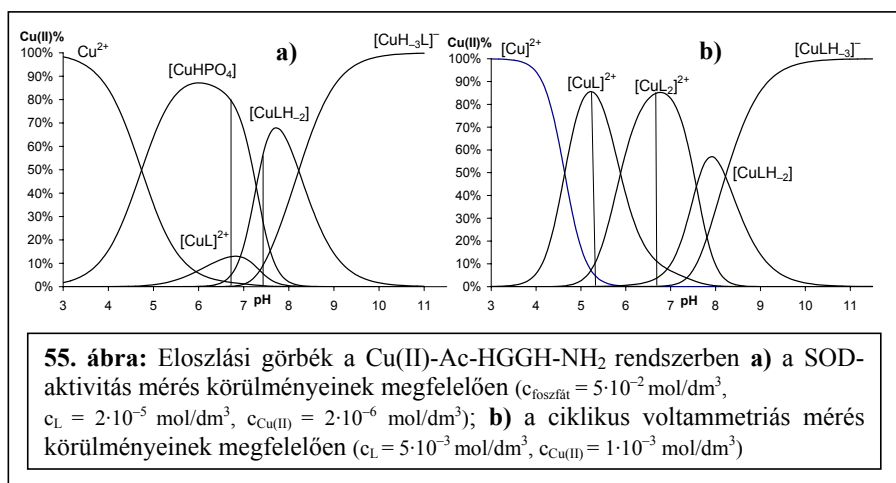
Méréseinkhez az irodalomból ismert közvetett technikát használtuk, amelynek részletes leírását a kísérleti körülmények részben (3.8. fejezet) ismertettem. Xantinból xantin-oxidáz segítségével generáltunk *in situ* szuperoxid gyökiont, majd ennek reakcióját követtük nyomon nitroblue-tetrazólium-klorid (NBT) segítségével. A mérési adatok pontossága és reprodukálhatósága szempontjából az a módszer bizonyult a leginkább megfelelőnek, amikor a mérést a vakoldattal kezdtük, körülbelül 3-4 percig ennek követtük az abszorbancia-változását, majd hozzáadtuk a pufferben elkészített komplex oldatát a mintához, és újabb 3-4 percig követtük az abszorbancia-változást. Az 53. ábrán egy primer adatokat tartalmazó görbét látunk. Egyenest illesztettünk a vakolat mérés során felvett pontokra, majd a komplex hozzáadása után felvett pontokra is, és a meredekségeket olvastuk le. Azt vártuk, hogy az abszorbancia-változás kisebb lesz a komplex hozzáadása után, mert a komplex bontja a szuperoxid gyökiont. Az abszorbanciaváltozás sebességéből a (27) egyenlet alapján számítottuk ki az  $IC_{50}$  értékeket.

A SOD-aktivitás méréseknél a mintákat valamennyi esetben a megfelelő pH-jú  $H_2PO_4^- - HPO_4^{2-}$  pufferoldattal készítettük el. Mivel a vizsgálat során viszonylag nagy koncentrációban van jelen a foszfátion ( $c = 0,05 \text{ mol/dm}^3$ ) a vizsgált komplex mennyiségéhez képest ( $c \sim 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ ), ezért a koncentrációeloszlási görbék készítésénél ezeket a koncentrációértéket figyelembe kellett venni. A Cu(II)-foszfát rendszerben kialakuló részecskék stabilitási állandó értékei irodalmi adatokból származnak<sup>160</sup>. Azt tapasztaltuk, hogy bizonyos rendszerekben (például a Cu(II)-Ac-HAHPH-NH<sub>2</sub>) a foszfátion





jelenléte nem befolyásolja az imidazolnitrogénes koordinációt tartalmazó komplexek kialakulását, azok ugyanolyan pH-értéken vannak jelen az oldatban, mint a ciklikus voltammetriás mérések során alkalmazott körülmények között. (54. ábra). A vizsgált rendszerek közül azonban például az Ac-HGGH-NH<sub>2</sub> peptid esetében – ahol a CuL komplex stabilitása kisebb – jelentős szerepe van a foszfátion jelenlétének: lecsökken az imidazolnitrogénes koordinációt tartalmazó komplex mennyisége (55. ábra), így a SOD-aktivitás méréshez beállított pH-értékek kiválasztásánál ezt figyelembe kellett vennünk.



Megnehezítette a helyzetet az a tény, hogy az irodalomban közölt adatok döntően 6,8-7,8-as pH-tartományban megmért SOD-aktivítások, és az ebben a pH-tartományban jelenlévő komplexekben a fémion a legtöbb esetben az imidazolnitrogén mellett az amidnitrogéneken keresztül koordinálódik. Az

általunk vizsgált rendszerekben viszont több esetben is az imidazolnitrogénes koordinációjú komplexek maximális mennyisége pH~5-6 körül figyelhető meg.

Azt is tapasztaltuk az adatok összevetése során, hogy a mérési körülmények és a pH is befolyásolják a SOD-aktivitás értékeit. Ezt szemlélteti a 21. táblázat.

**21. táblázat:** A Cu,Zn-SOD enzim SOD-aktivitás értékei különböző körülmények között

módszer	pH	IC <sub>50</sub> (Cu,Zn-SOD) [μM]	Hiv.	IC <sub>50</sub> Cu(II) [μM]	Hiv.	Relatív aktivitás [%]
Indirekt NBT	6,8	0,0045	126	–	–	–
Indirekt NBT	6,8	0,001-0,006	112	0,06-0,35	112	1,67
Indirekt NBT	6,8	0,0030	saját mérés	0,25	saját mérés	1,2
Indirekt NBT	7,0	0,014	120	1,06	120	1,32
Indirekt NBT	7,4	0,0084	21	–	–	–
Indirekt NBT	7,4	0,0012	79	–	–	–
Indirekt NBT	7,4	0,0044	saját mérés	0,34	saját mérés	1,29
Indirekt NBT	7,5	0,4	123	–	–	–
Indirekt citokróm c	7,8	0,002	161	–	–	–
Indirekt NBT	7,8	0,04	161	–	–	–
Indirekt NBT (szuperoxid-generálás KO <sub>2</sub> -dal)	7,8	0,06	161	–	–	–

Ennek alapján nem adhat valós információt egy komplex aktivitásáról az, ha a rá jellemző IC<sub>50</sub> értéket egy olyan aktivitás-értékkel hasonlítjuk össze, amelyet más pH-értéken, egy másik kutatócsoport – esetleg más mérési technikát alkalmazva – mért meg. Ugyanakkor az is tükröződik az irodalmi adatokból, hogy a különböző technikákkal elvégzett mérések adatainak összehasonlítása úgy válik lehetővé, hogyha a mért IC<sub>50</sub> értékeket az ugyanolyan körülmények között a Cu,Zn-SOD-ra mért IC<sub>50</sub> értékkel vetjük össze relatív aktivitást számolva ((29) egyenlet) amely megmutatja a vizsgált rendszerek aktivitását az adott körülményeken mért enzimaktivitáshoz képest. Így a különböző irodalmi adatok alapján pl. a Cu(II)-foszfát rendszerekre közel azonos relatív aktivitás értékek számíthatók. Ahhoz, hogy összehasonlítást tudjunk végezni az irodalmi adatokkal, az általunk kiválasztott két pH-értéken (6,8 és 7,4) meghatároztuk a

natív enzim és a Cu(II)-foszfát rendszer aktivitását, és kiszámítottuk a relatív aktivitást.

Saját, Cu(HPO<sub>4</sub>) részecskéhez rendelhető mérési adataink relatív aktivitás értékei jó egyezést mutatnak a korábban vizsgált rendszerekben meghatározott értékekkel. Ez az egyezés azt mutatja, hogy az általunk alkalmazott kísérleti módszer megbízhatóan alkalmazható Cu(II)-komplexek SOD-aktivitásának meghatározására. A relatív aktivitás érték segítségével pedig az egyéb eredményekkel való összehasonlítás is lehetővé válik, így a továbbiakban elsősorban ezeket az értékeket fogom bemutatni.

Doktori munkám során számos hisztidint tartalmazó peptid és két bisz(imidazol-2-il) származék Cu(II)-komplexének SOD-aktivitás értékét határoztuk meg, a fenti megállapításokat figyelembe véve. Valamennyi esetben elkészítettük a mérési körülményeknek megfelelő eloszlási görbéket, és megállapítottuk, hogy mely részecskék vannak jelen a mérésekhez beállított pH-értéken az oldatban. A 22. táblázat foglalja össze a mérési adataink alapján számolt IC<sub>50</sub> értékeket és az egyes komplexek koordinációs viszonyait. Összehasonlításképpen néhány olyan peptid Cu(II)-komplexének azonos pH-értéken mért enzimutató aktivitás értékét is feltüntettem, amelyek esetében megmérték a természetes enzim aktivitását is, így számolható a relatív aktivitás érték.

A 6,8-as pH-értéken végzett vizsgálatok során azt láttuk, hogy önmagában a Cu(HPO<sub>4</sub>) részecske is jelentős SOD-aktivitást mutat. Ezen a pH-értéken főleg azokat a komplexeket tudtuk vizsgálni, amelyekben a fémion csak az imidazolnitrogénen keresztül koordinálódik. A [CuL]<sup>2+</sup> komplexek azonban nem egyeduralkodók a Cu(II)-Ac-S1H2-NH<sub>2</sub>, Cu(II)-Ac-HHGH-NH<sub>2</sub>, Cu(II)-Ac-HAHPH-NH<sub>2</sub> és Cu(II)-Ac-S2H3-NH<sub>2</sub> rendszerek esetében; ezen a pH-értéken már elkezdődik az amidnitrogén deprotonálódása, és az eloszlási görbék alapján a [CuLH<sub>1</sub>]<sup>+</sup> komplex 20-30 %-ban van jelen az oldatban (példa: 54. a) ábra). Ezért megállapíthatjuk, hogy a felsorolt négy ligandumra meghatározott IC<sub>50</sub> érték nemcsak a [CuL]<sup>2+</sup> komplexhez tartozik, hanem tükrözi a [CuLH<sub>1</sub>]<sup>+</sup> komplex hozzájárulását is.

Ha összehasonlítjuk a különböző peptidokkal képzett komplexekhez tartozó IC<sub>50</sub> értékeket, megfigyelhetjük, hogy a legkevésbé aktív a HXXH szekvenciájú tetrapeptidek bizonyultak. Ez a megállapítás összhangban van a képződő komplexek termodinamikai stabilitásával is: amennyiben a peptidláncban egymástól két aminosav távolságban helyezkednek el a hisztidinek, kisebb stabilitású komplexek keletkeznek. Ahogy nő a koordinált imidazolnitrogén száma, úgy növekszik a komplexek SOD-aktivitás értéke is.

**22. táblázat:** A SOD-aktivitás mérések során vizsgált Cu(II)-komplexek IC<sub>50</sub> értékei irodalmi adatokkal kiegészítve

