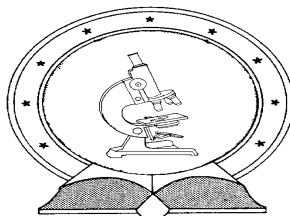


DE TTK



1949

**A TIOLÁTCSOPORT HATÁSA OLDALLÁNCBAN EGYÉB
DONORCSOPORTOT TARTALMAZÓ PEPTIDEK
KOMPLEXKÉPZŐ SAJÁTSÁGAIRA**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Lihi Norbert

Témavezető: Dr. Várnagy Katalin, egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi Doktori Tanács

Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2017.

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

Debrecen, 2017. június 28.

a jelölt aláírása

*Tanúsítom, hogy **Lihi Norbert** doktorjelölt **2014 - 2017** között a fent megnevezett Doktori Iskola **K/2** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.*

Debrecen, 2017. június 28.

a témavezető aláírása

**A TIOLÁTCSOPORT HATÁSA OLDALLÁNCBAN EGYÉB
DONORCSOPORTOT TARTALMAZÓ PEPTIDEK
KOMPLEXXKÉPZŐ SAJÁTSÁGAIRA**

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

Írta: **Lihi Norbert** okleveles vegyész

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

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

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Kéki Sándor	
tagok:	Dr. Ósz Katalin	
	Dr. Gyurcsik Béla	

A doktori szigorlat időpontja: 2017. május 9.

Az értekezés bírálói:

Dr.		
Dr.		
Dr.		

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr.		
tagok:	Dr.		
	Dr.		
	Dr.		
	Dr.		

Az értekezés védésének időpontja: 2017.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a *Richter Gedeon Nyrt. Talentum Alapítványnak*, hogy a doktori képzésem időtartama alatt ösztöndíjat biztosított a számomra.

Köszönöm *Dr. Fábán István* tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette számomra az értekezés elkészítését az általa vezetett Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken.

Őszintén köszönöm témavezetőmnek, *Dr. Várnagy Katalin* egyetemi tanárnak, hogy megismertetett a kutatás világával, mindvégig biztatott és munkámat értékes tanácsaival segítette.

Hálásan köszönöm *Dr. Sóvágó Imre* professor emeritusnak, hogy munkámat mindvégig figyelemmel kísérte, tapasztalataival és tanácsaival segítette.

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

Köszönettel tartozom *Dr. Kállay Csilla* tudományos főmunkatársnak, akinek tanácsaira mindig számíthattam.

Köszönet illeti a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport minden volt és jelenlegi tagját, akik tanácsaival, tapasztalataival segítették munkámat és baráti légkört teremtettek ahhoz. Külön köszönöm *Dr. Baginé Dr. Timári Saroltának*, hogy a kezdeti időszakban megtanította nekem a műszerek használatát, tanácsaival segített. Köszönet illeti *Dr. Fáriné Turi Ildikót*, *Dr. Földi-Bíró Lindát*, *Dr. Lekkáné Szabó Orsolyát* és a „PhD-szoba” jelenlegi hallgatóit, dolgozóit, szakmai tanácsaikért, emberi támogatásaikért. Külön ki szeretném emelni *Csire Gizellát*, *Dávid Ágnes*t, *Dr. Grenács Ágnes*t és *Bihari Zsolt*ot, akik önzetlen módon mind emberi mind szakmai tekintetben nagy segítségemre voltak, baráti tanácsaikkal segítettek.

Köszönet illeti *Laskai Aliz*, *Szűcs Dóra* és *Czine Tamás* hallgatókat, valamint *Lukács Márton* PhD hallgatót a modellvegyületek és DFT számítások során nyújtott közreműködésükért.

Köszönöm *Hüse Ilona* vegyésztechnikusnak, *Godó Attila* műszaki ügyintézőnek, valamint *Fekete Orsolya* vegyésztechnikusnak munkám során nyújtott technikai segítségüket.

Köszönöm *Nagyné Dombi Gizella* tanszéki irodavezetőnek a mindennapi hivatalos ügyek intézésében nyújtott segítségét.

Hálásan köszönöm *Dr. Bányai Istvánnak* az NMR mérések során nyújtott sokrétű segítségét és hogy kérdéseimmel bármikor bizalommal fordulhattam hozzá. Köszönöm *Dr. Kurtán Tibornak* a cirkuláris dikroizmus mérésekben nyújtott segítségét, *Dr. Nagy Lajosnak* az ESI-MS spektrumok rögzítését és kiértékelésében nyújtott segítségét.

Hálásan köszönöm *Dr. Daniele Sannanak* (*Istituto CNR di Chimica Biomolecolare*) és *Dr. Eugenio Garribbának* (*University of Sassari*), hogy három hónapos olaszországi tanulmányutam során segítettek elsajátítani az ESR spektroszkópia mérési technikáját és megtanították a DFT számítások alapjait és az eredmények értelmezését, amely technikát mind a mai napig alkalmazom munkám során.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni *családomnak*, *barátaimnak*, külön kiemelve *szüleimet*, *Krisztina testvéremet*, valamint barátaimat, *Ivánt* és

Balázst, folyamatos támogatásukért, szeretetükért és hogy elviseltek és mindvégig mellettem álltak.

A kutatás anyagi támogatásáért az OTKA K 115480 azonosító számú pályázatának, valamint a TÁMOP 4.2.4.B/2-11/1-2012-0001 Campus Hungary ösztöndíj pályázatának mondunk köszönetet. A kutatás az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg. A kutatáshoz a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0043 (ENVIKUT) és GINOP-2.3.2-15-2016-00008 számú projekt is hozzájárult.

Tartalomjegyzék

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata	1
1. BEVEZETÉS	3
2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK.....	5
2.1. Peptidek komplexképző sajátságai	5
2.1.1. Aszparaginsavat tartalmazó peptidek koordinatív sajátságai	6
2.1.2. Hisztidint tartalmazó peptidek koordinációs kémiája	7
2.1.3. Cisztein-tartalmú peptidek komplexképző sajátságai	9
2.1.4. Vegyes kötőhelyű (hisztidin és cisztein) peptidek átmenetifém-komplexei	10
2.2. A vizsgált fémionok koordinációs kémiája	12
2.2.1. A réz(II) biológiai szerepe és koordinációs kémiája	12
2.2.2. A nikkel(II) biológiai szerepe és koordinációs kémiája	14
2.2.3. A cink(II) biológiai szerepe és koordinációs kémiája.....	14
2.2.4. A kadmium(II) biológiai szerepe és koordinációs kémiája.....	15
2.2.5. A palládium(II) biológiai szerepe és koordinációs kémiája	16
2.3. A fémionok neurodegeneratív betegségekből betöltött szerepének koordinációs kémiai háttere.....	17
3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK	23
3.1. Felhasznált vegyszerek	23
3.2. Szilárdfázisú peptidszintézis, tisztítás	23
3.3. pH-potenciometria	26
3.4. UV-látható spektroszkópia.....	27
3.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia	29
3.6. NMR spektroszkópia	30
3.7. ESR spektroszkópia	32
3.8. ESI-TOF-MS tömegspektrometria.....	32

3.9. DFT számítások.....	33
4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKEKELÉSÜK.....	36
4.1. Kistagszámú peptidek nikkel(II)ionokkal alkotott komplexeik szerkezeti jellemzőinek elméleti vizsgálata	36
4.2. Ciszteint, illetve aszparaginsavat és ciszteint is tartalmazó peptidek komplexképző sajátságai	45
4.2.1. A ligandumok deprotonálódási makro- és mikrofolyamatai.....	45
4.2.2. Az AAASSC-NH ₂ peptid nikkel(II)-, cink(II)- és kadmium(II)-komplexei	47
4.2.3. Az AADAAC-NH ₂ , ADAAAC-NH ₂ és Ac-DAAC-NH ₂ komplexképződési folyamatai nikkel(II)ionokkal.....	50
4.2.4. Az AADAAC-NH ₂ , ADAAAC-NH ₂ és modellvegyületük, az Ac-DAAC-NH ₂ komplexképző sajátságai cink(II)- és kadmium(II)ionokkal	56
4.3. Ciszteint és hisztidint tartalmazó peptidek komplexképző sajátságai	60
4.3.1. Az AAHAAC-NH ₂ és AHAAAC-NH ₂ nikkel(II)-, cink(II)- és kadmium(II)-komplexei	61
4.3.2. Az AAHAAC-NH ₂ és AHAAAC-NH ₂ komplexképző sajátságai réz(II)- és palládium(II)ionokkal	71
4.3. Két ciszteint tartalmazó peptidek átmenetifém komplexei	79
4.3.1. A CSSACS-NH ₂ hexapeptid cink(II)- és kadmium(II)-komplexei	81
4.3.2. Az ACSSACS-NH ₂ komplexképző sajátsága cink(II)- és kadmium(II)ionokkal	84
4.4. A tiolátcsoport hatása a vizsgált peptidek komplexképző sajátságaira ..	90
5. ÖSSZEFOGLALÁS	93
6. SUMMARY.....	97
7. HIVATKOZÁSOK.....	101
8. FÜGGELÉK	114