<b>pH = 6,8</b>	<b>IC<sub>50</sub> [μM]</b>	<b>Relatív aktivitás (%)</b>	<b>Részecskék</b>	<b>Koordinációs mód</b>
Cu,Zn-SOD	0,0030	100	–	–
Cu <sup>II</sup> (HPO <sub>4</sub> )	0,25	1,20	–	–
Cu <sup>II</sup> -Ac-HGGH-NH <sub>2</sub>	0,27	1,11	[CuL] <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	2 × N(lm)
Cu <sup>II</sup> -Ac-HVVH-NH <sub>2</sub>	0,20	1,50	[CuL] <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	2 × N(lm)
Cu <sup>II</sup> -Ac-SIH2-NH <sub>2</sub>	0,21	1,43	[CuL] <sub>2</sub> <sup>2+</sup> ; [CuLH <sub>-1</sub> ] <sup>+</sup>	2 × N(lm); N <sup>-</sup>
Cu <sup>II</sup> -Ac-HHGH-NH <sub>2</sub>	0,17	1,76	[CuL] <sub>2</sub> <sup>2+</sup> ; [CuLH <sub>-1</sub> ] <sup>+</sup>	3 × N(lm); 2 × N(lm), N <sup>-</sup>
Cu <sup>II</sup> -Ac-HAHPH-NH <sub>2</sub>	0,12	2,50	[CuL] <sub>2</sub> <sup>2+</sup> ; [CuLH <sub>-1</sub> ] <sup>+</sup>	3 × N(lm); N(lm), N <sup>-</sup>
Cu <sup>II</sup> -Ac-S2H3-NH <sub>2</sub>	0,24	1,25	[CuL] <sub>2</sub> <sup>2+</sup> ; [CuLH <sub>-1</sub> ] <sup>+</sup>	3 × N(lm)
Cu <sup>II</sup> -Ac-S3H4-NH <sub>2</sub>	0,11	2,73	[CuL] <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	4 × N(lm)
Cu <sup>II</sup> -β-Ala-BIMA	0,15	2,00	[CuL] <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	4 × N(lm)
Cu <sup>II</sup> -Ac-HHGH-OH <sup>125</sup>	0,13	3,46	[CuL] <sub>2</sub> <sup>2+</sup> ; [CuLH <sub>-1</sub> ] <sup>+</sup>	3 × N(lm); 3 × N(lm), OH <sup>-</sup>
<b>pH = 7,4</b>				
Cu,Zn-SOD	0,0044	100	–	–
Cu <sup>II</sup> (HPO <sub>4</sub> )	0,34	1,29	–	–
Cu <sup>II</sup> -Ac-HGGH-NH <sub>2</sub>	0,38	1,16	[CuLH <sub>-2</sub> ]; ([CuLH <sub>-3</sub> ] <sup>+</sup> )	2 × N(lm), 2 × N <sup>-</sup> ; N(lm), 3 × N <sup>-</sup>
Cu <sup>II</sup> -Ac-HVVH-NH <sub>2</sub>	0,63	0,70	[CuL] <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	2 × N(lm)
Cu <sup>II</sup> -His-BIMA (1:10)	0,64	0,69	[CuL <sub>2</sub> H] <sup>3+</sup>	3 × N(lm)
Cu <sup>II</sup> -Ac-S2H3-NH <sub>2</sub>	0,15	2,93	[CuLH <sub>-1</sub> ] <sup>+</sup> ; ([CuL] <sub>2</sub> <sup>2+</sup> )	3 × N(lm), N <sup>-</sup> ; 3 × N(lm)
Cu <sup>II</sup> -His-BIMA (3:2)	0,070	6,29	[Cu <sub>3</sub> L <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ] <sup>2+</sup>	4 × N(lm) +imidazolátó híd
Cu <sup>II</sup> -Ac-S3H4-NH <sub>2</sub>	0,046	9,56	[CuL] <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	4 × N(lm)
Cu <sup>II</sup> -HVH <sup>79</sup>	0,20	0,60	[CuLH <sub>-1</sub> ] <sup>+</sup> ; ([CuLH <sub>-2</sub> ])	2 × N <sup>-</sup> , N(lm), NH <sub>2</sub>
Cu <sup>II</sup> -Ac-HVVH-NH <sub>2</sub> <sup>79</sup>	0,16	0,70	[CuLH <sub>-2</sub> ]	2 × N(lm), 2 × N <sup>-</sup>
Cu <sup>II</sup> -Ac-HPHH-NH <sub>2</sub> <sup>126</sup>	0,26	3,23	[CuLH <sub>-1</sub> ] <sup>+</sup>	2 × N <sup>-</sup> , N(lm)

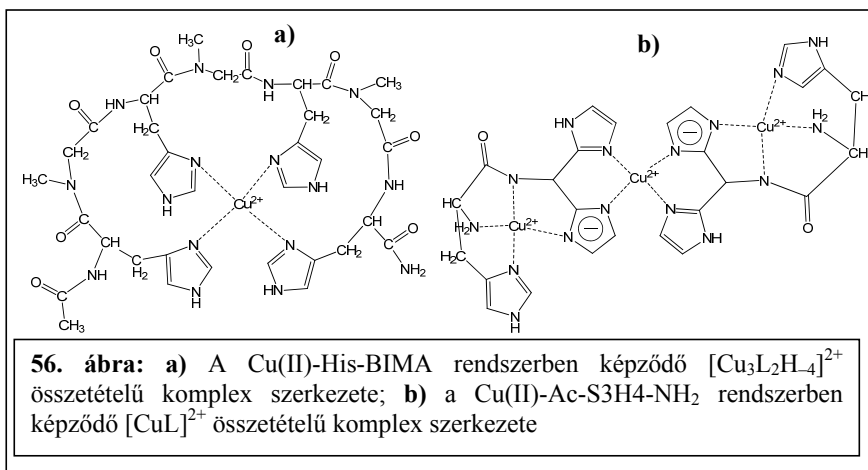
Ezen értékek között kiugrónak mutatkozik az Ac-S2H3-NH<sub>2</sub> pentapeptid Cu(II)-komplexeire meghatározott IC<sub>50</sub> és relatív aktivitás érték (0,24 μM, és 2,73%). Ezt az értéket azzal magyarázhatjuk, hogy 6,8-as pH-értéken a fémion közel 50 %-a a [CuLH<sub>1</sub>]<sup>+</sup> komplexben van jelen. Ez a komplex egy vegyes hidroxokomplex, a fémion körül kialakuló telítettebb koordinációs környezet okozhatja a kisebb aktivitást.

Jancsó és munkatársai vizsgálták korábban az Ac-HHGH-OH peptid Cu(II)-komplexeinek SOD-aktivitását<sup>126</sup>, ezen peptid C-terminálisan is védett származékát jelen munka keretében tanulmányoztuk. A számolt relatív aktivitás értékek különböznek egymástól, a C-terminálisan nemvédett származék bizonyult aktívabbnak. Ez megint csak összhangban van a komplexek stabilitásával, a nagyobb stabilitású komplex bizonyult hatékonyabbnak. 6,8-as pH-értéken kiemelkedő aktivitást mutat az Ac-S3H4-NH<sub>2</sub> peptid [CuL]<sup>2+</sup> komplexe, amelyben a fémion négy imidazolnitrogénon keresztül koordinálódik. Hasonló koordináció alakul ki az Ac-(HNPGYP)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> és az Ac-(PHGGWGQ)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> peptidfragmensek Cu(II)-iont tartalmazó oldataiban is; az egyes komplexekhez tartozó relatív aktivitás értékek (2,00 % és 3,67 %) jó egyezést mutatnak az általunk meghatározott adattal<sup>128</sup>.

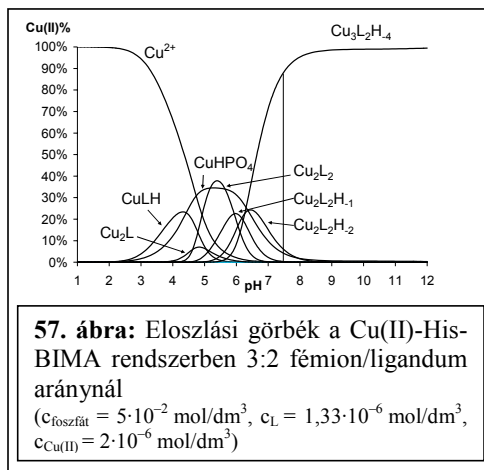
7,4-es pH-értéken is végeztünk SOD-aktivitás méréseket. A Cu(HPO<sub>4</sub>) részecske ezen a pH-értéken is mutat enzimutánzó aktivitást, de kisebbet, mint 6,8-as pH-értéken. Jelentős aktivitáscsökkenés figyelhető meg a két hisztidint tartalmazó tetrapeptidek esetében. Ez azzal magyarázható, hogy ezen a pH-értéken már elkezdődik az amidnitrogének deprotonálódása, így a fémion az imidazolnitrogének mellett az amidnitrogének keresztül is koordinálódik. Az amidnitrogének koordinálódása stabilizálja a Cu(II)-iont, így csökkenti a SOD-aktivitást.

A vizsgált komplexeink közül egy kiugrón jó aktivitást mutat: a három szarkozint tartalmazó heptapeptid [CuL]<sup>2+</sup> komplexe (56. a) ábra; relatív aktivitása: 9,56 %). A Cu(II)-ion ebben a komplexben is négy imidazolnitrogénon keresztül koordinálódik. Ez a koordinációs mód kedvező a SOD-aktivitás szempontjából, a gyengébb ekvatoriális térnek köszönhetően a fémcentrum jobban hozzáférhetővé válik a szuperoxid gyökion számára<sup>79</sup>. Az azonos pH-értéken vizsgált komplexek között nem találtak még ennyire hatékony komplexet.

A Cu(II)-His-BIMA rendszer esetében különböző fémion/ligandum arányok mellett is vizsgáltuk a komplexek aktivitását. Nagy ligandumfelesleg mellett az imidazolnitrogének koordinálódásával [CuL<sub>2</sub>H]<sup>3+</sup> komplex alakul ki, melynek aktivitása hasonlóan kicsi a HXXH szekvenciájú tetrapeptid Cu(II)-komplexeinek aktivitásához. Ez összhangban van a ciklikus voltammetriás

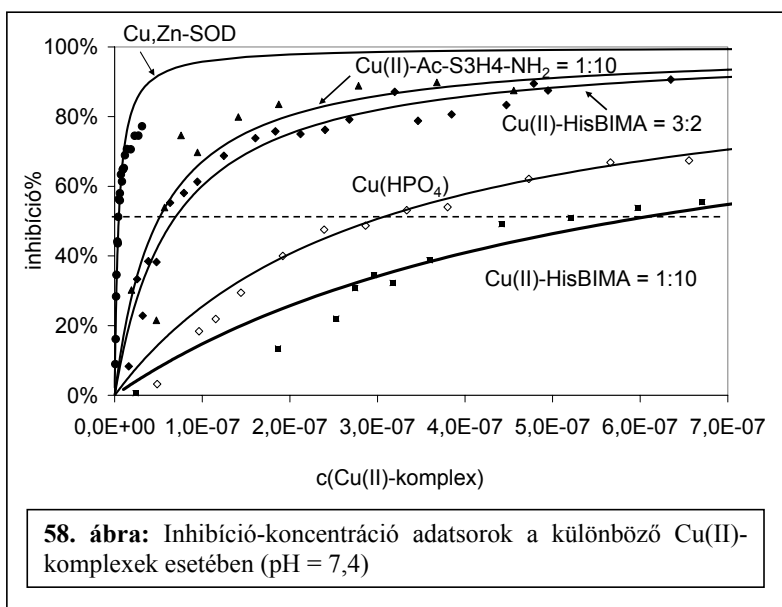


vizsgálatokkal, amelyek alapján sem volt várható jelentős mértékű aktivitás a bisz(imidazol-2-il) származékok  $CuL_2$  komplexeire, hiszen a komplekre jellemző redoxpotenciál érték a szuperoxid gyök elbontásához szükséges potenciál tartomány (2.3.2. fejezet (6) egyenlet) alsó határán van. Azonban 3:2 fémion/ligandum arány esetén 7,4-es pH-értéken már megjelenik a  $[Cu_3L_2H_4]^{2+}$  összetételű komplex (57. ábra), amely szerkezeti szempontból megfelelő modellje a Cu,Zn-SOD enzimnek. Ebben a részecskében imidazolátohid alakul ki, amely a természetes enzimben is összeköti a két fémiont. A komplex szerkezetét az 56. b) ábra mutatja. A hozzá tartozó  $IC_{50}$  érték csaknem egy nagyságrenddel nagyobb, mint a ligandumfelesleg mellett kialakuló komplekre jellemző érték. Ez megerősíti azt a feltételezést, hogy a komplex szerkezete és enzimutató aktivitása között van összefüggés. Ha kiszámítjuk a relatív aktivitás értékét, akkor azt is láthatjuk, hogy a 6,29 %-os érték kiemelkedően jónak mondható.



A 7,4-es pH-értéken vizsgált rendszerek közül a két nagy aktivitást mutató komplex mellett összehasonlításképpen a Cu,Zn-SOD enzim és a

Cu(HPO<sub>4</sub>) részecskéhez tartozó inhibíció-koncentráció adatsort tüntettem fel az 58. ábrán. A pontok a mért értékeket jelölik, folytonos vonal mutatja a Scientist program segítségével számolt telítési görbét. Ezen az ábrán is látható, hogy a Cu(II)-His-BIMA rendszerben 1:10 fémion/ligandum aránynál képződő komplex igen kis aktivitást mutat. A 3:2 fémion/ligandum aránynál kialakuló komplex viszont már jobban közelíti a természetes enzimet jellemző pontsorozatot. Hasonló lefutású az Ac-S3H4-NH<sub>2</sub> ligandum [CuL]<sup>2+</sup> komplexét jellemző telítési görbe is.



Összességében megállapíthatjuk, hogy a SOD-aktivitás méréseket illetve a Cu(II)-peptid rendszerekben kialakuló komplexek enzimutánozó aktivitását több tényező befolyásolja.

a) Egyrészt nem szabad figyelmen kívül hagynunk azt a tényt, hogy amennyiben H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> - HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> pufferoldatot tartalmazó közegben dolgozunk, a Cu(HPO<sub>4</sub>) részecske is mutat SOD-aktivitást. A mérésekhez alkalmazott igen kis koncentráció-értékekkel elkészített eloszlási görbék azt mutatták, hogy megváltoznak az oldatbeli viszonyok, így egy kiválasztott pH-értéken ellenőriznünk kell, hogy az adott körülmények között mely komplexek és milyen arányban vannak jelen.

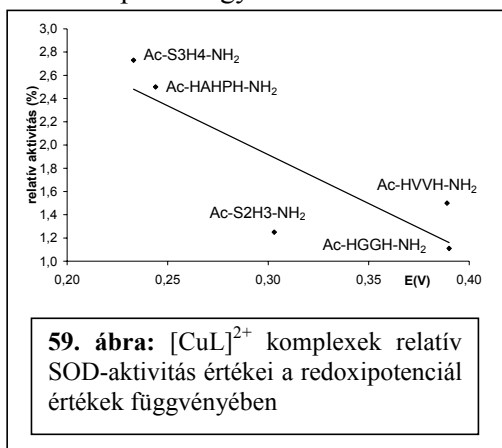
b) A kialakuló komplexek közül azokat vizsgáltuk, amelyekben a fémionok főleg imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódnak, hiszen ez felel meg a Cu,Zn-SOD enzimben levő réz(II)-ion koordinációs környezetének. A pH



növelésével az amidnitrogének deprotonálódnak, és a fémionhoz koordinálódnak. Ez a folyamat együtt jár a SOD-aktivitás csökkenésével.

c) Azt is tapasztaltuk, hogy minél nagyobb termodinamikai stabilitású a Cu(II)-komplex, annál nagyobb aktivitást mutat a szuperoxid gyökánionnal szemben.

Vizsgáltuk, hogy van-e összefüggés egy adott komplex redoxipotenciál értéke és relatív aktivitása között. Ha ábrázoljuk a vizsgált hisztidintartalmú peptidok  $[\text{CuL}]^{2+}$  komplexére jellemző relatív aktivitást a komplexre jellemző redoxipotenciál értékének függvényében (59. ábra) látható, hogy minél kisebb redoxipotenciál érték jellemzi a komplexet, annál nagyobb SOD-aktivitással rendelkezik. Ez összhangban van a stabilitással is. Az összefüggések részletes magyarázatához azonban még további vizsgálatokra van szükség.



**59. ábra:**  $[\text{CuL}]^{2+}$  komplexek relatív SOD-aktivitás értékei a redoxipotenciál értékek függvényében

d) Az elvégzett SOD aktivitás vizsgálatok azt mutatták, hogy a négy hisztidint tartalmazó heptapeptid  $[\text{CuL}]^{2+}$  komplexe és a His-BIMA imidazolátohidas komplexe kiemelkedő SOD aktivitást mutat. Bár ezek az értékek még mindig jelentősen elmaradnak a natív enzim aktivitásától, a korábbi irodalmi adatokhoz képest ígéretesek. Így megállapíthatjuk, hogy ezek a ligandumok megfelelő kiindulópontot jelenthetnek olyan molekulák tervezésében, amelyek Cu(II)-komplexei a SOD enzim nagyon jó szerkezeti és funkcionális modelljei lehetnek.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkám során olyan hisztidintartalmú ligandumokat vizsgáltam, amelyek réz(II)komplexei az eukarióták sejtjeiben működő Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzim aktív centrumát modellezik. Ezen enzimben a Cu(II)-ion négy imidazolnitrogénhez, míg a cink(II)ion három imidazolnitrogénhez és egy aszparaginsav karboxilátcsoportjához kapcsolódik. A vizsgált hisztidintartalmú ligandumok az imidazolnitrogén donoratomokon keresztül kötődnek a fémionhoz makrokelátokat képezve. A tanulmányozott ligandumok másik csoportját a kelátképző helyzetben két imidazolnitrogént tartalmazó bisz(imidazol-2-il) származékok képezték.

Célunk volt *a kutatócsoportunkban korábban előállított lehetséges Cu,Zn-SOD modellvegyületek további jellemzése és a vizsgálatok kiegészítése a Cu(II)-komplexelek redoxipotenciál és SOD-aktivitás értékeinek meghatározásával.*

Munkánk során a ligandumok protonálódási állandóit és a különböző sztöchiometriájú fémkomplexelek stabilitási állandóit pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg. A kialakuló komplexek szerkezetének igazolására UV-Vis, CD és  $^1\text{H}$  NMR spektroszkópiát alkalmaztunk. A redoxipotenciál értékek meghatározását ciklikus voltammetriával végeztük el, a szuperoxid-diszmutáz aktivitás mérése indirekt módszerrel, spektrofotométerrel történt. Eredményeinket az egyes kísérleti technikák szerint csoportosítva foglalom össze.

### 1. Oldategyensúlyi vizsgálatok

**A)** Két, egy- illetve két hisztidint tartalmazó peptid (Ac-TKHM-NH<sub>2</sub>, Ac-HGGH-NH<sub>2</sub>) sav-bázis sajátosságait jellemeztük pH-metriás módszer segítségével, komplexképző sajátosságukat réz(II)ionok jelenlétében vizsgáltuk.

- Az egy hisztidint tartalmazó tetrapeptid (Ac-TKHM-NH<sub>2</sub>) esetében megállapítottuk, hogy a hisztidin oldallánc imidazolnitrogénje a fő fémion-kötőhely. Ez a kötésmód lehetővé teszi a hisztidint megelőző két amidnitrogén deprotonálódását és koordinációját, és az [N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] koordinációval kialakuló részecske az uralkodó az 5,5-7,0-es pH-tartományban. Ezen részecske szabad koordinációs helyeinek köszönhetően a gyengén koordinálódó -OH-csoportot tartalmazó oldallánc is fémion-megkötőként lép fel.

- A két hisztidint tartalmazó Ac-HGGH-NH<sub>2</sub> peptid réz(II)ionok jelenlétében hasonlóan viselkedik, mint ahogy azt egyéb, több hisztidint tartalmazó védett peptidnél megfigyelték. A fiziológiás pH-tartományban az imidazolnitrogének

koordinációjával  $[\text{CuL}]^{2+}$  komplex képződik, valamint a peptid kis méretének köszönhetően jelentős mennyiségű  $[\text{CuL}_2]^{2+}$  biszkomplex alakul ki.

- Azt tapasztaltuk, hogy a két imidazolnitrogén koordinációja nem tudja megakadályozni az amidnitrogének deprotonálódását, amely nagyobb pH-n egy kooperatív folyamat során megy végbe. A kialakuló  $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  koordinációban az N-terminális hisztidin nem vesz részt. A harmadik amidnitrogén deprotonálódásával  $[\text{CuLH}_3]^-$  komplex képződik, melyben a deprotonálódást leíró kisebb pK-értékre egy lehetséges magyarázat az N-terminális hisztidin imidazolnitrogénjének gyenge axiális kölcsönhatása.

**B)** Néhány két- vagy három hisztidint tartalmazó peptid (Ac-HGH-NHMe, Ac-HGGH-NH<sub>2</sub>, Ac-HHGH-NH<sub>2</sub>, Ac-HAHVH-NH<sub>2</sub>, Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub>, Ac-HVHGH-NH<sub>2</sub>) esetében a nikkell(II)- és kobalt(II)komplexek vizsgálatát is elvégeztük.

- Valamennyi ligandum esetében azt találtuk, hogy a két-, három- illetve négy imidazolnitrogén koordinációjával kialakuló ML komplexek a domináns részecskék a fiziológiás pH-tartományban. Megállapítottuk, hogy alapvetően három tényező befolyásolja ezen komplexek stabilitását:

- a) Az aminosav-láncban helyet foglaló hisztidinek száma: minél nagyobb a koordinálódott imidazolnitrogének száma, annál nagyobb stabilitású komplexek keletkeznek.
- b) A hisztidinek egymáshoz viszonyított helyzete: megfigyeltük, hogy a legstabilisabb komplexek akkor keletkeznek, amikor a HXH szekvenciát tartalmazza az aminosav-lánc.
- c) A fémion minősége: a vizsgált nikkell(II)komplexek stabilitása nagyobb, mint a kobalt(II)komplexeké, amely eredmény összhangban van az Irving-Williams sorral.

- A nikkell(II)ionokat tartalmazó rendszerekben a pH emelésével a két amidnitrogén deprotonálódása figyelhető meg, amely kooperatív módon megy végbe. A HXH szekvenciát tartalmazó peptidek esetében a kialakuló  $[\text{NiLH}_2]$  részecskében  $[\text{N}(\text{Im}), \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  koordináció valósul meg. Nagy pH-n lejátszódik a harmadik amidnitrogén deprotonálódása is  $[\text{NiLH}_3]^-$  komplex képződését eredményezve  $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  koordinációval. Amennyiben a hisztidinek távolabb (HXXH szekvencia) helyezkednek el egymástól, a három amidnitrogén egy lépésben történő deprotonálódása figyelhető meg.

- A három hisztidint tartalmazó pentapeptidek esetében izomer szerkezetek kialakulására is van lehetőség. A CD és a <sup>1</sup>H NMR vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy bár a fémion általában inkább a C-terminális részen kötődik, a másik izomer is megjelenik minden esetben. A <sup>1</sup>H NMR vizsgálatok segítségével az Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub> ligandum esetében a  $[\text{NiLH}_3]^-$  komplex két

izomerjének arányát is megbecsültük, amely a C-terminális és az N-terminális részen kötődő fémiont tartalmazó komplexek esetében 83% és 17%-nak adódott.

- A peptidok nikkell(II)komplexeinek vizsgálata során rögzített UV-látható spektrofotometriás és CD spektroszkópiás adatokból megállapítottuk, hogy ha a ligandum C-terminális részének szekvenciája GXH, akkor mind a  $[\text{NiLH}_2]$  mind a  $[\text{NiLH}_3]^-$  komplex esetében a CD spektrumban ellentétes Cotton-effektus jelenik meg.

- A pentapeptidok fémionfelesleget tartalmazó oldataiban  $[\text{Ni}_2\text{LH}_2]^{2+}$ ,  $[\text{Ni}_2\text{LH}_4]$  és  $[\text{Ni}_2\text{LH}_5]^-$  összetételű komplexek keletkeznek. Ezekben a komplexekben a fémionok a hisztidin imidazolnitrogénjéhez és az amidnitrogénekhez koordinálódnak.

- Kobalt(II)ion jelenlétében a kialakuló ML komplexek nem elég stabilisak ahhoz, hogy megakadályozzák a fémion hidrolízisét, így a lúgos pH-tartományban a fémion hidrolízise és csapadékképződés volt megfigyelhető.

## **2. Ciklikus voltammetriás vizsgálatok**

Az egyensúlyi vizsgálatok alapján három ligandumtípus – egyszerű hisztidinszármazékok, multihisztidin peptidok és bisz(imidazol-2-il) származékok – imidazolnitrogénes koordinációt tartalmazó Cu(II)-komplexeit tanulmányoztuk vizes oldatban ciklikus voltammetria segítségével.

- Vizsgálatainkhoz kifejlesztettünk egy mikrocellát, amelyben igen kis mintamennyiség alkalmazásával is végre tudtuk hajtani méréseinket. Megállapítottuk, hogy legalább öt- vagy tízszeres ligandumfelesleg mellett tudunk értékelhető voltammogramokat rögzíteni. Megfigyeltük, hogy a redoxi folyamatok során kvázireverzibilis, egyelektronos folyamatok játszódnak le.

- Szisztematikus kísérletsorozatunkban először a Cu(II)-hisztidin rendszert, illetve a különböző egyszerű hisztidinszármazékok (N-Ac-hisztidin, N-Ac-hisztamin) Cu(II)-komplexeit vizsgáltuk. Összehasonlításképpen néhány egyszerű aminosav Cu(II)-komplexének redoxipotenciál értékét is meghatároztuk. Összevetve a különböző aminosavak Cu(II)-komplexeinek redoxipotenciál értékeit azt állapítottuk meg, hogy az oldallánc mérete a meghatározó, nagyobb méretű oldallánc csökkenti a redoxipotenciál értéket.

- A multihisztidin peptidok  $[\text{CuL}]^{2+}$  és  $[\text{CuL}_2]^{2+}$  komplexeire meghatározott formálpotenciál értékek alapján megállapítottuk, hogy a komplexek redukálhatósága az alábbi tényezőktől függ:

- a) A hisztidin aminosavak száma a peptidláncban: megfigyelhető, hogy a redoxipotenciál értéke csökken a koordinált imidazolnitrogének számának növekedése függvényében.

b) A hisztidinek elhelyezkedése a peptidláncban: a hisztidinek távolságának növekedése növeli a redukálhatóságot.

c) A komplex stabilitása: minél stabilisabbak a komplexek, annál nehezebb redukálni a fémcentrumot.

- A bisz(imidazol-2-il) származékok 4 imidazolnitrogén koordinációjú  $[\text{CuL}_2]$  és  $[\text{CuL}_2\text{H}_2]$  komplexeire jellemző redoxipotenciál értékeket is meghatároztuk. A kapott formálpotenciál értékek valamennyi esetben  $\sim 0$  V-nak adódtak. Megfigyeltük, hogy a koordinálódó molekula mérete nem befolyásolja jelentősen a redoxipotenciál értékét.