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata

A, Ala	alanin
C, Cys	cisztein
D, Asp	aszparaginsav
E, Glu	glutaminsav
F, Phe	fenilalanin
G, Gly	glicin
H, His	hisztidin
K, Lys	lizin
M, Met	metionin
N, Asn	aszparagin
P, Pro	prolin
Q, Gln	glutamin
R, Arg	arginin
S, Ser	szerin
T, Thr	treonin
V, Val	valin
W, Trp	triptofán
Y, Tyr	tirozin
Xaa, Yaa	egységes aminosav rövidítések
Ac	acetyl (védőcsoport)
ATCUN motívum	A mino T erminal Cu and Ni binding site (aminoterminális réz- és nikkeltöbbitőhely)
CD v. ECD	cirkuláris dikroizmus spektroszkópia
CO	karbonilcsoport
COO ⁻ v. O	karboxilátcsoport
β-COO ⁻	β-karboxilátcsoport (aszparaginsav esetén)
COSY	Correlation spectroscopy
DFT	Density functional theory (sűrűségfunkcionál-elmélet)
DOSY	Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy (diffúzió NMR)
ESI	Electrospray ionization (elektroporlasztásos ionizáció)
ESR	elektron spin rezonancia spektroszkópia
HOMO	Highest occupied molecular orbital (legnagyobb energiájú betöltött molekulapálya)
HOMO-1/-2	legnagyobb energiájú betöltött molekulapályát követő első, vagy második kisebb energiájú MO
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital (legkisebb energiájú betöltetlen molekulapálya)
MS	mass spectrometry (tömegspektrometria)
N ⁻	peptidváz amidnitrogén
NH ₂	aminocsoport
N _{im}	imidazolnitrogén
NMR	Nuclear magnetic resonance (mágneses rezonancia)
PCM	Polarizable continuum model

S v. S ⁻	tiolátcsoport
TD-DFT	Time-dependent density functional theory
TOCSY	Total correlation spectroscopy
TOF	Time of flight (repülési idő)

1. BEVEZETÉS

A fémionok élő szervezetben betöltött létfontosságú szerepe mára egyértelmű tényként fogadható el. Legfontosabb funkcióikat enzimek aktív centrumában fejtik ki, melynek során különböző redoxi-, illetve sav-bázis folyamatokat katalizálnak vagy éppen szerkezetalakító funkciójuk révén kialakítják a metalloproteinek, metalloenzimek azon struktúráját, amelyekkel ezek a kölcsönhatások megvalósulhatnak. Az ezen folyamatokat modellező, az élő rendszerben lejátszódó fémion közvetítette kölcsönhatások mechanizmusainak feltérképezését célzó interdiszciplináris tudományterület a bioszervetlen kémia. Minthogy ezek a kölcsönhatások a fehérjék és különböző bioligandumok (többnyire aminosavak, fehérjék, illetve nukleinsavak) között általában koordinatív jellegűek, a bioszervetlen kémia egyértelműen koordinációs kémiai alapokon is nyugszik.

Az aminosavakból felépülő fehérjék legfontosabb fémionkötő helyeül az aminosavak oldalláncai szolgálnak. Ezeket az oldalláncokat fémionhoz való affinitásuk alapján megkülönböztethetjük, mint nem-, gyengén-, illetve erősen koordinálódó oldalláncok. Már az elnevezésből adódóan is egyértelmű, hogy a gyengén-, illetve erősen koordinálódó oldalláncok játszanak fontos szerepet a fémionok megkötésében. Az aszparaginsav vagy glutaminsav karboxilátcsoportja, a hisztidin imidazolil-, illetve a cisztein tiolátcsoportja fémionok legfontosabb kötőhelye. Emiatt számos közlemény, illetve összefoglaló mű foglalkozik az ezen aminosavakat tartalmazó peptidek és származékaik koordinációs kémiájával, de általában csak egy adott aminosavra (hisztidin, cisztein, stb.) fókuszálva. A hisztidint tartalmazó peptidek koordinációs kémiájának megismerése különösképp motiváló, mivel a több hisztidin alegységből felépülő ún. multihisztidin peptidek jelen a neurodegeneratív betegségekben (mint az Alzheimer-kór vagy prion betegségek) kialakuló fehérjeplakkokban, fehérjeaggregátumokban is. A ciszteint tartalmazó peptidek koordinációs kémiája már nem ilyen széles körben vizsgált, a legfontosabb tanulmányok a *Helicobacter pylori* baktérium nikkel(II)- és cink(II)-függő enzimjeihez, illetve a cink-ujj és cink-transzporter fehérjékhez kötődnek.

A természetben számos példa -köztük maguk a cink-ujj fehérjék is- található arra, hogy a különböző kötőhelyek egyazon fehérjében vannak jelen. Koordinációs kémiai szempontból ez nagyban megnöveli a szerkezeti variánsokat, ám a természetben általában mégis egyfajta kötésmód az, amely által egy adott enzim betöltheti funkcióját. Ezen szelektív kötésmódok megismerése történhet olyan egyszerű modellvegyületekkel, amelyek több, de egymástól elkülönült kötőhelyet tartalmaznak. A peptidek koordinációs kémiája ugyanakkor nem merül ki az aminosavak oldalláncaihoz történő koordinációval, hanem az aminosavak kapcsolódásakor létrejövő peptidkötés amidnitrogénje is hozzájárulhat a fémion

koordinációjához. Ezt a tényt az 1960-as években ismerték fel: a fémion hatására az amidnitrogének bázicitása oly mértékben lecsökkenhet, hogy az a mérhető pH tartományban deprotonálódik. Ezt az effektust fémion indukált deprotonálódásnak és koordinációnak nevezzük. A hatás természetesen számos tényezőtől is függhet, a fémion minőségén túl (palládium(II) esetén akár $\text{pH} < 2$ alatt is, míg nikkel(II) jelenlétében $\text{pH} 7-8$ között), keláthatás vagy egyéb ún. horgonycsoportok (mint hisztidin imidazol nitrogén vagy cisztein tiolát) is kedveznek ennek az effektusnak. A fent leírtak alapján egyértelmű, hogy már maga egy kis tagszámú, de elkülönült donorcsoportokat tartalmazó peptid is igen változatos koordinációs kémiával jellemezhető, amely szerkezeti gazdagságot a fémion minősége jelentősen megnöveli. *Ezek alapján jelen értekezés egy szisztematikus vizsgálatot foglal magába, amelyben azt mutatjuk be, hogyan változtatható a fémion affinitás olyan esetben, amikor a peptid N-terminális régiója erős fémkötő domént tartalmaz, ugyanakkor a C-terminális rész is erősen koordinálódó donorcsoporttal rendelkezik, amely akár versenghet, vagy ki is szoríthatja az N-terminális régiót a fémion megkötése szempontjából. Vizsgálataink során klasszikus oldategyensúlyi módszereket alkalmazva meghatároztuk az egyes komplexek sztöchiometriáját és stabilitási állandóit, illetve a spektroszkópiai módszerek kombinált alkalmazásával javaslatot tettünk a komplexek szerkezetére. Egyes esetekben elméleti kémiai módszerrel (sűrűségfukcionál-elmélet, DFT) számítottuk a képződő koordinációs izomerek egymáshoz viszonyított relatív energiáját, illetve spektroszkópiai tulajdonságait. Utóbbi számításához ma már számos módszer áll rendelkezésre, így célunk volt annak a kiderítése is, hogy az általunk vizsgált peptid-fémion rendszerek spektroszkópiai jellemzésére (UV-vis és/vagy ECD) mely funkcionálok alkalmazhatóak a legjobban.*

2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

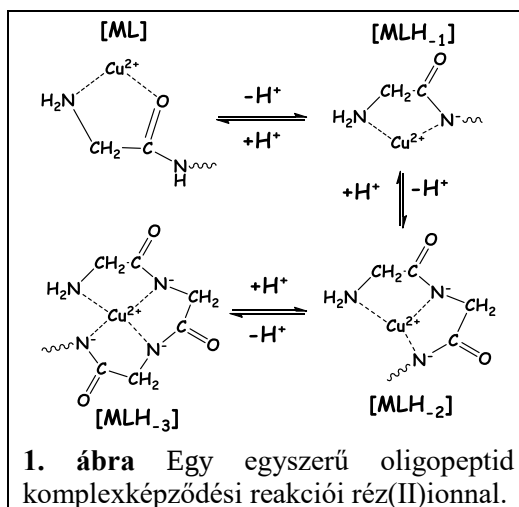
2.1. Peptidek komplexképző sajátosságai

Az aminosavakból felépülő peptidek koordinációs kémiája igen széles körben vizsgált, ugyanis ezen molekulák jó modellvegyületei lehetnek proteinek fémkötő helyeinek. Emiatt számos összefoglaló közlemény található meg az irodalomban, amelyben peptidek és származékaik komplexképző sajátosságait foglalták össze¹⁻⁸. Hasonlóan az aminosavakhoz, a peptidekben is az oldalláncok jelentős mértékben befolyásolhatják a fémion affinitást, illetve új kötőhelyként jelenhet meg a peptidváz amidnitrogénje. Ez az amidnitrogén a mérhető pH tartományban ($0 < \text{pH} < 14$) nem vesz részt sav-bázis reakcióban ($\text{pK}_{\text{amid}} = 15,2$ GlyTyr⁹), ugyanakkor bizonyos fémionok (pl. Pd(II), Cu(II), Ni(II), Zn(II), Au(III)) megnövelik a peptidváz amidnitrogénjének savasságát és elősegítik annak deprotonálódását.