Valamennyi meghatározott redoxipotenciál érték a  $-0,16 - +0,89$  V tartományba esik, így ezen komplexek képesek lehetnek a szuperoxid-gyökönion elbontására. Az adatok alapján megállapíthatjuk, hogy redoxi szempontból a hisztidintartalmú peptidek makrokelát típusú koordinációt tartalmazó Cu(II)-komplexei jobb SOD-modellek, mint a kelát típusú koordinációt tartalmazó bisz(imidazol-2-il) származékok Cu(II)-komplexei.

### 3. Szuperoxid-diszmutáz aktivitás vizsgálatok

Elektrokémiai vizsgálatainkat követően a redoxi szempontból ígéretesnek tűnő imidazolnitrogénes koordinációt tartalmazó Cu(II)-komplexek szuperoxid-diszmutáz aktivitását mértük meg. Kiegészítettük a tanulmányozott komplexek körét a Cu(II)-His-BIMA rendszerben képződő imidazolátohidas komplex vizsgálatával is.

- A vizsgálati módszer paramétereinek beállítása során a vizsgálati körülmények között ( $\text{pH} = 6,8; 7,4$ ; nagy ( $c = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ )  $\text{HPO}_4^{2-}$  és  $\sim 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$   $\text{Cu}^{2+}$ -ion koncentráció) kialakuló részecskeeloszlást vettük figyelembe. A különböző pH-értékeken végzett saját méréseink egymással és az irodalmi adatokkal való összevetése csak akkor volt lehetséges, ha az adott körülmények között, a natív enzim SOD-aktivitásának ismeretében, az ún. relatív aktivitás értéket határoztuk meg.

- A kiszámított relatív aktivitás adatok alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált komplexek között két esetben figyelhető meg jelentősebb mértékű aktivitásnövekedés:

- a négy imidazolkoordinációjú, HXH szekvenciát tartalmazó multihisztidin peptid  $[\text{CuL}]^{2+}$  komplexénél,
- a Cu(II)-His-BIMA rendszerben képződő, hárommagvú imidazolátohidas  $[\text{Cu}_3\text{L}_2\text{H}_4]^{2+}$  komplexnél.

Vizsgálatainkat összegezve megállapíthatjuk, hogy ezek a ligandumok megfelelő kiindulópontot jelenthetnek olyan molekulák tervezésében, amelyek Cu(II)-komplexei a SOD enzim nagyon jó szerkezeti és funkcionális modelljei lehetnek.

## 6. SUMMARY

During my Ph.D. work I studied such histidine containing ligands the Cu(II) complexes of which mimic the active site of Cu,Zn superoxide dismutase enzyme. Within this enzyme the Cu(II) ion is bound through four imidazole nitrogens while the zinc(II) ion is coordinated through three imidazole nitrogens and the carboxylate group of an aspartic acid. The studied peptides coordinate to the metal ion through the imidazole nitrogen atoms forming a macrochelate. The other group of the studied ligands includes derivatives of bis(imidazol-2-yl)methane that contain two imidazole nitrogen atoms in chelatable position.

*Our aim was the further characterization of model compounds that were previously synthesized in our research group for mimicking the Cu,Zn-SOD enzyme. In the second phase of our work we determined the redox parameters and the SOD activity of those Cu(II) complexes in which the metal ion is bound to the peptide through side-chain imidazole nitrogens.*

Protonation constants of the ligands and the stability constants of the various copper(II), nickel(II) and cobalt(II) complexes were determined by potentiometric titration. The structures of the complexes were confirmed by UV-Vis, CD and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. The redox potential values of the copper(II) complexes were determined by cyclic voltammetry, the superoxide dismutase activity was measured spectrophotometrically by the indirect method of NBT reduction. Our results are summarized with respect to each experimental technique.

### 1. Solution equilibrium studies

**A)** We characterized the acid-base properties of two peptides containing one or two histidine residues (Ac-TKHM-NH<sub>2</sub>, Ac-HGGH-NH<sub>2</sub>) and their complex formation processes in the presence of copper(II) ions by pH-potentiometry.

- In the case of the one histidine containing peptide (Ac-TKHM-NH<sub>2</sub>) it was stated that the major binding site is the imidazole nitrogen in the histidyl residue. This binding mode makes possible the deprotonation and coordination of the two amide nitrogens preceding the histidine and the dominant complex in the 5.5-7.0 pH-range is the species with [N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] coordination. Due to the free coordination sites of this species the weakly coordinating side chain takes part in the metal binding as well.

- It was stated that the two histidine containing tetrapeptide, Ac-HGGH-NH<sub>2</sub> behaves similarly to other protected peptides containing several histidyl residues in the presence of copper(II) ions. With the coordination of imidazole nitrogens [CuL]<sup>2+</sup> complex is formed in the physiological pH range and the

amount of the  $[\text{CuL}_2]^{2+}$  complex is significant, which can be explained by the size of peptide.

- The coordination of the two imidazole nitrogens cannot prevent the deprotonation of peptide nitrogens. At higher pH values the deprotonation of the two amide nitrogens takes place in a cooperative process that is accompanied by a significant shift in the UV-Vis spectra to the lower wavelength values and an increase in the intensity of absorption maxima. The N-terminal histidyl residue does not take part in the coordination with  $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  donor atoms. The deprotonation of the third amide nitrogen results in the formation of  $[\text{CuLH}_3]^-$  complex. The pK value characterizing this process is smaller than the corresponding pK value for the peptides with the HXH sequence. It can be explained by the weak axial coordination of the imidazole nitrogen of the N-terminal histidine.

**B)** In the case of some two or three histidine containing peptides (Ac-HGH-NHMe, Ac-HGGH-NH<sub>2</sub>, Ac-HHGH-NH<sub>2</sub>, Ac-HAHVH-NH<sub>2</sub>, Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub>, Ac-HVHGH-NH<sub>2</sub>) we studied the nickel(II) and cobalt(II) complexes.

- In all cases ML complexes – formed with the coordination of two, three or four imidazole nitrogens – are the main species in the physiological pH range. The results reveal that three factors affect the stability of the complexes:

- a) the number of histidyl residues in the amino acid sequence: the increasing number of histidyl residues is accompanied with the increase of the thermodynamic stability of complexes.
- b) the positions of histidyl residues in the peptide chain: the highest stability constants were obtained when the histidyl residues are separated only by one amino acid moiety (e.g.: HXH sequence).
- c) the quality of the metal ion: the studied nickel(II) complexes have higher stability than the cobalt(II) complexes; this result is in agreement with the Irving-Williams series.

- In the nickel(II) ion containing systems the deprotonation of two amide nitrogens takes place in a cooperative process by increasing the pH. In the case of the peptides containing the HXH sequence, the coordination of the  $[\text{N}(\text{Im}), \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  donor set can be supposed for the  $[\text{NiLH}_2]$  complex. At even higher pH values a new amide deprotonation process occurs leading to the formation  $[\text{NiLH}_3]^-$  complex with  $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})]$  coordination. If the histidyl residues are separated by two non-coordinating amino acids (HXXH sequence), the deprotonation of the three amide nitrogens takes place in a one-step process.

- In the case of the pentapeptides containing three histidyl residues isomeric structures of  $[\text{NiLH}_2]$  and  $[\text{NiLH}_3]^-$  complexes can be formed. The isomeric

complexes binding metal ion on the C-termini are preferred in all cases, but the presence of other isomers is unambiguously proved by CD and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopic techniques. The  $^1\text{H}$  NMR measurements made it possible to estimate the ratio of isomeric structures of  $[\text{NiLH}_3]^-$  complex of Ac-HGHVH-NH<sub>2</sub> peptide: C-terminal coordinated complex : N-terminal coordinated complex = 83% : 17%.

- UV-Vis and CD spectra were registered for the nickel(II) complexes of the peptides. It was possible to calculate the individual spectra of  $[\text{NiLH}_2]$  and  $[\text{NiLH}_3]^-$  complexes. We observed that both for  $[\text{NiLH}_2]$  and  $[\text{NiLH}_3]^-$  complexes the CD extrema are the mirror images of the previously obtained values if the amino acid sequence at the C-terminus of the peptide is GXH.

- Due to their structure, the pentapeptides are able to bind more than one nickel(II) ion. In the presence of excess metal ion,  $[\text{Ni}_2\text{LH}_2]^{2+}$ ,  $[\text{Ni}_2\text{LH}_4]$  and  $[\text{Ni}_2\text{LH}_5]^-$  complexes are formed in the systems. In these complexes the metal ions are bound by the imidazole nitrogens of histidyl residues and amide nitrogens.

- In the case of cobalt(II) containing systems the overall thermodynamic stabilities of the ML complexes are not high enough to prevent the hydrolysis of the metal. Thus in the basic pH range the hydrolysis of the metal ion and precipitation were observed.

## **2. Cyclic voltammetric measurements**

Based on the equilibrium measurements we studied the imidazole nitrogen coordinated Cu(II) complexes of three types of ligands - simple histidine derivatives, multihistidine peptides and bis(imidazol-2-yl) derivatives - by means of cyclic voltammetry in aqueous media.

- For the measurements we developed a microcell, in which the measurements even with using very small amounts of substances could be performed. The voltammograms could only be registered if at least a five- or tenfold ligand excess was applied. We observed that for all studied Cu(II) complexes the characteristic redox reactions are quasi-reversible one electron reduction processes.

- In our systematic test series we studied the Cu(II)-histidine system and the Cu(II) complexes of various simple histidine derivatives (N-Ac-histidine, N-Ac-histamine). For comparison we determined the redox potential values of the Cu(II) complexes of some simple amino acids. On comparing the redox potential values of the Cu(II) complexes of various amino acids it can be said that the size of the side chain is the dominant factor: the greater the size of the side chain is, the smaller redox potential value can be measured.



- Based on the redox potential values of the  $[\text{CuL}]^{2+}$  and  $[\text{CuL}_2]^{2+}$  complexes of multihistidine peptides, three major factors can be listed that influence the reducibility of the complexes:

- a) the number of the histidine amino acids in the molecule: the reduction potential of the complexes decreases with the increase in the number of coordinated imidazole nitrogen atoms.
- b) the positions of histidyl residues in the peptide chain: the increase of distance between the histidyl residues results in the increase of the reducibility.
- c) the stability of the complexes: the greater the stability of the complex is, the more difficult it is to reduce the metal centre.

- In the case of the various bis(imidazol-2-yl) derivatives the four imidazole nitrogen coordinated  $[\text{CuL}_2]$  and  $[\text{CuL}_2\text{H}_2]$  complexes were studied electrochemically under the applied conditions. The obtained redox potential values are around 0 V. It was observed that the size of the coordinated molecule does not influence significantly the reducibility of the complex.

All the determined redox potential values fall into the  $-0.16 - +0.89$  V redox potential range so these complexes can be capable of decomposing the superoxide anion. Based on these data it can be stated that the Cu(II) complexes of the histidine containing peptides with macrochelate-type coordination are better SOD-models than the Cu(II) complexes of bis(imidazol-2-yl) derivatives with chelate-type coordination.

### 3. Superoxide dismutase assay

As a continuation of our electrochemical experiments, we measured the SOD activity of the complexes that seemed to be promising SOD models from a redox point of view. Those Cu(II) complexes of bis(imidazol-2-yl) derivatives and multihistidine peptides were investigated in which the metal ion is coordinated through imidazole nitrogen atoms. The SOD activity assay was also completed with the study of the imidazolato bridged complex that is formed in the Cu(II)-His-BIMA system.

- On adjusting the parameters of the SOD activity assay we took into account the concentration distribution curves under these experimental conditions ( $\text{pH} = 6.8; 7.4$ ; great ( $c = 5 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ )  $\text{HPO}_4^{2-}$  and small  $\sim 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$   $\text{Cu}^{2+}$ -ion concentration). The comparison of our data (measured at different pH values) with the published data was only possible if we calculated the so-called relative activity value under the given conditions. The calculation of the relative activity is only possible if the activity of the native enzyme is known under the same conditions.

- Based on the SOD activity data it can be stated that two of the studied Cu(II) complexes exhibit significant SOD activity:

- the four imidazole nitrogen coordinated  $[\text{CuL}]^{2+}$  complex of the multihistidine peptide containing the HXH sequence and
- the imidazolato bridged  $[\text{Cu}_3\text{L}_2\text{H}_4]^{2+}$  complex that is formed in the Cu(II)-His-BIMA system.

Summarizing our results we can say that these ligands are good starting points for the planning of such molecules the Cu(II) complexes of which can be good structural and functional models of the SOD enzyme.

## 7. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- <sup>1</sup> T. Kiss, T. Gajda, B. Gyurcsik, *Bevezetés a bioszervetlen kémiába*, Budapest, Nemzeti Tankönyvkiadó (2007)
- <sup>2</sup> A. Volbeda, J.-C. Fontecilla-Camps, „Structure-function relationships of nickel-iron sites in hydrogenase and a comparison with the active sites of other nickel-iron enzymes”, *Coord. Chem. Rev.*, **249**, 1609-1619. (2005)
- <sup>3</sup> U. Ermler, „On the mechanism of methyl-coenzyme M reductase”, *Dalton Trans.*, 3451-3458. (2005)
- <sup>4</sup> C.L. Drennan, J. Heo, M.D. Sintchak, E. Schreiter, P. W. Ludden, „Life on carbon monoxide: X-ray structure of *Rhodospirillum rubrum* Ni-Fe-S carbon monoxide dehydrogenase”, *PNAS*, **98(21)**, 11973-11978. (2001)
- <sup>5</sup> J. Wuerges, J.-W. Lee, Y.-I. Yim, H.-S. Yim, S.-O. Kang, K. D. Carugo, „Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site”, *PNAS*, **101(23)**, 8569-8574. (2004)
- <sup>6</sup> D.P. Barondeau, C.J. Kassmann, C.K. Bruns, J.A. Tainer, E.D. Getzoff, „Nickel Superoxide Dismutase Structure and Mechanism”, *Biochem.*, **43**, 8038-8047. (2004)
- <sup>7</sup> L. R. Milgrom, „Vitamin-B-12 – The view from the summit”, *Chem. In Brit.*, **30(11)**, 923-927. (1994)
- <sup>8</sup> I. Bertini, C. Luchinat és A. Scozzafava, *Struct. Bonding* (eds.: M.J. Clarke, P. Hemmerich, C.K. Jorgenson, D. Reinen and R.J.P. Williams), Springer-Verlag, New York, **48**, 45 (1982)
- <sup>9</sup> F.A. Quichio, W.N. Lipscomb, „Carboxypeptidase A: a protein and an enzyme” *Adv. Protein Chem.*, **25**, 1-78. (1971)
- <sup>10</sup> M.S. Lah, M.M. Dixon, K.A. Patridge, W.C. Stallings, J.A. Fee, M.L. Ludwig, „Structure-function in *Escherichia Coli* iron superoxide dismutase: comparisons with the manganese enzyme from *Thermus Thermophilus*”, *Biochemistry*, **34 (5)**, 1646-1660. (1995)
- <sup>11</sup> R.A. Edwards, H.M. Baker, M.M. Whittaker, J.W. Whittaker, G.B. Jameson, E.N. Baker, „Crystal structure of *Eschericia Coli* manganese superoxide dismutase at 2.1Å resolution”, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **3**, 161-171. (1998)
- <sup>12</sup> M.L. Ludwig, A.L. Metzger, K.A. Patridge, W.C. Stallings, „Manganese superoxide-dismutase from *Thermus thermophilus*: A structural model refined at 1.8Å resolution”, *J. Mol. Biol.*, **219(2)**, 335-358. (1991)
- <sup>13</sup> L. Hayflick, *Az öregedés*, Budapest, Magyar Könyvklub (1995)
- <sup>14</sup> K. Brown, „A radical proposal”, *Scientific American Presents*, **11(2)**, 39-43. (2000)
- <sup>15</sup> J.A. Tainer, E.D. Getzoff, K.M. Beem, J.S. Richardson, D.C. Richardson, „Determination and analysis of the 2 Å-structure of copper, zinc superoxide dismutase”, *J. Mol. Biol.*, **160**, 181-217. (1982)
- <sup>16</sup> J.A. Tainer, E.D. Getzoff, J.S. Richardson, D.C. Richardson, „Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase”, *Nature*, **306**, 284-287. (1983)
- <sup>17</sup> L.M. Ellerby, D.E. Cabelli, J.A. Graden, J.S. Valentine, „Copper-zinc superoxide-dismutase: Why Not pH-Dependent?” *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6556-6561. (1996)
- <sup>18</sup> Q.-X. Li, Q.-H. Luo, Y.-Z. Li, M.-C. Shen, „A study on the mimics of Cu,Zn-superoxide dismutase with high activity and stability: two copper(II) complexes of 1,4,7-triazacyclononane with benzimidazole groups”, *Dalton. Trans.*, 2329-2335. (2004)
- <sup>19</sup> S. Kubota, J.-T. Yang, „Bis[Cyclo(Histidylhistidine)]copper(II) complex that mimics the active -center of superoxide-dismutase has its catalytic activity”, *PNAS USA*, **81**, 3283-3286. (1984)
- <sup>20</sup> R.P. Bonomo, E. Conte, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, R. Purrello, E. Rizzarelli, „Copper(II) complexes with cyclo(L-aspartyl-L-aspartyl) and cyclo(L-glutamyl-L-glutamyl) derivatives and their antioxidant properties”, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3093-3099. (1996)
- <sup>21</sup> J. Muller, K. Felix, C. Maichle, E. Lengfelder, J. Strahle, U. Weser, „Phenyl-substituted copper di-Schiff base, a potent Cu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub> superoxide dismutase mimic surviving competitive biochelation”, *Inorg. Chim. Acta*, **233**, 11-19. (1995)
- <sup>22</sup> Q.-H. Luo, Q. Lu, A.-B. Dai, L. Huang, „A study on the structure and properties of a new model compound of Cu(II)-Zn(II) superoxide dismutase”, *J. Inorg. Biochem.*, **51**, 655-662. (1993)
- <sup>23</sup> C.-M. Liu, R.-G. Xiong, X.-Z. You, Y.-J. Liu, K.-K. Cheung, „Crystal structure and some properties of a novel potent Cu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>SOD model Schiff base copper(II) complex {[Cu(bppn)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O}”, *Polyhedron*, **15**, 4565-4571. (1996)
- <sup>24</sup> C.-M. Liu, R.-G. Xiong, X.-Z. You, H.-K. Fun, K. Sivakumar, „A novel, more vivid Cu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>SOD model: crystal structure and some properties of the Schiff base copper(II) complex: [Cu(appn)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O,” *Polyhedron*, **16**, 119-123. (1997)

- <sup>25</sup> M.L. Pires dos Santos, A. Faljoni-Alário, A.S. Mangrich, A.M. da Costa Ferreira, „Antioxidant and pro-oxidant properties of some di-Schiff base copper(II) complexes”, *J. Inorg. Biochem.*, **71**, 71-78. (1998)
- <sup>26</sup> R.G. Bhirud, T.S. Srivastava, „Synthesis, characterization and superoxide dismutase activity of some ternary copper(II) dipeptide-2,2'-bipyridine, 1,10-phenanthroline and 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline complexes”, *Inorg. Chim. Acta*, **179**, 125-131. (1991)
- <sup>27</sup> J. Casanova, G. Alzuet, J. Bo O. Carugo, „Crystal structures and superoxide dismutase mimetic activity of [CuL<sub>2</sub>(Him)<sub>2</sub>]:MeOH and [CuL<sub>2</sub>(mim)<sub>2</sub>]:H<sub>2</sub>O [HL=4-amino-N-(thiazol-2-yl)benzenesulfonamide, Him = imidazole, mim = N-methylimidazole]”, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2239-2244. (1996)
- <sup>28</sup> H-L. Zhu, L-M. Zheng, D-G. Fu, X-Y. Huang, M-F. Wu, W-X. Tang, „The synthesis, structure and SOD-like behaviors of a  $\mu$ -imidazolato-dicopper(II) complex with a binucleating hexaazamacrocyclic”, *J. Inorg. Biochem.*, **70**, 211-218. (1998)
- <sup>29</sup> S. Li, D. Li, D. Yang, Y. Li, J. Huang, K. Yu, W. Tang, „A novel imidazolato-bridged heterodinuclear Cu(II)Zn(II) complex derived from a unique macrocyclic ligand with two hydroxyethyl pendants”, *Chem. Commun.*, 880-881. (2003)
- <sup>30</sup> D. Li, S. Li, D. Yang, J. Yu, J. Huang, Y. Li, W. Tang, „Syntheses, structures, and properties of imidazolato-bridged Cu(II)-Cu(II) and Cu(II)-Zn(II) dinuclear complexes of a single macrocyclic ligand with two hydroxyethyl pendants”, *Inorg. Chem.*, **42**, 6071-6080. (2003)
- <sup>31</sup> D. Yang, S. Li, D. Li, M. Cheng, J. Huang, W. Tang, „Synthesis, structure and properties of an imidazolato-bridged dicopper complex of a novel macrocyclic ligand with two alcohol-pendants as an active site model of Cu,Zn-SOD”, *Polyhedron*, **22**, 925-932. (2003)
- <sup>32</sup> R.N. Patel, N. Singh, K.K. Shukla, U.K. Chauhan, „Novel copper(II)-dien-imidazole/imidazolato-bridged copper(II) complexes, Crystal structure of [Cu(dien)(Him)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> and of [(dien)Cu( $\mu$ -im)Cu(dien)](ClO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, a homobinuclear model for the copper(II) site of the CuZn-superoxide dismutase”, *Spectrochim. Acta Part A*, **61**, 287-297. (2005)
- <sup>33</sup> K. Jitsukawa, M. Harata, H. Arai, H. Sakurai, H. Masuda, „SOD activities of the copper complexes of tripodal polypyridylamine ligands having a hydrogen bonding site”, *Inorg. Chim. Acta*, **324**, 108-116. (2001)
- <sup>34</sup> R.N. Patel, N. Singh, K.K. Shukla, V.L.N. Gundla, U.K. Chauhan, „Synthesis, structure and biomimetic properties of Cu(II)-Cu(II) and Cu(II)-Zn(II) binuclear complexes: possible models for the chemistry of Cu-Zn superoxide dismutase”, *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 651-663. (2005)
- <sup>35</sup> J. Labuda, L. Fenikova, Z. Durackova, „Cyclic voltammetry and bioassay of some superoxide dismutase mimetic copper complex compounds”, *Bioelectrochem Bioenerg.*, **44**, 31-35. (1997)
- <sup>36</sup> R.G. Bhirud, T.S. Srivastava, „Superoxide dismutase activity of Cu(II)<sub>2</sub>(aspirinate)<sub>4</sub> and its adducts with nitrogen and oxygen donors”, *Inorg. Chim. Acta*, **173**, 121-125. (1990)
- <sup>37</sup> A.L. Abuhijleh, C. Woods, „Synthesis, crystal structure and superoxide dismutase mimetic activity of hexakis (N-methylimidazole) copper(II) salicylate”, *Inorg. Chem. Comm.*, **5**, 269-273. (2002)
- <sup>38</sup> H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, „Specific structure-stability relations in metallopeptides”, *Coord. Chem. Rev.*, **184**, 319-346. (1999)
- <sup>39</sup> H. Sigel, R. B. Martin, „Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands”, *Chem. Rev.*, **82**(4), 385-426. (1982)
- <sup>40</sup> T. Kowalik-Jankowska, H. Kozłowski, E. Farkas, I. Sóvágó: *Metal Ions in Life Sciences* (ed.: A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel), (Nickel and its Surprising Impact in Nature), **2**, 63-107. (2007)
- <sup>41</sup> H. Kozłowski, T. Kowalik-Jankowska, M. Jezowska-Bojczuk, „Chemical and biological aspects of Cu<sup>2+</sup> interactions with peptides and aminoglycosides”, *Coord. Chem. Rev.*, **249**, 2323-2334. (2005)
- <sup>42</sup> I. Sóvágó, G. Petőcz, „Studies on transition metal complexes Part 13. Copper(II) and nickel(II) complexes of amino acids and peptides containing a thioether group”, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1717-1720. (1987)
- <sup>43</sup> R.P. Agarwal, D.D. Perrin, „Stability constants of complexes of copper(II) ions with some histidine peptides”, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 268-272. (1975)
- <sup>44</sup> N.I. Jakab, B. Gyuresik, T. Körtvélyesi, I. Vosekalna, J. Jensen, E. Larsen, „Design of histidine containing peptides for better understanding of their coordination mode toward copper(II) by CD spectroscopy”, *J. Inorg. Biochem.*, **101**, 1376-1385. (2007)
- <sup>45</sup> P. Daniele, O. Zerbinati, R. Aruga, G. Ostacoli, „Thermodynamic spectrophotometric study of copper(II) and cadmium(II) homo- and hetero-nuclear complexes with L-histidylglycine in an aqueous medium”, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1115-1120. (1988)
- <sup>46</sup> S. Bruni, F. Cariatì, P.G. Daniele, E. Prenesti, „Speciation and structure of copper(II) complexes with histidine-containing peptides in aqueous medium: a combined potentiometric and spectroscopic study”, *Spectrochim. Acta, Part A*, **56**, 815-827. (2000)