A fémion minőségén túl a fent leírt hatáshoz szükséges az ún. horgonycsoport (terminális aminocsoport, hisztidin imididazol, ciszteint tiolátcsoport) jelenléte, amely a peptidváz amidnitrogénjével kelátképző helyzetben van. A fémion ehhez a csoporthoz kötődve elősegíti a peptidváz amidnitrogénjeinek deprotonálódását és koordinációját, kialakítva ezáltal egy 5-, illetve 6-tagú kelátrendszer.

Oldalláncban koordinálódó donorcsoportot nem tartalmazó peptidekben a legtöbb fémion elsődleges kötőhelye az N-terminális aminocsoport. Mivel ezen molekuláknál, az aminosavaktól eltérően nincs lehetőség az $(\text{NH}_2, \text{COO}^-)$ -koordináció vagy aminosavszerű koordináció kialakulására, az [ML] összetételű komplexek (NH_2, CO) kötésmóddal jellemezhetőek. Dipeptidek esetén egy hidrogénion felszabadulással járó folyamatban $[\text{MLH}_{-1}]$ összetételű

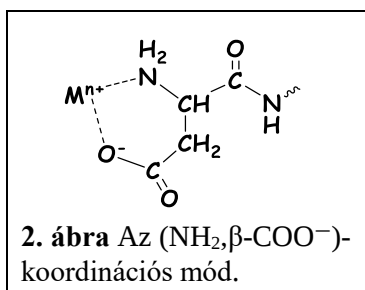
részecske jelenik meg és a koordinációban a terminális aminocsoport, a peptidváz amidnitrogénje és a karboxilátcsoport vesznek részt, létrehozva egy (5,5)-tagú kelátrendszer (1. ábra). Fontos megemlíteni, hogy a Gly-Xaa, illetve Xaa-Gly dipeptidekben utóbbi esetén az amidnitrogén deprotonálódása gátolt és csak lúgosabb pH tartományban következik be, amely szterikus okokkal magyarázható. A biszkomplexek képződését illetően is eltérés figyelhető meg az N-terminuson glicint, illetve más, alkil oldalláncot tartalmazó aminosavakhoz képest. Így az $[\text{M}(\text{LH}_{-1})_2]$ összetételű komplex (ahol



M=Cu(II)) csak az Xaa-Gly típusú peptidek esetén jelenik meg, szintén az oldallánc szterikus gátlása miatt^{10, 11}. Tripeptidekben, illetve nagyobb tagszámú peptidekben lehetőség van a szomszédos amidnitrogének deprotonálódására és koordinációjára, amellyel (5,5,5)-tagú csatolt kelátrendszer alakulhat ki (1. ábra). Az oldalláncban erősen koordinálódó donorcsoportot tartalmazó peptidek esetén a koordinációs viszonyok nagymértékben megváltozhatnak az oldallánc peptidvázban betöltött helyének vagy a donorcsoport minőségének függvényében. Ezen módosulások megnövelik a képződő komplexek szerkezeti diverzitását, így a következő alfejezetekben a legfontosabb, gyengén, illetve erősen koordinálódó donorcsoportot tartalmazó peptidek koordinatív sajátosságait foglaljuk össze.

2.1.1. Aszparaginsavat tartalmazó peptidek koordinatív sajátosságai

Az aszparaginsav hatását a peptidek átmenetifém ionokkal alkotott komplexekben már széles körben vizsgálták. Fontos megemlíteni, hogy az aszparaginsav karboxilátcsoportja általában nem viselkedik horgonycsoportként, de a képződő komplexek stabilitását növeli. Ez a stabilitásnövelő hatás ugyanakkor jelentős



mértékben függ az aszparaginsav peptidvázban betöltött helyétől¹²⁻¹⁶.

Az N-terminuson aszparaginsavat tartalmazó peptidek esetén réz(II)- és nikkel(II)ionokkal savas pH tartományban stabil ML összetételű komplexek képződnek (NH₂,β-COO⁻)-koordinációval, amelyet β-alanin szerű koordinációnak is nevezünk (2. ábra).

Ez a fajta koordináció ligandumfelesleg esetén biszkomplexek megjelenését is eredményezheti. A pH növelésével ugyanakkor megtörténik az amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja, amely Asp-Xaa típusú peptidekben dipeptidszerű koordinációt eredményez. A folyamat nagyobb pH tartományban következik be, mint a Gly-Gly esetén¹². A karboxilátcsoporthatása jelentősebb hatása figyelhető meg akkor, ha az aszparaginsav az N-terminálistól számított második, vagy harmadik pozícióban található. Ekkor általánosan elmondható, hogy a karboxilátcsoporthatása elősegíti a szomszédos N-terminus felőli amidnitrogén(ek) deprotonálódását és koordinációját és gátolja vagy nagyobb pH tartomány felé tolja az aszparaginsavtól C-terminális irányba található amidnitrogénét. Ekkor az aszparaginsav pozíciójától függően (NH₂,N⁻,β-COO⁻)-vagy (NH₂,N⁻,N⁻,β-COO⁻)-koordinációjú komplexek alakulnak ki. Az effektust számos aszparaginsavat tartalmazó peptid réz(II)ionokkal alkotott komplexei esetén tapasztalták. A nikkel(II)ionok jelenlétében a karboxilátcsoporthatása csak kis mértékben növeli a képződő komplexek stabilitását -a koordináció jellemzően dipeptidszerű-,

illetve meglepő módon a soft karakterű palládium(II)ionok is ilyenfajta komplexkéimiai viselkedést mutattak^{13, 14}.

Az aszparaginsav stabilitásnövelő hatása a peptidváz közbelső helyein is érvényesül, valamint új koordinációs helyet is jelenthet fémionok számára¹⁷.

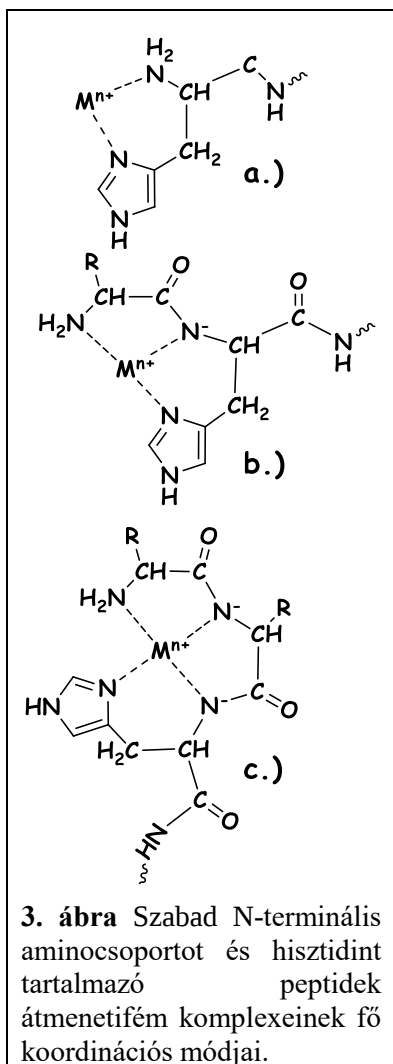
2.1.2. Hisztidint tartalmazó peptidek koordinációs kémiája

A hisztidin aminosav jelenléte a peptidvázban még összetettebb koordinációs kéimiai viselkedést eredményez átmenetifém ionokkal, mint az aszparaginsavé. Ugyanakkor itt is elmondható, hogy a képződő komplexek stabilitása és szerkezete nagymértékben függ a hisztidin peptidvázbeli helyzetétől.

N-terminálisan szabad, első helyen hisztidint tartalmazó peptidek esetén az aminocsoport és imidazol koordinációjával lehetőség van stabil hattagú kelátgyűrű kialakulására, amely az ún. hisztamin-szerű koordináció (3.a ábra). Ligandumfelesleg esetén biszkomplexek képződése tapasztalható, jelentős mértékű stabilitásnövekedést eredményezve az egyszerű oligopeptidekhez képest¹⁸⁻²². Ez a koordinációs mód a legtöbb kétértékű átmenetifém ionnal megvalósul. Mivel a kétfogú koordináció telítetlen koordinációs szférát eredményez, így ekvivaláris oldatokban a fémion hidrolízise vagy imidazol-hidas dinukleáris komplexek megjelenése tapasztalható. Ugyanakkor azon fémionok, amelyek képesek a peptidváz amidnitrogénjét deprotonálni, lúgos pH tartományban a koordinációs szféra átrendeződésével dipeptidszerű koordinációt alakítanak ki és a hisztidin imidazol nitrogénje csak a dinukleáris komplexekben szolgál kötőhelyként^{2, 21}.

A második helyen hisztidint tartalmazó peptidek esetén (Xaa-His-Yaa- szekvencia) a fő koordinációs mód az (5,6)-tagú csatolt kelátrendszer megjelenésével képződő (NH₂, N⁻, N_{im}) koordinált részecske (3.b ábra). Ezen komplexnek réz(II)- és nikkel(II)ionok esetén kiugróan nagy stabilitása van és széles pH tartományban uralkodó, amelyet oldategyensúlyi és szerkezeti aspektusból is széleskörűen jellemeztek. Ugyanakkor a háromfogú koordináció telítetlen koordinációs szférát eredményez, aminek eredményeképpen lúgos közegben imidazoláto hidas tetramer szerkezetek jelennek meg réz(II), nikkel(II) és palládium(II) jelenlétében^{21, 23-28}. Arany(III)ionok ilyen típusú komplexét diffrakciós vizsgálatok segítségével is sikerült igazolni²⁹. Fontos megemlíteni, hogy az előbb említett fémionok mellett az Xaa-His típusú peptideknél a cink(II)- és kobalt(II)ionok esetén is leírták az amidnitrogén deprotonálódását és koordinációját^{30, 31}.

A harmadik helyen hisztidint tartalmazó peptidek réz(II)- és nikkel(II)ionokkal kiugró termodinamikai stabilitású komplexet képeznek. Az ilyen típusú ligandumok esetén



már savas pH-jú oldatban megtörténik az amidnitrogének kooperatív (egy lépésben lezajló) deprotonálódása, létrehozva (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszerrel, telítve a fémionok koordinációs szféráját (3.c ábra). Ez a fajta ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}$) kötésmód az albumin fehérjében is jelen van és nagy szerepe van annak kiugró réz(II)- és nikkel(II)kötő sajátságában. Emiatt ezt a kötésmódot albuminszerű koordinációnak vagy ATCUN-motívumnak is nevezik, az Amino Terminal **CuNi** Binding Site szóösszetételből származtatva³²⁻³⁵.

Hasonlóan nagy stabilitású és megegyező koordinációs módú komplexek képződnek palládium(II)- és arany(III)ionokkal is³⁶, ugyanakkor a cink(II)- és kobalt(II)ionok szemben az előző Xaa-His típusú peptidcsaláddal, nem képesek indukálni a peptidváz amidnitrogénjeinek deprotonálódását és koordinációját, ekvimoláris oldatban a fémion hidrolízise és vegyes hidroxidokomplexek képződése tapasztalható³⁷.

Abban az esetben, ha a hisztidin az N-terminálistól számított harmadik pozíciótól távolabb helyezkedik el, a koordinációs izomerek képződésének a lehetősége megnő. Ebben az esetben mind az N-terminális aminocsoport, mind pedig a hisztidin imidazol nitrogénje

horgonycsoportként viselkedhet réz(II)- és nikkel(II)ionok számára, illetve lehetőség van makrokelát szerkezetű komplexek kialakulására is^{2, 38, 39}. A két független kötőhely együttes jelenléte pedig lehetőséget biztosít dinukleáris komplexek képződésére fémiont feleslegben tartalmazó oldatok esetén⁴⁰. A több hisztidin alegységből felépülő ún. multihisztidin peptidek minden egyes hisztidil oldallánca potenciális fémkötő helyül szolgálhat, aminek eredményeképpen a koordinációs izomerek száma jelentősen megnőhet. Az ilyen típusú peptidcsaládra jó példaként szolgálnak a prion protein fragmensei, amelyek számos hisztidin aminosavat tartalmaznak, így ezen multihisztidin típusú ligandumok komplexkémiai jellemzését a 2.3 alfejezetben részletesen tárgyaljuk.

N-terminálisan védett peptidekben a fémion affinitás jelentős mértékben lecsökken, melynek egyértelmű oka a szabad N-terminális aminocsoport hiánya. Ugyanakkor a

hisztidin imidazol nitrogénje horgonycsoportként indukálhatja az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját. Abban az esetben, ha ez a hisztidin az N-terminális régióhoz közel helyezkedik el, a fémion indukálta amidnitrogén deprotonálódás és koordináció az N-terminális irányába halad (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer kialakulásával. Ha a hisztidint az N-terminus irányába megelőző aminosav egység szarkozin vagy prolin, az amidnitrogén deprotonálódás és koordináció a C-terminus irányába indul, de a létrejövő (7,5,5)-tagú csatolt kelát kisebb termodinamikai stabilitású^{41, 42}.

2.1.3. Cisztein-tartalmú peptidek komplexképző sajátosságai

Ahogy a hisztidin imidazol nitrogénje, a cisztein tiolátcsoportja is erősen koordinálódó donorcsoport számos fémion számára, ugyanakkor a kötés meglehetősen szelektív^{6, 7}. Így a soft fémionokkal erős kovalens jellegű kötés, míg a hard jellegű fémionokkal gyenge kölcsönhatás alakul ki. Hasonlóan a hisztidinhez, a cisztein peptidvázban betöltött helye változatos sztöchiometriájú és szerkezetű komplexek megjelenését teszi lehetővé, ugyanakkor a kén-hidas komplexek megjelenése tovább növeli ezt a szerkezetgazdagságot. Az olyan redox aktív fémionok, mint a vas(III) vagy a réz(II) könnyen képesek redoxi reakcióba lépni a tiolátcsoporttal, amely diszulfid hidas peptidek megjelenését és a fémion redukcióját eredményezheti.

Az alábbiakban a legfontosabb koordinációs módokat soroljuk fel a cisztein peptidvázban betöltött helyének függvényében:

- (a) A terminális ciszteint tartalmazó peptidek stabil (NH_2, S^-) öttagú kelátgyűrűt alakítanak ki, amely lehetővé teszi a biszkomplexek megjelenését, illetve összemérhető fémion/ligandum arány esetén polinukleáris komplexek megjelenését, amelyet kén-hidak kapcsolnak össze.
- (b) C-terminális ciszteint tartalmazó peptidekben lehetőség van az (S^-, COO^-) hattagú kelát kialakítására és biszkomplexek megjelenésére. A cink(II)-, kobalt(II)- és kadmium(II)ionok képeznek stabil komplexeket ilyenfajta kötésmóddal⁴³.
- (c) Második helyen ciszteint tartalmazó, szabad N-terminussal rendelkező peptidekben a tiolát horgonycsoport elősegíti az amidnitrogén deprotonálódást és koordinációt, kialakítva az ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}^-$) csatolt kelátrendszert nikkel(II)- és palládium(II)ionokkal. Ellentétben az Xaa-His típusú peptidekkel, sem a cink(II), sem a kobalt(II) nem képeznek ilyen koordinációs módú komplexet. A háromfogú koordináció lehetővé teszi egy másik ligandum belépését a koordinációs szférába, így dimer szerkezetek megjelenését is.

- (d) A harmadik helyen ciszteint tartalmazó peptidekben hasonlóan a Xaa-Yaa-His szekvenciájú peptidekhez, nagy stabilitású ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S}^-$) koordinációjú komplex alakul ki nikkel(II)- és palládium(II)ionokkal^{1, 44}.

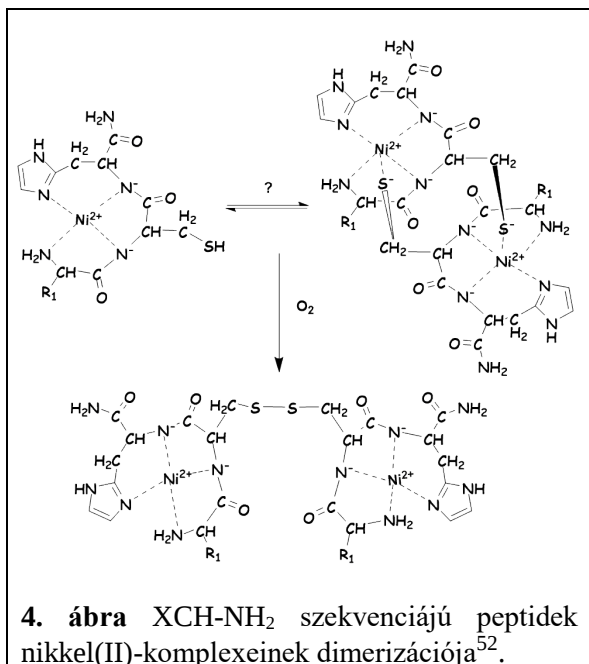
2.1.4. Vegyes kötőhelyű (hisztidin és cisztein) peptidek átmenetifém-komplexei