- <sup>47</sup> E. Farkas, I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely, „Studies on transition-metal-peptide complexes. Part 9. Copper(II) complexes of tripeptides containing histidine”, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 611-614. (1984)
- <sup>48</sup> Ch. Conato, R. Gavioli, R. Guerrini, H. Kozłowski, P. Mlynarz, C. Pasti, F. Pulidori, M. Remelli, „Copper complexes of glycyl-histidyl-lysine and two of its synthetic analogues: chemical behaviour and biological activity”, *Biochim. Biophys. Acta*, **1526**, 199-210. (2001)
- <sup>49</sup> T. Gajda, B. Henry, J.J. Delpuech, „Complexes of Copper(II) ion with histamine-containing dipeptides: formation constants and structure”, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1301-1306. (1993)
- <sup>50</sup> Zs. Árkosi, Z. Paksi, L. Korecz, T. Gajda, B. Henry, A. Rockenbauer, „Reinvestigation of the copper(II)-carcine equilibrium system: "two-dimensional" EPR simulation and NMR relaxation studies for determining the formation constants and coordination modes”, *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 1995-2005. (2004)
- <sup>51</sup> R.W. Hay, M.M. Hassan, C. You-Quan, „Kinetic and thermodynamic studies of the copper(II) and nickel(II) complexes of glycylglycyl-L-histidine”, *J. Inorg. Biochem.*, **52** 17-25. (1993)
- <sup>52</sup> T. Gajda, B. Henry, A. Aubry, J.-J. Delpuech, „Proton and metal ion interactions with glycylglycylhistamine, a serum albumin mimicking pseudopeptide”, *Inorg. Chem.*, **35**, 586-593. (1996)
- <sup>53</sup> S.J. Lau, T.P.A. Kruck, B. Sarkar, „A peptide molecule mimicking the copper(II) transport site of human serum albumin”, *J. Biol. Chem.*, **249**, 5878-5884. (1974)
- <sup>54</sup> N. Camerman, A. Camerman, B. Sarkan, „Molecular design to mimic copper(II) transport site of human-albumin. The crystal and molecular structure of copper(II) - glycylglycyl-L-histidine-N-methyl amide monoquo complex”, *Can. J. Chem.*, **54**, 1309-1316. (1976)
- <sup>55</sup> C. Conato, H. Kozłowski, P. Mlynarz, F. Pulidori, M. Remelli, „Copper and nickel complex-formation equilibria with Lys-Gly-His-Lys, a fragment of the matricellular protein SPARC”, *Polyhedron*, **21**, 1469-1474. (2002)
- <sup>56</sup> Y. Fang, B.D. Ray, C.A. Claussen, K.B. Lipkowitz, E.C. Long, „Ni(II)-Arg-Gly-His - DNA interactions: investigation into the basis for minor-groove binding and recognition”, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 5403-5412. (2004)
- <sup>57</sup> K. Várnagy, J. Szabó, I. Sóvágó, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, G. Micera, „Equilibrium and structural studies on copper(II) complexes of tetra-, penta- and hexa-peptides containing histidyl residues at the C-termini”, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 467-472. (2000)
- <sup>58</sup> W. Bal, H. Kozłowski, R. Robbins, L.D. Pettit, „Competition between the terminal amino and imidazole nitrogen donors for coordination to Ni(II) ions in oligopeptides”, *Inorg. Chim. Acta*, **231**, 7-12. (1995)
- <sup>59</sup> L.D. Pettit, S. Pyburn, W. Bal, H. Kozłowski, M. Bataille, „A study of the comparative donor properties to Cu(II) of the terminal amino and imidazole nitrogens in peptides”, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3565-3570. (1990)
- <sup>60</sup> G.F. Bryce, R.W. Roeske, F.R.N. Gurd, „Cupric ion complexes of histidine containing peptides”, *J. Biol. Chem.*, **240**, 3837-3846. (1965)
- <sup>61</sup> G.F. Bryce, R.W. Roeske, F.R.N. Gurd, „Optical rotatory dispersion and circular dichroism spectra of copper(II)- and nickel(II) peptide complexes”, *J. Biol. Chem.*, **241**, 1439-1448. (1966)
- <sup>62</sup> D. Sanna, Cs.G. Ágoston, I. Sóvágó, G. Micera, „Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) complexes formed by oligopeptides containing histidine with a protection at the terminal amino group”, *Polyhedron*, **20**, 937-947. (2001)
- <sup>63</sup> M. Orfei, M.C. Alcaro, G. Marcon, M. Chelli, M. Ginanneschi, H. Kozłowski, J. Brasun, L. Messori, „Modeling of copper(II) site in proteins based on histidyl and glycyl residues”, *J. Inorg. Biochem.*, **97**, 299-307. (2003)
- <sup>64</sup> P. Stanczak, M. Luczkowski, P. Juszczak, Z. Grzonka, H. Kozłowski, „Interactions of Cu<sup>2+</sup> ions with chicken prion tandem repeats”, *Dalton Trans.*, 2102-2107. (2004)
- <sup>65</sup> C.E. Livera, L.D. Pettit, M. Bataille, H. Kozłowski, B. Radomska, „A thermodynamic and spectroscopic study of the proton and copper(II) complexes of L-prolyl-L-histidine, D-prolyl-L-histidine, L-histidyl-L-histidine, and D-histidyl-L-histidine”, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 661-666. (1987)
- <sup>66</sup> A. Myari, G. Malandrinos, Y. Deligiannakis, J.C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, Z. Nagy, I. Sóvágó, „Interaction of Cu<sup>2+</sup> with His-Val-His and of Zn<sup>2+</sup> with His-Val-Gly-Asp, two peptides surrounding metal ions in Cu,Zn-superoxide dismutase enzyme”, *J. Inorg. Biochem.*, **85**, 253-261. (2001)
- <sup>67</sup> J. Ueda, N. Ikota, A. Hanaki, K. Koga, „Copper(II) complexes of L-histidylglycyl-L-histidylglycine and L-histidyl-L-histidylglycylglycine: Coordination mode of histidyl residues”, *Inorg. Chim. Acta*, **135**, 43-46. (1987)

- <sup>68</sup> R.P. Bonomo, F. Bonsignore, E. Conte, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, R. Purrello, E. Rizzarelli, „Thermodynamic and spectroscopic characterization and *in vitro* O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenger activity of copper(II) glycyl-L-histidyl-glycyl-L-histidine complexes”, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1295-1300. (1993)
- <sup>69</sup> R.P. Bonomo, L. Casella, L. De Gioia, H. Molinari, G. Impellizzeri, T. Jordan, G. Pappalardo, R. Purrello, E. Rizzarelli, „Metal ion and proton stabilisation of turn motif in the synthetic octapeptide histidyltris(glycylhistidyl) glycine”, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2387-2389. (1997)
- <sup>70</sup> A. Levitzki, I. Pecht, A. Berger, „Copper-poly-L-histidine complexes. II. Physicochemical properties”, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 6844-6849. (1972)
- <sup>71</sup> C.S. Burns, E. Aronoff-Spencer, C.M. Dunham, P. Lario, N.I. Avdievich, W.E. Antholine, M.M. Olmstead, A. Vrielink, G.J. Gerfen, J. Peisach, W.G. Scott, G.L. Millhauser, „Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein”, *Biochemistry*, **41**, 3991-4001. (2002)
- <sup>72</sup> M. Luczkowski, H. Kozłowski, M. Stawikowski, K. Rolka, E. Gaggelli, D. Valensin, G. Valensin, „Is the monomeric prion octapeptide repeat PHGGGWGQ a specific ligand for Cu<sup>2+</sup> ions?”, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2269-2274. (2002)
- <sup>73</sup> M. Luczkowski, H. Kozłowski, A. Legowska, K. Rolka, M. Remelli, „The possible role of Gly residues in the prion octarepeat region in the coordination of Cu<sup>2+</sup> ions”, *Dalton Trans.*, 619-624. (2003)
- <sup>74</sup> C.S. Burns, E. Aronoff-Spencer, G. Legname, S.B. Prusiner, W.E. Antholine, G.J. Gerfen, J. Peisach, G.L. Millhauser, „Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein”, *Biochemistry*, **42**, 6794-6803. (2003)
- <sup>75</sup> G. Di Natale, C.A. Damante, Z. Nagy, K. Ósz, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, „Copper(II) binding to two novel histidine-containing model hexapeptides: Evidence for a metal driven turn conformation”, *J. Inorg. Biochem.*, **102**, 2012-2019. (2008)
- <sup>76</sup> I. N. Jakab, O. Lőrincz, A. Jancsó, T. Gajda, B. Gyurcsik, „Approaching the minimal metal ion binding peptide for structural and functional metalloenzyme mimicking”, *Dalton Trans.*, 6987-6995. (2008)
- <sup>77</sup> A. Jancsó, A. Kolozsi, B. Gyurcsik, N.V. Nagy, T. Gajda, „Probing the Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> binding affinity of histidine-rich glycoprotein”, *J. Inorg. Biochem.*, **103**, 1634-1643. (2009)
- <sup>78</sup> C. Kállay, Z. Nagy, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, I. Sóvágó, „Thermodynamic and structural characterization of the copper(II) complexes of peptides containing both histidyl and aspartyl residues”, *Bioinorg. Chem. and Appl.*, 1-9. (2007)
- <sup>79</sup> B. Bóka, A. Myari, I. Sóvágó, N. Hadjiliadis, „Copper(II) and zinc(II) complexes of the peptides Ac-HisValHis-NH<sub>2</sub> and Ac-HisValGlyAsp-NH<sub>2</sub> related to the active site of the enzyme CuZnSOD”, *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 113-122. (2004)
- <sup>80</sup> D. Sanna, G. Micera, Cs. Kállay, V. Rigó, I. Sóvágó, „Copper(II) complexes of N-terminal protected tri- and tetrapeptides containing histidine residues”, *Dalton Trans.*, 2702-2707. (2004)
- <sup>81</sup> S. Rajkovic, C. Kállay, R. Serényi, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, „Complex formation processes of terminally protected peptides containing two or three histidyl residues. Characterization of the mixed metal complexes of peptides”, *Dalton Trans.*, 5059-5071. (2008)
- <sup>82</sup> C. Kállay, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, „Copper(II) complexes of terminally protected pentapeptides containing three histidyl residues in alternating positions, Ac-His-Xaa-His-Yaa-His-NH<sub>2</sub>”, *Dalton Trans.*, 4545-4552. (2006)
- <sup>83</sup> C. Kállay, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, „Thermodynamic and structural characterization of the macrochelates formed in the reactions of copper(II) and zinc(II) ions with peptides of histidine”, *Inorg. Chim. Acta.*, **362**, 935-945. (2009)
- <sup>84</sup> K. Várnagy, I. Sóvágó, K. Ágoston, Z. Likó, H. Süli-Vargha, D. Sanna, G. Micera, „Potentiometric and spectroscopic studies on copper(II) and zinc(II) complexes of peptides containing bis(imidazolyl) ligands”, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2939-2945. (1994)
- <sup>85</sup> K. Várnagy, I. Sóvágó, W. Goll, H. Süli-Vargha, G. Micera, D. Sanna, „Potentiometric and spectroscopic studies of transition metal complexes of bis(imidazolyl) and bis(pyridyl) derivatives of amino acids”, *Inorg. Chim. Acta*, **283**, 233-242. (1998)
- <sup>86</sup> K. Várnagy, I. Sóvágó, H. Süli-Vargha, D. Sanna, G. Micera, „The effect of histidyl residues on the complexation of bis(imidazolyl) containing tripeptides with copper(II) ion”, *J. Inorg. Biochem.*, **81**, 35-41. (2000)
- <sup>87</sup> K. Ósz, K. Várnagy, I. Sóvágó, L. Lennert, H. Süli-Vargha, D. Sanna, G. Micera, „Equilibrium and structural studies on transition metal complexes of amino acid derivatives containing the bis(pyridin-2-yl)methyl residue”, *New J. Chem.*, **25**, 700-706. (2001)