A legegyszerűbb ciszteint és hisztidint tartalmazó peptidek a HisCys és CysHis dipeptidek. Ezek közül a védett Z-Cys-His-OMe ligandumot vizsgálták ¹⁹⁹Hg NMR segítségével, amely a tiolát és imidazol csoportok koordinációját mutatta a fémionhoz⁴⁵. A ciklikus dipeptid (c-HisCys) komplexképződését cink(II)ionokkal tanulmányozták. A ligandum képes mono- és biszkomplexekeket kialakítani a cink(II)ionokkal, melyben a koordinálódó donorcsoportok az imidazol nitrogén és a tiolát kén. A monokomplexek stabilitása a c-GlyHis < c-HisHis < c-GlyCys < c-CysHis < c-CysCys sorrendben nő, amely a tiolátcsoport stabilizáló hatását mutatja a cink(II) komplexekben. Ekvimoláris oldatban dimer és M_2L_3 összetételű részecskék képződnek, amelyben a tiolátcsoport hiddonorként vesz részt két fémion koordinálásában⁴⁶. Ilyen sztöchiometriájú komplexek képződését a Cd(II):CysOMe rendszerben is közölték⁴³. A hisztidint és ciszteint tartalmazó tripeptidekben hasonló tendencia figyelhető meg, mint a ciklikus peptidekben, a ciszteint tartalmazó peptidek stabilitása nagyobb a cink(II)-komplexekben, mint a hisztidint tartalmazó peptidek komplexei esetén.⁴⁷

A nagyobb tagszámú peptideknél, mint a *metal sensor* proteinek modellvegyülete (Ac-SCHGDQGSDCSI-NH₂), illetve a ZnT3 cink transzporter modellvegyülete (Ac-PFHHCHRD-NH₂) a cisztein hisztidin melletti stabilitásnövelő hatása szintén érvényesül. A koordináció ezeknél a vegyületeknél a hisztidinek kötődésével indul, majd semlegeshez közeli pH tartományban a tiolátcsoport is koordinálódik, amely nagy stabilitású komplex megjelenését eredményezi. A Hg(II) esetén csak a ciszteinek koordinációját mutatták ki, amely jól értelmezhető a fémion kettes koordinációs számával⁴⁸. Az Ac-PFHHCHRD-NH₂ peptidben a nikkel(II) és cink(II) $3 \times \text{N}_{\text{im}} + \text{S}^-$ koordinációs módú komplexében a cink(II) stabilitása két nagyságrenddel nagyobb, amely a fémion tetraédes geometriájával magyarázható. A pH növelésével megindul az amidnitrogének nikkel(II) indukált deprotonálódása és koordinációja, amelyben nagyobb stabilitású, síknégyzetes, ($\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S}^-$) koordinációjú részecske képződik, cink(II) esetén hasonló folyamat nem játszódik le⁴⁹.

Fontos megemlíteni, hogy a nikkel(II) és cisztein/hisztidin kölcsönhatás nemcsak komplexképződési, hanem redoxi folyamatokat is eredményezhet. Így például az Xaa-Yaa-His szekvenciájú peptidek nikkel(II)-komplexei fiziológiához közeli pH tartományban oxigén vagy egyéb oxidálószer (KHSO_5 ⁵⁰ vagy magnéziumperoxifalát⁵¹) hatására autooxidatív dekarboxileződést szenvednek,

amely a DNS és a fehérjék hasítását okozhatja. Ross és munkatársai⁵² az XCH (X=glicin, vagy lizin) szekvenciájú peptideket vizsgálták és a szabad tiols csoportot tartalmazó nikkel(II) peptidkomplexek esetén a levegő oxigénjének hatására bekövetkező dimerizációt állapították meg. A diszulfidhíd képződés során a síknégyszetes nikkel(II) egy intermedieren keresztül pentakoordinált részecskévé válik egy dimer szerkezet megjelenésével, amelyet a S-donorok stabilizálnak.



Ez a részecske a levegő oxigénjének hatására egy diamágneses dimerré alakul, amely dimert diszulfidhíd kapcsol össze (4. ábra). A szabad karboxilcsoportú GCH peptid esetén nem tapasztalták a dekarboxileződési reakciót, valószínűleg a diszulfidhíd képződés kinetikailag gyorsabb, mint a dekarboxileződési reakció. A CXH peptid vizsgálat során levegő kizárásával síknégyszetes (S⁻, N⁻, N⁻, N_{im}) koordinációs módú részecske képződik, amely nagyobb pH tartományban, vagy a levegő oxigénjének hatására

koordinációs módot vált diszulfidhíd képződése közben. Ezen diszulfidképződést a réz(II)- és kobalt(II)ionok pillanatszerűen képesek katalizálni, a cink(II) ugyanakkor védi a peptidet a levegő oxigénje általi oxidációtól is⁵³.

Hasonló hatás az N-terminálisan védett Ac-CHCH-NH₂ peptid vizsgálata során nem volt megfigyelhető. A ligandum ugyanakkor jó modellvegyülete a HspA (*Heat Shock Protein A*) peptidnek, amely fontos szerepet játszik a nikkel homeosztázisában a *Helicobacter pylori* baktériumban⁵⁴. A baktérium számos betegség okozója, mint a fekély, akut vagy krónikus gastritis, carcinoma stb⁵⁵. A nikkel homeosztázisa elengedhetetlen a baktérium túléléséhez az extrém savas pH-jú gyomorban. Két enzim működésében játszik szerepet a fémion: az ureáz (amely a karbamid hidrolízisét katalizálja ammóniává és szén-dioxidá, semlegesítve a savas pH-t) és a hidrogenáz (amely szolgáltatja az energiát a baktérium számára). Az ureáz működéséhez nikkel, széndioxid, GTP és számos segédfehérje szükséges⁵⁶. Ezek közül az UreE egy polihisztidin peptid, ahová a nikkel túlnyomó többsége kötődik^{57,58}. A réz(II), kobalt(II) és cink(II) ugyanakkor képes kiszorítani a nikkelt(II).

A nikkel homeosztázisában szerepet játszó HspA peptid modellvegyületénél (Ac-ACCHDHKKH) megállapították, hogy a nikkel a két cisztein tiolátcsoportja és a köztük lévő amidnitrogén által koordinált. A vizsgálat során a bizmut a modellvegyületekhez sokkal jobban kötődött, de a koordinációban az imidazol nitrogénnek vettek részt⁵⁴. A bizmut(III) stabilan képes kötődni a –CXC-⁵⁹ és hisztidint tartalmazó peptidekhez, így egyre fontosabb szerepet tulajdonítanak neki baktérium enzimjeinek gátlásában⁶⁰. A HypA és HypB proteinek a [NiFe] hidrogenáz segédproteinjei. A HypA protein elkülönült hisztidint és két CXXC domént tartalmaz, a nikkel(II) a hisztidinekhez, a cink(II) a tiolátcsoportokhoz koordinálódik⁶¹.

Ahogy korábban említettük, a tiolcsoportot tartalmazó ligandumok általában redoxi reakcióba lépnek a réz(II)ionokkal, amely a fémion redukcióját és diszulfidhidas ligandumok megjelenését teszi lehetővé. Azonban sok esetben stabil kölcsönhatás alakulhat ki ciszteint és hisztidint egyaránt tartalmazó peptidekben is, mint amilyenek a plasztocianinok^{62, 63}. Ez a fajta koordinációs mód alakul ki ezen plasztocianin réz(II)ionokat kötő hurkának (*plastocyanin copper binding loop*) esetén is (Ac-WGGGSYPHQGAGMGGGHGGK-NH₂ és Ac-WGGGGCGHGVPS-HGMG-NH₂), ahol a képződő 1:1 sztöchiometriájú komplexekben a réz(II) tetraéderesen torzult síknégyszetes geometriájú és a Cu(II)-S kölcsönhatás drasztikus változást okoz a komplex ESR és elektronikus (UV-látható) paramétereiben⁶⁴. Hasonlóan nagy stabilitású réz(II)-komplexeiről számoltak be számos fémion szállításért felelős fehérje esetén is, ahol mind a cisztein tiolátcsoportja, mind pedig a hisztidin imidazol nitrogénje koordinálták a réz(II)ionokat⁶⁵.

2.2. A vizsgált fémionok koordinációs kémiaja

2.2.1. A réz(II) biológiai szerepe és koordinációs kémiaja

Egy átlagos súlyú felnőtt szervezet kb. 80-120 mg rezet tartalmaz, mennyiségét az átmenetifémek közül csak a cink és vas mennyisége haladja meg. Biológiai rendszerekben fő kötési helye a hisztidin, cisztein és metionin aminosavak oldalláncai, így általában ezekhez kötötten, nem szabad formában fordul elő. Felszívódása a bélben történik és az így szervezetbe jutott réz kötésében két protein, az albumin, illetve a ceruloplazmin vesz részt. Az albumin nagy stabilitással képes kötni a rezet, amelyet a korábban említett ATCUN motívumként is ismerünk. Ezzel szemben a ceruloplazminban a rézzel inertebb kötésmódú komplex képződik, ami miatt a csökkent ceruloplazmin szint a réz lerakódásához vezet jellemzően a máj és az agy (Wilson-kór) szöveteiben.