- <sup>88</sup> I. Sóvágó, K. Várnagy, K. Ósz, „Metal complexes of peptides containing monodentate or chelating imidazole nitrogen donors: factors influencing the coordination of amide groups and imidazole side chains”, *Comments Inorg. Chem.*, **23**, 149-178. (2002)
- <sup>89</sup> K. Ósz, K. Várnagy, H. Süli-Vargha, D. Sanna, G. Micera, I. Sóvágó, „Copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of amino acids containing bis(imidazol-2-yl)methyl residues”, *Inorg. Chim. Acta*, **339**, 373-382. (2002)
- <sup>90</sup> K. Ósz, K. Várnagy, H. Süli-Vargha, D. Sanna, G. Micera, I. Sóvágó, „Transition metal complexes of bis(imidazol-2-yl) derivatives of dipeptides”, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2009-2016. (2003)
- <sup>91</sup> I. Sóvágó and A. Gergely, „Factors influencing the formation of mixed ligand complexes of nickel(II) and zinc(II)”, *Inorg. Chim. Acta*, **37**, 233-236. (1979)
- <sup>92</sup> A.J. Bard, R. Parsons, J. Jordan, *Standard potentials in aqueous solution*, Marcel Dekker Incl., New York (1985)
- <sup>93</sup> J.M. Fernández-G., F.A. López-Durán, S. Hernández-Ortega, V. Gómez-Vidales, N. Marcías-Ruvalcaba, M. Aguilar-Martínez, „The structures and cyclic voltammetry of three copper(II) complexes derived from bulky *ortho*-hydroxy Schiff bases”, *J. Mol. Struct.*, **612**, 69-79. (2002)
- <sup>94</sup> K. Miyoshi, H. Tanaka, E. Kimura, S. Tsuboyama, S. Murata, H. Shimizu, K. Ishizu, „Electrochemical and spectroscopic studies on copper(II) complexes of macrocyclic ligands as models for square-pyramidal metal active sites of copper(II) complexes of bleomycin and glutathione”, *Inorg. Chim. Acta*, **78**, 23-30. (1983)
- <sup>95</sup> P.V. Robandt, R.R. Schroeder, D.B. Rorabacher, „Cyclic voltammetric characterization of rate constants for conformational change in an electron-transfer square scheme involving a copper(II)/copper(I) macrocyclic tetrathiaether complex”, *Inorg. Chem.*, **32**, 3957-3963. (1993)
- <sup>96</sup> N.M. Villeneuve, R.R. Schroeder, L.A. Ochrymowycz, D.B. Rorabacher, „Cyclic voltammetric evaluation of rate constants for conformational transitions accompanying electron transfer. Effect of varying structural constraints in copper(II/I) complexes with dicyclohexanediyl-substituted macrocyclic tetrathiaethers”, *Inorg. Chem.*, **36**, 4475-4483. (1997)
- <sup>97</sup> G. Thomas, P.S. Zacharias, „Cyclic voltammetric studies of copper(II) dipeptide complexes. Evidence for copper(I) dipeptide complexes in aqueous media”, *Polyhedron*, **3**(7), 861-866. (1984)
- <sup>98</sup> R.P. Bonomo, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, R. Purrello, E. Rizzarelli, G. Tabbi, „Co-ordinating properties of cyclopeptides. Thermodynamic and spectroscopic study on the formation of copper(II) complexes with cyclo(Gly-His)<sub>4</sub> and cyclo(Gly-His-Gly)<sub>2</sub> and their superoxide dismutase-like activity”, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3851-3857. (1998)
- <sup>99</sup> B.R. James, R.J.P. Williams, „The oxidation-reduction potentials of some copper complexes”, *J. Chem. Soc.*, 2007-2019. (1961)
- <sup>100</sup> S. Daniele, M.J. Pena, „Cyclic voltammetric investigation of the Cu-histidine system at platinum conventional and microelectrodes”, *Electrochim. Acta*, **38**, 165-174. (1993)
- <sup>101</sup> M.F. Cabral, J. de O. Cabral, E. Bouwman, W.L. Driessen, J. Reedijk, U. Turpeinen, R. Hamalainen, „Cyclic voltammetric studies of copper(II) complexes with some bis(imidazole)bis(thioether) ligands. The X-ray crystal structure of (1,6-bis-(5(4)-imidazolyl)-2,5-dithiahexane)dichlorocopper(II)”, *Inorg. Chim. Acta*, **196**, 137-144. (1992)
- <sup>102</sup> C-C. Su, J.H. Chen, K-Y. Hwang, S-J. Liu, S-W. Wang, S-L. Wang, S-N. Liu, „Bonding properties of Cu(II)-imidazole chromophores: spectroscopic and electrochemical properties of monosubstituted imidazole copper(II) complexes. Molecular structure of [Cu(4-methylimidazole)<sub>4</sub>(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>]", *Inorg. Chim. Acta*, **196**, 231-240. (1992)
- <sup>103</sup> R. Bhalla, M. Helliwell, R. L. Beddoes, D. Collison, C.D. Garner, „A reversible Cu<sup>II</sup>/Cu<sup>I</sup> electron transfer centre based on a flexible di-imidazole ligand”, *Inorg. Chim. Acta*, **273**, 225-233. (1998)
- <sup>104</sup> K. Takehara, Y. Ide, „Electrochemistry of Cu(II)-peptide complexes containing histidine residues. II. Anomalous current fluctuation in the reduction process of Cu(II)-GGH”, *Inorg. Chim. Acta*, **186**, 73-78. (1991)
- <sup>105</sup> K. Takehara, Y. Ide, „Electrochemistry of copper(II)-peptide complexes containing histidine residues”, *Inorg. Chim. Acta*, **183**, 195-202. (1991)
- <sup>106</sup> F.N. Ertas, A.G. Fogg, J.C. Moreira, J. Barek, „Differential pulse cathodic stripping voltammetry of the copper complexes of glycyl-L-histidyl-glycine at a hanging mercury drop electrode”, *Talanta*, **40**(10), 1481-1488. (1993)
- <sup>107</sup> R.P. Bonomo, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, G. Tabbi, „Copper(II) binding modes in the prion octapeptide PHGGGWGQ: a spectroscopic and voltammetric study”, *Chem. Eur. J.*, **6**(22), 4195-4202. (2000)

- <sup>108</sup> R.P. Bonomo, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, G. Tabbí, L.I. Vagliasindi, „Study of nitric oxide interaction with mono- and dinuclear copper(II) complexes of prion protein bis-octarepeat fragments”, *Dalton Trans.*, 3805-3816. (2008)
- <sup>109</sup> R.P. Bonomo, G. Di Natale, E. Rizzarelli, G. Tabbí, L.I. Vagliasindi, „Copper(II) complexes of prion protein PEG<sub>11</sub>-tetraoctarepeat fragment: spectroscopic and voltammetric studies”, *Dalton Trans.*, 2637-2646. (2009)
- <sup>110</sup> C. Hureau, L. Charlet, P. Dorlet, F. Gonnet, L. Spadini, E. Anxolabéhère-Mallart, J.-J. Girerd, „A spectroscopic and voltammetric study of the pH-dependent Cu(II) coordination to the peptide GGGTH: relevance to the fifth Cu(II) site in the prion protein”, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **11**, 735-744. (2006)
- <sup>111</sup> H.A. Azab, L. Banci, M. Borsari, C. Luchinat, M. Sola, M.S. Viezzoli, „Redox chemistry of superoxide dismutase. Cyclic voltammetry of wild-type enzymes and mutants on functionally relevant residues”, *Inorg. Chem.*, **31**, 4649-4655. (1992)
- <sup>112</sup> S. Goldstein, C. Michel, W. Bors, M. Saran, G. Czapski, “A critical reevaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity”, *Free Radical Biology & Medicine*, **4**, 295-303. (1988)
- <sup>113</sup> J. Casanova, G. Alzuet, S. Ferrer, J. Latorre, J.A. Ramirez, J. Borrás, „Superoxide dismutase activity of ternary copper complexes of sulfathiazole and imidazole derivatives. Synthesis and properties of [CuL<sub>2</sub>(R-Him)<sub>2</sub>] [HL=4-amino-N-(thiazol-2-yl)benzenesulfonamide, R-Him=4-methylimidazole, 4,4-dimethylimidazoline or 1,2-dimethylimidazole]. Crystal structure of [CuL<sub>2</sub>(4,4-dimethylimidazoline)<sub>2</sub>]”, *Inorg. Chim. Acta*, **304**, 170-177. (2000)
- <sup>114</sup> E. Bienvenue, S. Choua, M.A. Lobo-Recio, C. Marzin, P. Pacheco, P. Seta, G. Tarrago, „Structure and superoxide dismutase activity of Ru(II), Cu(II), and Mn(II) macrocyclic complexes”, *J. Inorg. Biochem.*, **57**, 157-168. (1995)
- <sup>115</sup> I. Bertini, S. Mangani, M.S. Viezzoli, „Structure and properties of copper-zinc superoxide dismutases”, *Adv. Inorg. Chem.*, **45**, 127-250. (1998)
- <sup>116</sup> Z. Durackova, M.A. Mendiola, M.T. Sevilla, A. Valent, „Thiohydrazone copper(II) complexes. The relationship between redox properties and superoxide dismutase mimetic activity”, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **48**, 109-116. (1999)
- <sup>117</sup> R. Cao, N. Travieso, A. Frago, R. Villalonga, A. Diaz, M.E. Martinez, J. Alpizar, D.X. West, „Determination of SOD-like activity of copper(II) complexes with  $\alpha$ -amino acid dithiocarbamates”, *J. Inorg. Biochem.*, **66**(4), 213-217. (1997)
- <sup>118</sup> L.L. Costanzo, G. De Guidi, S. Giuffrida, E. Rizzarelli, G. Vecchio, „Determination of superoxide dismutase-like activity of copper(II) complexes. Relevance of the speciation for the correct interpretation of In Vitro O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenger activity”, *J. Inorg. Biochem.*, **50**, 273-281. (1993)
- <sup>119</sup> R.P. Bonomo, V. Bruno, E. Conte, G. De Guidi, D. La Mendola, G. Maccarrone, F. Nicoletti, E. Rizzarelli, S. Sortino, G. Vecchio, „Potentiometric, spectroscopic and antioxidant activity studies of SOD mimics containing carnosine”, *Dalton Trans.*, 4406-4415. (2003)
- <sup>120</sup> G. Condorelli, L.L. Costanzo, G. De Guidi, S. Giuffrida, E. Rizzarelli, G. Vecchio, „Inhibition of photochemolysis by copper(II) complexes with SOD-like activity”, *J. Inorg. Biochem.*, **54**, 257-265. (1994)
- <sup>121</sup> D-X. Yang, S-A. Li, D-F. Li, M. Chen, J. Huang, W-X. Tang, „Synthesis, structure and properties of an imidazolato-bridged dicopper complex of a novel macrocycle with two alcohol-pendants as an active site model of Cu<sub>2</sub>Zn-SOD”, *Polyhedron*, **22**, 925-932. (2003)
- <sup>122</sup> R.N. Patel, S. Kumar, K.B. Pandeya, „E.s.r. visible and SOD studies of imidazolato bridged Cu<sub>2</sub><sup>II,II</sup>, Cu<sup>II</sup>Zn<sup>II</sup> and Cu<sup>II</sup>Ni<sup>II</sup> complexes with pentamethyldiethylenetriamine as capping ligand: a plausible model for superoxide dismutase”, **89**, 61-68. (2002)
- <sup>123</sup> I. Szilágyi, I. Labádi, K. Hernádi, I. Pálkó, N.V. Nagy, L. Korecz, A. Rockenbauer, Z. Kele, T. Kiss, „Speciation study of an imidazolato-bridged copper(II)-zinc(II) complex in aqueous solution”, *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 1619-1629. (2005)
- <sup>124</sup> R. Pogni, M.C. Baratto, E. Busi, R. Basosi, „EPR and O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenger activity: Cu(II)-peptide complexes as superoxide dismutase models”, *J. Inorg. Biochem.*, **73**, 157-165. (1999)
- <sup>125</sup> M. Casolaro, M. Chelli, M. Ginanneschi, F. Laschi, L. Messori, M. Muniz-Miranda, A. M. Papini, T. Kowalik-Jankowska and H. Kozłowski, „Spectroscopic and potentiometric study of the SOD mimic system copper(II)/acetyl-l-histidylglycyl-l-histidylglycine”, *J. Inorg. Biochem.*, **89**, 181-190. (2002)
- <sup>126</sup> A. Jancsó, Z. Paks, N. Jakab, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, T. Gajda, „Solution chemical properties and catecholase-like activity of the copper(II)-Ac-His-His-Gly-His-OH system, a relevant functional model for copper containing oxidases”, *Dalton Trans.*, 3187-3194. (2005)