A biológiailag fontos réz-tartalmú fehérjéknek három típusát különböztetjük meg:

I. típus vagy kék rézfehérjék: egyetlen rézatomot tartalmazó fehérjék, amelyben a fémion egy erősen torzult geometriával rendelkezik egy 2N- és 2S-donoratom által

meghatározott környezetben. Ez az állapot a réz(II)-re jellemző síknégyzetes és réz(I)-re jellemző tetraéderes állapot közti átmenet. A fehérje típust szokatlan ESR paraméterek és intenzív kék szín jellemez, amely a $S \rightarrow Cu(II)$ töltésátviteli sávtól származik 600 nm körül. Ilyen típusú fehérjék a plasztocianinok, amelyek főleg növényekben fordulnak elő, döntően a fotoszintézisben vesznek részt, mint elektrontranszfer proteinek.

II. típus vagy nemkék rézfehérjék: monomer réz(II)komplexekre jellemző tetragonálisan torzult oktaéderes geometria, jellemző ESR paraméterekkel és széles abszorpciós spektrummal. II. típusú fehérje családba tartoznak a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimek, amelyek a szuperoxid anion diszproporcióját katalizálják. Az eukariótákban megjelenő CuZn-SOD érdekessége, hogy két fémiont, cinket és rezet tartalmaz, amelyben a cink(II) az aktív hely kialakulásáért felelős konformációt adja, a réz(II)ion pedig a katalitikus folyamatért felelős. A két fémiont egy hisztidin aminosav imidazolátó-hídja köti össze.

III. típus vagy ESR inaktív rézfehérjék: általában több fémcentrumot tartalmazó fehérjék, amelyben a réz(I) a d^{10} elektronkonfigurációja miatt ESR csendes, míg a réz(II)ionok olyan távolságra helyezkednek el egymástól, hogy köztük erős, antiferromágneses kölcsönhatás alakul ki, amely szintén ESR inaktivitást eredményez. ESR inaktív rézfehérje a puhatestűek és alacsonyabb rendű tengeri élőlények oxigénszállító fehérjéje, a hemocianin. Az oxigén kötődése során egy $[Cu(II)-O_2^{2-}-Cu(II)]$ peroxo kötésmódú komplex alakul ki, amely kevésbé stabil, mint a hemoglobinban kötött oxigén komplex, így a hemocianin kevésbé hatékony oxigénszállító fehérje.

Koordinációs kémiai szempontból a réz két oxidációs állapotban található meg, +1, illetve +2, amelyek közül komplexeiben általában utóbbi oxidációs számmal szerepel. A réz(I)ion d^{10} elektronszerkezete miatt diamágneses, komplexei színtelenek. Koordinációs száma jellemzően kettő vagy négy, így vegyületeiben a lineáris és tetraéderes koordináció preferált. Soft karakterű fémion, így nagy hajlamot mutat S-donoratomot tartalmazó ligandumok irányába. A +2-es oxidációs állapotú réz(II)ionokhoz d^9 elektronszerkezet rendelhető, komplexei színesek, paramágneses sajátságúak. Vegyületeiben a leggyakoribb koordinációs szám 4, 5 és 6, szerkezetüket tekintve síknégyzetes vagy tetragonálisan torzult oktaéderes elrendeződésűek. Ennek oka a Jahn-Teller hatás, amely az e_g pályák egyenlőtlen feltöltöttségéből adódik. Borderline típusú fémion, így az O, N és S donoratomokkal egyaránt stabilizálható^{66, 67}.

2.2.2. A nikkel(II) biológiai szerepe és koordinációs kémiája

A nikkel biológiai fontosságát az emberi szervezetben és más emlősökben még nem azonosították, ugyanakkor sok növény és mikroorganizmus számára létfontosságú. Számos enzimben megtalálható, így például az ureázokban, amelyek a karbamid hidrolízisét katalizálják ammóniává és szén-dioxiddá. Ez az enzim létfontosságú a *Helicobacter pylori* baktérium számára, mivel a felszabaduló ammónia segít közömbösíteni a gyomor savas pH-ját, amely a baktérium túlélése szempontjából kulcsfontosságú. A hidrogenázokban a vas mellett a nikkel is megtalálható, ahol a nikkel-vas klasztereket a cisztein tiolátcsoportjának kétfogú koordinációja stabilizálja.

Újabban sikerült azonosítani a szuperoxid-dizmutáz enzimsalád egy újabb tagját, amely szintén nikkelt tartalmaz és a redoxi ciklus során nikkel(II)-nikkel(III) átmenet valósul meg.

Koordinációs kémiai szempontból a nikkel +4-től 0-ig megtalálható komplex vegyületeiben, fémorganikus vegyületeiben nem ritka a nullától kisebb oxidációs állapot sem. Ezek közül a +2-es oxidációs állapot nagy stabilitású, amelyben a nikkel d^8 elektronszerkezetű. Komplex vegyületeiben az oktaédes, tetraédes és a síknégyszetes elrendeződés is előfordul a koordinálódó ligandumok szimmetriája, illetve a ligandumtér d pályákra hatott felhasadásának függvényében. Ha a ligandumtér kellően alacsony szimmetriájú, illetve kellően nagy a ligandumtér erőssége, általában a síknégyszetes geometria preferált. Mágneses tulajdonságait tekintve az oktaédes nikkel(II)-komplexek paramágneses, míg a síknégyszetes komplexek diamágneses sajátságúak^{68, 69}. Viszonylag kisebb számú tetraédes nikkel(II)-komplex ismert, a legtöbb ilyen geometriájú komplexet szubsztituált tercierfoszfinok segítségével sikerült előállítani. Egy köztes geometriának is tekinthető az oktaédes és síknégyszetes geometria között, ugyanis a krisztálytér-stabilizációs energia értéke $8 Dq$ és általában olyan ligandumokkal képződnek, ahol vagy szterikus okok miatt gátolt a síknégyszetes geometria kialakulás, vagy a ligandum nem rendelkezik olyan perturbációs energiával, ami a nikkel(II) d elektronjainak spinpárosodását tenné lehetővé⁷⁰.

2.2.3. A cink(II) biológiai szerepe és koordinációs kémiája

A cink az emberi szervezetben előforduló második leggyakoribb nyomelem, megközelítőleg 2 g mennyiségben található meg. Mivel egyedül +2-es oxidációs állapotban található meg, redoxi folyamatok katalízisében nem vesz részt, ezért a mintegy 200 cinktartalmú metalloproteinben és metalloenzimben szerkezetalkító és sav-bázis folyamatok katalízisét végzi. Így például az elsőként azonosított cinktartalmú szénsav-anhidráz enzim a szén-dioxid víz közötti reverzibilis reakciót

katalizálja, amelyben a cink(II)ionok tetraédes elrendeződésűek és a fémiont három hisztidin imidazol nitrogénje, illetve a katalitikus ciklusban szerepet játszó vízmolekula koordinálja. Szerkezetalkító funkcióját tekintve fontos megemlíteni a cinkujj-fehérjéket, amelyek DNS-kötő transzkripciós faktorként működnek. Bennük a fémiont minden ismétlődő egység 2-2 hisztidin és cisztein oldallánca koordinálja, kialakítva egy 12-15 aminosavból álló hurkot, amely képes kötődni a DNS-hez⁷¹.

A cink(II)ion $3d^{10}$ elektronszerkezetű, aminek megfelelően komplexei szintelen, diamágneses sajátságúak. Kinetikailag labilis, közepes termodinamikai stabilitású komplexeket képez peptidekkel, ugyanakkor tiolátsoportot tartalmazó ligandumokkal stabilizálható. Komplexeiben a fémion koordinációs száma leggyakrabban 6 vagy 4, ennek megfelelően az oktaédes és a tetraédes elrendeződés kedvezményezett.

Donoratom preferenciája a $S > N > O$ irányában csökken, emiatt a peptidekben leggyakrabban az N-terminális aminocsoporthoz, a hisztidin imidazol nitrogénjéhez, illetve a cisztein tiolátsoportjához kötődik. Nem koordinálódó oldalláncot tartalmazó peptidek esetén nem képes az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját indukálni, amely a ligandumtér stabilizáció hiányával, illetve a fémion nagy hidrolízis hajlamával magyarázható. Egyedüli példát erre az effektusra az N-terminálisan szabad GlyHis típusú peptidek vizsgálata során mutattak ki, ahol is pH 7,0 felett kialakul az (NH_2, N^-, N_{im}) koordinációjú részecske³¹.

2.2.4. A kadmium(II) biológiai szerepe és koordinációs kémiaja

A kadmium az emberi szervezetben, annak normál működése esetén nem fordul elő, ugyanakkor bizonyos növények (pl. rizs) vagy alacsonyabb rendű puhatestű élőlények meglepően magas kadmium-toleranciát mutatnak és nagy mennyiségben képesek a kadmiumot akkumulálni. Az ilyen szennyezett táplálékok fogyasztása során a fém az emberi szervezetbe is bejut, amelyre egy fontos példa az 1950-es években, Japánban megjelent ún. itai-itai kór. A kadmiummal szennyezett folyó vizét használva a rizsföldek öntözésére a fém bekerült az emberi anyagcsere folyamatokba és elsősorban idősebb nők esetén a csontok törékenységet fokozta. Ugyanis a kadmium hasonló kémia tulajdonságú, mint a cink és kalcium és utóbbit képes a csontokból kiszorítani, ahonnan csak igen nehezen ürül ki, felezési ideje évtizedekben mérhető. A kadmium felszívódása után elsősorban az albuminnal és transferrinnel szállítódik. A szervezetben történő megkötésében kétféle molekula vehet részt, a glutation és metallotioneinek. Utóbbiak olyan kis molekulatömegű fehérjék, amelyek számos ciszteint tartalmaznak, ezáltal különböző tagszámú fém-klaszterek alakulhatnak ki. Maguk a metallotioneinek többfunkciós fehérjék, a toxikus fémionok detoxifikálásán túl szerepet játszanak a reaktív oxigén specieszek semlegesítésében, illetve a sejtek

redoxiállapotának szabályzásában is. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy a metallotioneinekhez koordinált fémionok képesek azok képződését indukálni, így ezen multicisztéin típusú fehérjék szerepe a szerkezet védekező mechanizmusában egyértelmű.

A kadmium(II) d^{10} elektronszerkezetű, diamágneses, leggyakoribb oxidációs állapota +2. Tipikusan soft karakterű fémion, így a S-donoratomú ligandumokkal stabilizálható. Komplexeiben a koordinációs szám 2 és 6 között változik, így a lineáris, tetraédes és oktaédes geometria is egyaránt előfordulhat. A kitüntetett geometria hiánya a ligandumtér stabilizáció hiányával egyértelműen magyarázható. Tiolátcsoportot tartalmazó peptidekkel nagy stabilitású komplexet képez, de a terminális aminosoport és a hisztidin imidazol nitrogének is szerepet játszhatnak a fémion megkötésében, bár az ilyen komplexek kisebb termodinamikai stabilitásúak. Fontos megemlíteni, hogy habár a ciszteint tartalmazó peptidekhez a fémion stabilan kötődik, a tiolátcsoport mégsem képes a fémionhoz koordinálódva horgonycsoportként viselkedni és elősegíteni az amidnitrogén deprotonálódást és koordinációt⁷²⁻⁷⁴.

2.2.5. A palládium(II) biológiai szerepe és koordinációs kémiaja

A palládium egészséges emberi szervezetben nem fordul elő. Habár mérgező, de a természetben olyan kis mennyiségben található meg, hogy biológiai szerepe gyakorlatilag elhanyagolható. Komplexeinek vizsgálata két okból indokolt. A Pt(II)-tartalmú kemoterápiák modell fémionjaként általában palládium(II)iont alkalmaznak, illetve elméleti koordinációs kémiai jelentősége nagy, ugyanis peptidekkel a palládium(II)ionok képezik a legnagyobb termodinamikai stabilitású komplexeket. Palládium(II) esetén az amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja olyan effektív, hogy gyakran pH ~ 2 körül bekövetkezik, amely ezen rendszerek vizsgálatát jelentősen megnehezíti. Emiatt különböző kompetíciós módszereket használnak a fémion – peptid komplexek egyensúlyi állandójának meghatározására. Így például a kloridionokkal való kompetíciós reakcióban a peptidkomplex képződése a nagyobb, jobban vizsgálható pH tartományba tolható, a fémion hidrolízise pedig visszaszorítható⁷⁵.

A palládium(II) peptidekkel alkotott komplexeiben jellemzően diamágneses, síknégyszetes geometriájú, így jól vizsgálható ^1H NMR és CD-spektroszkópiával. Oldalláncban donorcsoportot nem tartalmazó egyszerű glicil-glicin peptid esetén a fémion kötődik az N-terminális aminosoporthoz, mint horgonycsoporthoz és indukálja az amidnitrogén deprotonálódását és koordinációját. A koordinációs szférában a karboxilátcsoport, illetve egy koordinált vízmolekula is megtalálható, amely nagyobb pH tartományban deprotonálódik, illetve a karboxilátcsoport is

kiszorul, helyére hidroxidcsoport koordinálódik. Ligandumfelesleget tartalmazó oldatban $\text{PdL}_2\text{H}_{-2}$ összetételű komplex alakul ki, amelyben $2x(\text{NH}_2, \text{N}^-)$ koordinációs mód valósul meg⁷⁶⁻⁷⁸.

Tiolát-, illetve tioétercsoportot tartalmazó ligandumokban a S-donoratom elsődleges fémionkötő helyéül szolgál a palládium(II)ionoknak. Tioétercsoport esetén a koordináció pH-tól független, ugyanakkor horgonycsoportként viselkedik. Így például a GlyMetGly peptidben az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S})$ koordináció valósul meg és a C-terminus felőli első amidnitrogén a teljes vizsgálható pH tartományban protonált marad. Mivel ebben az esetben a fémion koordinációs szférája telítetlen, ligandumfelesleget tartalmazó oldatokban biszkomplexek képződnek és az egy, illetve háromfogú koordináció lehetővé teszi koordinációs izomerek megjelenését is⁷⁹.

A palládium ugyanakkor fontos fémion abból a szempontból is, hogy a különböző Pt(II)-tartalmú kemoterápiák, rákellenes készítmények modellvegyületéül szolgál, ugyanis hasonló hard-soft karaktere, komplex geometriája és ionsugarának átmérője ezt lehetővé teszi. Mindemellett a palládium(II) ligandumszubsztitúciós reakciói öt nagyságrenddel gyorsabbak a megfelelő platina(II) komplexekhez képest, annak inert karaktere miatt. Ezáltal hatásmechanizmus vizsgálatokban igen gyakran használt, mint modell fémion^{80, 81}.

2.3. A fémionok neurodegeneratív betegségekben betöltött szerepének koordinációs kémiai háttere

A neurodegeneratív betegségek közös jellemzője, hogy az egészségesen működő fehérje egy sok esetben ismeretlen hatás vagy egymást indukáló mechanizmusok eredményeképpen konformációját megváltoztatja, amelynek következményeképpen aggregátumok, illetve plakkok jelennek meg az agyban. Emiatt annak szövetállománya pusztulásnak indul, amely a beteg szellemi- és fizikális leépüléséhez egyaránt vezethet. Míg Fridrich ataxia esetén a frataxin aggregációját, addig Alzheimer-kórban az amiloid- β plakkok megjelenését, a prion betegségekben (mint a Creutzfeld-Jakob kór) a prion fehérje konformációváltozását figyelték meg. A betegségek kialakulásának konkrét mechanizmusai máig nem ismeretesek, de feltételezhető az oxidatív stressz, illetve különböző átmenetifém ionok szerepe is⁸²⁻⁸⁴. A fémionok szempontjából többféle hatást is említene, amely ezen aggregációs folyamatokat okozza. Egyik ilyen a fent leírt konformációváltozás^{85, 86}. Másik lehetőség lehet, hogy a fémion hatására egy új intermolekuláris keresztkötésrendszer alakul ki, amely a fehérjeszálak oligomerizációját okozza⁸⁷. Azonban előfordul, hogy a fémion-ligandum kölcsönhatás során neutrális komplex alakul ki, amely hatására felgyorsul a fibrillum képződés⁸⁸. A fehérje morfológiája is megváltozhat a fémion megkötése révén, amely az oligomer formában stabilabb⁸⁹. Illetve a fémion hatására

a fehérje natív szerkezete stabilizálódhat, amely ezáltal letekeredik és egy energetikailag kedvezőbb formát vehet fel^{90, 91}.

1863-ban Nikolaus Friedrich írta le először a **Friedrich-ataxiát**, amelyben a páciensek egyensúlyi zavarára, a beszédképesség fokozatos leépülésére és a reflexek visszaszorulására lett figyelmes. Ezen elváltozások megjelenése után 4-5 évvel szívizomzavarok léptek fel, amelyek a páciensek halálához vezettek⁸³. A betegség első lehetséges molekuláris magyarázata szerint az ataxiát kódoló gén egy 90-170 alegységből álló trinukleotid ismétlődést épít be a frataxin fehérjébe, amely fehérje ennek következtében aggregálódik. A frataxin funkciója ugyanakkor nem ismert, de feltételezések szerint szerepet játszik a vas-kén fehérjék bioszintézisében. Az ataxiában szenvedő betegek frataxin szintje lecsökken és a vas metabolizmusa felborul. Ennek magyarázata lehet, hogy a frataxin szerepet játszik a vas metabolizmusának szabályzásában, de a mutálódott frataxin már nem képes ezt szabályozni, ami a vas akkumulációját idézi elő. Egy másik hipotézis szerint maga a frataxin tárolja a vasat, amely csak akkor lehetséges, ha a frataxin vassal alkotott komplexei hasonló szerkezetűek, mint a humán transferrin. Így a frataxin vélhetően képes is megkötni a vasat, amelyet 2003-ban Gerber és munkatársai igazolni tudtak⁹². A több hisztidin alegységből felépülő multihisztidin peptidcsaládok mutációját több neurodegeneratív betegség esetén kimutatták, illetve azt, hogy olyan fémionok, mint a réz(II), cink(II) és a vas(II)/(III) megemelkedett koncentrációban vannak jelen a kórban megjelenő plakkokban. Így például az amiotrófiás laterálszklérózisban (ALS) szenvedő pácienseknél a réz,cink-szuperoxid dizmutáz enzim több, mint 170 mutációját azonosították⁹³. Ezen túlmenően a Parkinson-kór esetén, mint környezeti hatást a mangán(II)ionokat is említették, amelyek a humán emberi PD (Parkinson disease) génhez kötődve támadják a neuronokat. Maga a gén egy olyan fehérjét kódol, amely számos fémkötőhelyet tartalmaz, így koordinációs kémiája részletesen vizsgált⁹⁴. Az alábbiakban a Kutatócsoportunkban vizsgált két neurodegeneratív betegségben megjelenő fehérje és mutánsainak részletes oldategyensúlyi vizsgálatát mutatjuk be. Egyiket az Alzheimer-kór esetén megjelenő β -amiloid peptid, a másikat pedig a szivacsos agyvelősorvadásban jelen levő prion protein egyensúlyi és spektroszkópiai vizsgálata jelenti.