- <sup>127</sup> N.I. Jakab, A. Jancsó, T. Gajda, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, „Copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of *N*-acetyl-His-Pro-His-His-NH<sub>2</sub>: Equilibria, solution structure and enzyme mimicking”, *J. Inorg. Biochem.*, **102**, 1438-1448. (2008)
- <sup>128</sup> P. Stanczak, H. Kozłowski, „Can chicken and human PrPs possess SOD-like activity after  $\beta$ -cleavage?”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **352**, 198-202. (2007)
- <sup>129</sup> R.B. Merrifield, „Solid Phase Peptide Synthesis I. The Synthesis of a Tetrapeptide”, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2154. (1963)
- <sup>130</sup> P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, „SUPERQUAD: an improved general program for computation of formation constants from potentiometric data”, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **6**, 1195-1200. (1985)
- <sup>131</sup> L. Zékány, I. Nagypál, „Computational Methods for the Determination of Formation Constants”, *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, ed.: D.J. Legget, Plenum Press, New York, 291-299. (1985)
- <sup>132</sup> H.M. Irving, M.G. Miles, L.D. Pettit, „A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titration using a glass electrode”, *Anal. Chim. Acta*, **38**, 475-488. (1967)
- <sup>133</sup> G. Eriksson, „An algorithm for the computation of aqueous multicomponent, multiphase equilibria”, *Anal. Chim. Acta*, **112**, 375-383. (1979)
- <sup>134</sup> Gran, G., „Determination of the equivalent point in potentiometric titrations”, *Acta Chem. Scand.*, **4**, 559-577. (1950)
- <sup>135</sup> L.D. Pettit, J.E. Gregor, H. Kozłowski, *Perspectives on Bioinorganic Chemistry* (eds.: R.W. Hay, J.R. Dilworth and K.B. Nolan), JAI Press, London, **1** (1991)
- <sup>136</sup> E. Billo, „Copper(II) chromosomes and the rule of average environment”, *J. Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **10**, 613-617. (1974)
- <sup>137</sup> H. Kozłowski, G. Micera, *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids*, ed.: Berthon, G., Marcel Dekker Inc., New York, **Vol. 1**, 566-582. (1995)
- <sup>138</sup> E.W. Wilson Jr., R.B. Martin, „Circular Dichroism of Palladium(II) Complexes of Amino Acids and Peptides”, *Inorg. Chem.*, **9**, 528-532. (1970)
- <sup>139</sup> J.M. Tsangaris, R.B. Martin, „Visible Circular Dichroism of Copper(II) Complexes of Amino Acids and Peptides”, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4255-4260. (1970)
- <sup>140</sup> J.W. Chang, R.B. Martin, „Visible circular dichroism spectra of Planar Nickel Ion, Complexes of Peptides and Cysteine and Derivatives”, *J. Phys. Chem.*, **73**, 4277-4283. (1969)
- <sup>141</sup> K. Ósz, G. Lente, Cs. Kállay, „New protonation microequilibrium treatment in the case of some amino acid and peptide derivatives containing a bis(imidazolyl)methyl group”, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 1039-1047. (2005)
- <sup>142</sup> G. A. Mabott, „An Introduction to Cyclic Voltammetry”, *J. Chem. Edu.*, **60(9)**, 697-702. (1983)
- <sup>143</sup> P. T. Kissinger, W. R. Heineman, „Cyclic Voltammetry”, *J. Chem. Edu.*, **60(9)**, 702-706. (1983)
- <sup>144</sup> D. H. Evans, K. M. O'Connell, R. A. Petersen, M. J. Kelly, „Cyclic Voltammetry”, *J. Chem. Edu.*, **60(4)**, 290-293. (1983)
- <sup>145</sup> I. Puigdomenech, Hydra/Medusa Chemical Equilibrium Database and Plotting Software, KTH Royal Institute of Technology, freely downloadable software at [<http://www.kemi.kth.se/medusa/>], (2004)
- <sup>146</sup> E. Farkas, P. Buglyó, É.A. Enyedy, M.A. Santos, „Factors affecting the metal ion-hydroxamate interactions II: effect of the length of the connecting chain on the Fe(III), Mo(VI) and V(V) complexation of some new desferrioxamine B (DFB) model dihydroxamic acids”, *Inorg. Chim. Acta*, **357**, 2451-2461. (2004)
- <sup>147</sup> V. Józsa, Z. Nagy, K. Ósz, D. Sanna, G. Di Natale, D. La Mendola, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, „Transition metal complexes of terminally protected peptides containing histidyl residues”, *J. Inorg. Biochem.*, **100**, 1399-1409. (2006)
- <sup>148</sup> B. Belosi, E. Gaggelli, R. Guerrini, H. Kozłowski, M. Luczkowski, F.M. Mancini, M. Remelli, D. Valensin, G. Valensin, „Copper binding to the neurotoxic peptide PrP106-126. Thermodynamic and structural studies”, *ChemBiochem*, **5**, 349-359. (2004)
- <sup>149</sup> Cs. Kállay, I. Turi, S. Timári, Z. Nagy, D. Sanna, G. Pappalardo, P. de Bona, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, „The effect of point mutations on copper(II) complexes with peptide fragments encompassing the 106-114 region of human prion protein”, *Monatsh. Chem.*, **142**, 411-419. (2011)
- <sup>150</sup> I. Sóvágó, K. Ósz, „Metal ion selectivity of oligopeptides”, *Dalton Trans.*, 3841-3854. (2006)
- <sup>151</sup> M. Klewpatinond, J.H. Viles, „Empirical rules for rationalising visible circular dichroism of Cu<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> histidine complexes: Applications to the prion protein”, *FEBS Letters*, **581**, 1430-1434. (2007)
- <sup>152</sup> A. Kaneda, A. Martell, „Aqueous equilibria of copper(II)- and nickel(II) polyglycine complexes”, *J. Coord. Chem.*, **4**, 137-151. (1975)

- <sup>153</sup> C. Ágoston, Z. Miskolczy, Z. Nagy, I. Sóvágó, „The effect of ring size of fused chelates on the stability constants and spectroscopic properties of nickel(II) and palladium(II) complexes of peptides”, *Polyhedron*, **22**, 2607-2615. (2003)
- <sup>154</sup> G.F. Bryce, R.W. Roeske, F.R.N. Gurd, „L-Histidine containing peptides as models for the interaction of copper(II) and nickel(II) ions with sperm whale apomyoglobin”, *J. Biol. Chem.*, **241**, 1072-1080. (1966)
- <sup>155</sup> M. Mylonas, A. Krezel, C.J. Plakatouras, N. Hadjiliadis, W. Bal, „The binding of Ni(II) ions to terminally blocked hexapeptides derived from the metal binding of –ESHH- motif of histone H2A”, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 4296-4306. (2002)
- <sup>156</sup> M. Mylonas, J.C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, K.D. Papavasileiou, V.S. Melissas, „An extremely stable Ni(II) complex derived from the hydrolytic cleavage of the C-terminal tail of histone H2A”, *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 637-643. (2005)
- <sup>157</sup> S. Timári, Cs. Kállay, K. Ósz, I. Sóvágó, K. Várnagy, „Transition metal complexes of short multihistidine peptides”, *Dalton Trans.*, 1962-1971. (2009)
- <sup>158</sup> G. Thomas, P.S. Zacharias, „Cyclic voltammetric studies of copper(II) amino acid complexes: electrochemical evidence for the generation of copper(I) complex as an intermediate”, *Polyhedron*, **4(5)**, 811-816. (1985)
- <sup>159</sup> C.S.St. Clair, H.B. Gray, J.S. Valentine, „Spectroelectrochemistry of copper-zinc superoxide dismutase”, *Inorg. Chem.*, 925-927. (1992)
- <sup>160</sup> K. Atkári, T. Kiss, R. Bertani, R.B. Martin, „Interactions of aluminium phosphates”, *Inorg. Chem.*, **35**, 7089-7094. (1996)
- <sup>161</sup> U. Weser, C. Richter, A. Wendel, M. Younes, „Reactivity and antiinflammatory and superoxide dismutase active Cu(II)-salicylates”, *Bioinorg. Chem.*, **8**, 201-213. (1978)

## 8. FÜGGELÉK

### TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

#### Az értekezés alapját képező közlemények

1. S. Timári, Cs. Kállay, K. Ósz, I. Sóvágó, K. Várnagy

#### **Transition metal complexes of short multihistidine peptides**

*Dalton Trans.*, (2009), 1962-1971.

Impakt faktor: 3,647

2. S. Timári, C. Riccardo, K. Várnagy

#### **Characterization of CuZnSOD model complexes from a redox point of view: redox properties of copper(II) complexes of imidazole containing ligands**

*Journal of Inorganic Biochemistry*, (2011) 105: 1009-1017.

Impakt faktor: 3,317

3. C. Kállay, I. Turi, S. Timári, Z. Nagy, D. Sanna, G. Pappalardo, P. de Bona, E. Rizzarelli, I. Sóvágó

#### **The effect of point mutations on copper(II) complexes with peptide fragments encompassing the 106-114 region of human prion protein**

*Monatsh. Chem.* (2011), 142: 411-419.

Impakt faktor: 1,356

4. Sarolta Timári, Katalin Várnagy

#### **Structural and redox properties of copper(II) complexes of ligands containing side chain imidazole rings**

*Spring Wind 2010, Konferenciakötet, Pécs, DOSZ-2010*, 546-551.

#### Az értekezésben nem tárgyalt közlemények

5. D. Sanna, K. Várnagy, S. Timári, G. Micera, E. Garribba

#### **VO<sup>2+</sup> Complexation of bioligands showing keto-enol tautomerism: potentiometric, spectroscopic and computational study**

*Inorganic Chemistry*, (2011), 50: 10328-10341.

Impakt faktor: 4,325

6. C. Kállay, Á. Dávid, S. Timári, E. M. Nagy, D. Sanna, E. Garribba, G. Micera, P. de Bona, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, I. Sóvágó

#### **Copper(II) complexes of rat amylin fragments**

*Dalton Trans.*, (2011), 40: 9711-9721.

Impakt faktor: 3,647

#### Posztterek

1. K. Várnagy, S. Timári, A. Dávid, Cs. Kállay, K. Ósz, I. Sóvágó

#### **Transition metal complexes of small multihistidine peptides**

*2<sup>nd</sup> European Conference on Chemistry for Life Sciences*, 2007. szeptember 4-8, Wrocław, Lengyelország (317. oldal)

2. Sarolta Timári, Gábor Balogh, Katalin Várnagy

#### **Structural and redox properties of copper(II) complexes of short multihistidine peptides**

*10th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry*, 2009. szeptember 25-28., Debrecen, Magyarország (117. oldal)

3. Sarolta Timári, Katalin Várnagy

**Structural and redox properties of copper(II) complexes of ligands containing side chain imidazole rings**

*10<sup>th</sup> European Biological Inorganic Chemistry Conference*, 2010. június 22-26., Thessaloniki, Görögország (PO-255.)

4. Sarolta Timári, Katalin Várnagy

**Copper(II) complexes as models of the active centre of Cu,Zn-SOD enzyme**

*4<sup>th</sup> European Conference on Chemistry for Life Sciences*, 2011. augusztus 31 – szeptember 3., Budapest, Magyarország (299. oldal)

5. Sarolta Timári, Katalin Várnagy

**Copper(II) complexes as models of the active centre of Cu,Zn-SOD enzyme**

*11<sup>th</sup> International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry*, 2011. december 2-5., Barcelona, Spanyolország (P-135.)

6. Katalin Várnagy, Sarolta Timári, Gizella Csire, Norbert Lihi

**Coordination and redox properties of copper(II) and iron(II/III) complexes of bis(imidazol-2-yl) ligands**

*11<sup>th</sup> International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry*, 2011. december 2-5., Barcelona, Spanyolország (P-147.)

**Előadások**

1. Timári Sarolta

**Több hisztidint tartalmazó pentapeptidok nikkell(II)- és kobalt(II)komplexei**

*XXVIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia*, 2007. április 2-4, Szeged, Magyarország (163. oldal)

2. Timári Sarolta, Kállay Csilla, Várnagy Katalin

**Több hisztidint tartalmazó pentapeptidok nikkell(II)- és kobalt(II)komplexei**

*XLII. Komplexkémiái Kollokvium*, 2007. május 23-25, Mátrafüred, Magyarország (23. oldal)

3. Sarolta Timári, Csilla Kállay, Imre Sóvágó, Katalin Várnagy

**Transition metal complexes of small multihistidine peptides**

*4th Central European Conference Chemistry towards Biology*, 2008. szeptember 8-11, Dobogókő, Magyarország (angol nyelven) (55. oldal)

4. Timári Sarolta, Kállay Csilla, Várnagy Katalin, Sóvágó Imre

**Több hisztidint tartalmazó peptidok átmenetifém komplexei**

*XXXI. Kémiai Előadói Napok*, 2008. október 27-29, Szeged, Magyarország (120-123. oldal)

5. Timári Sarolta, Várnagy Katalin

**Structural and redox properties of copper(II) complexes of ligands containing side chain imidazole rings**

*Spring Wind 2010*, 2010. március 25-27, Pécs, Magyarország (angol nyelven) (546-551. oldal)

6. Timári Sarolta, Cerea Riccardo, Várnagy Katalin

**Oldalláncban imidazol gyűrűket tartalmazó ligandumok réz(II) komplexeinek szerkezeti és redoxi sajátságai**

*XLV. Komplexkémi Kollokvium*, 2010. május 26-28, Mátraháza, Magyarország (13. oldal)

7. Sarolta Timári, Cerea Riccardo, Katalin Várnagy

**Structural and redox properties of copper(II) complexes of ligands containing side chain imidazole rings**

*XI International Symposium on Inorganic Biochemistry*, 2010. szeptember 4-8, Kudowa Zdrój, Lengyelország (angol nyelven) (39. oldal)

8. Timári Sarolta, Várnagy Katalin: **Oldalláncban imidazolgyűrűket tartalmazó ligandumok Cu(II)-komplexeinek szerkezeti és redoxi sajátságai**

*MKE 1. Nemzeti Konferencia*, 2011. május 22-25, Sopron, Magyarország (161. oldal)