Az **Alzheimer-kór** a 65 év feletti korosztály esetén egyre nagyobb számban jelentkező neurodegeneratív elváltozás, amely memóriazavarokkal, ingerlékenységgel és nyelvi nehézségek megjelenésével jár együtt. A betegség ugyanakkor a 40-65 év közötti korosztályban is megjelenhet, amelyet a β -amiloid prekuzora, az amiloid prekursor protein (APP) mutációja idéz elő. Ezt a transzmembrán fehérjét normál működés mellett az α , β , γ -szekretáz hasítja⁹⁵. A probléma akkor jelentkezik, amikor az APP mutációja révén egy 39-43-tagú amiloid-

β részlet hasad ki, amely felhalmozódik az extracelluláris térben és bekövetkezik az aggregációja.

Az amiloid- β aminosav szekvenciája jól ismert, számos fémionkötő helyet tartalmaz, így koordinációs kémiai szempontból is részletesen tanulmányozott⁹⁵⁻¹⁰⁴.

A természetes amiloid- β fehérje oldhatatlan vízben, így a klasszikus egyensúlyi és szerkezeti vizsgálatok akadályozottak. Ugyanakkor a peptid N-terminálisan szabad, illetve megtalálható ebben a régióban 3 hisztidin és számos poláris oldallánc is, amely szerepet játszhat fémionok megkötésében. Emiatt az N-terminális rész koordinációs kémiai sajátosságait széles körben vizsgálták és megállapították, hogy a fent említett horgonycsoportoknak nagy szerepe van a réz(II) megkötésében¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Az (1-16) fragmens PEG-ilálásával, illetve kisebb peptidfragmensek előállítására révén az oldékonysági viszonyok javultak, így a réz(II), nikkel(II) és cink(II) komplexek karakterizálása lehetővé vált^{40, 109-112}. Ezek alapján az (1-16) fragmens képes 4 ekvivalens réz(II)iont oldatban tartani, ahol a horgonycsoportok az N-terminális aminocsoport, illetve a H6, H13 és H14 pozícióban lévő hisztidinek. Hasonlóan a korábbi vizsgálatokhoz^{108,113, 114}, az első ekvivalens fémion megkötése a peptid N-terminális pozíciójában történik, amely kiugróan nagy affinitást mutat réz(II)ionok felé¹¹¹. Ez a nagy affinitás az N-terminális régióban lévő poláris oldalláncú aminosavak (Asp, Glu, Ser és Arg) stabilizáló hatásával magyarázható. A H6, H13 és H14 helyzetű hisztidinek bonyolultabb koordinációs viszonyokat teremtenek, mint a peptid N-terminális régiója. A mutáns fragmensek vizsgálata alapján megállapították, hogy a H6 helyzetű hisztidin az elsődleges horgonycsoport, amely indukálja a peptidváz amidnitrogénjeinek deprotonálódását és koordinációját és a réz(II)ionok csak egy kis hányada kötődik a H13-H14 régióhoz lúgos közegben¹¹¹. A védett (8-16) származék vizsgálata során koordinációs izomerek képződését tapasztalták összemérhető mennyiségben, amelyben az egyik horgonycsoport a H13 helyzetű, míg a másik a H14 helyzetű hisztidin volt. Ugyanakkor a fiziológiás pH-n képződő biszkomplexek a szomszédos hisztidinek kötődésével nagy stabilitású komplexeket eredményeztek, de csak az N-terminális régió hiányában¹¹⁰.

Az A β (1-16)-PEG fontos tulajdonsága, szemben a később bemutatandó prion fragmensek koordinációs sajátosságaihoz képest, hogy nagyobb stabilitással képes kötni a cink(II)ionokat, a ligandum három ekvivalens cink(II)iont képes oldatban tartani. Ezen fémion esetén a fő kötőhelyek az N-terminális aminocsoport, illetve a két szomszédos hisztidin (H13 és H14), ahol pH 8 fölött megtörténik az amidnitrogén fémionindukált deprotonálódása és koordinációja¹⁰⁹. NMR vizsgálatok alapján ugyanakkor fiziológiás pH-n a szomszédos hisztidin makrokelát a fő kötőhely cink(II), illetve kadmium(II) számára is⁸⁷.

A nikkel(II)ionok egyensúlyi vizsgálata alapján az (1-16) fragmens két ekvivalens nikkel(II) megkötésére alkalmas az N-terminális aminocsoport és a H14

horgonycsoportok által. Ellentétben a réz(II)- és cink(II)ionokkal, a nikkel(II)ionokkal képződő komplexek nem mutattak megnövekedett stabilitást, ugyanakkor azt fontos megemlíteni, hogy az (1-16) fragmens egyszerre mindhárom fémion megkötésére alkalmas lúgos oldatban¹¹².

Az alumínium(III) lehetséges szerepe az Alzheimer-kórban erősen vitatott⁹⁹. Általánosságban a hard tulajdonságú kationok, mint az alumínium(III) nem képeznek nagy stabilitású komplexeket az A β peptiddel, amely csak gyenge kölcsönhatásra utal a fémion és ligandum között. Ugyanakkor maga a fémion képes előidézni az amiloid aggregációját¹¹⁵.

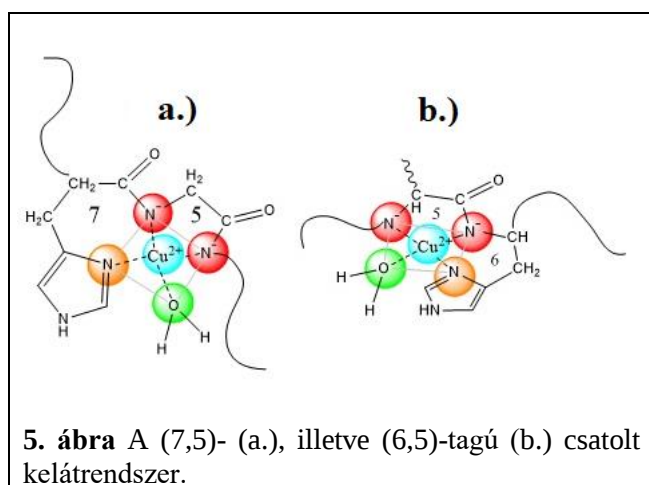
Ugyancsak megemelkedett koncentrációban található meg a vas az Alzheimer-kórban szenvedő betegek agyában. Az irodalomban azonban csak kevés adat található az amiloid β -vas(II/III) kölcsönhatásról, amelyek alapján a kölcsönhatás a ligandummal csak igen kis mértékű⁹⁵. Azt azonban fontos megemlíteni, hogy maga a vas(II)/vas(III) redoxirendszer részt vesz az oxidatív stressz és ezáltal a reaktív oxigén specieszek generálásában, amelyek szintén fontos szerepet tölthetnek be az Alzheimer-kór kialakulásában.

A **prion betegség** vagy fertőző szivacsos agyvelősorvadás egy ritka, de annál szélesebb körben tanulmányozott neurodegeneratív betegség. Fertőző jellegéből fakadóan megjelenése folyamatos veszélyt jelent a társadalomra nézve. Hasonlóan a fent részletezett neurodegeneratív betegségekhez, a betegség kialakulása egy konformáció változás következménye, melyben a normál celluláris glikoprotein (PrP^C) egy abnormális formává módosul (PrP^{Sc}), amely proteáz rezisztens. A PrP^C funkciója még ma nem teljesen ismert, de szerepet játszhat a réz homeosztázisában. Ennek az is lehet az oka, hogy a prion protein nagyszámú hisztidin aminosavat tartalmaz, a teljes aminosav szekvenciájában összesen tíz darabot, amelyből hat az N-terminálishoz közeli régióban helyezkedik el. Emiatt a prion fehérje és fragmenseinek réz(II) kötő képességét már széles körben tanulmányozták^{97, 101, 102, 104, 116, 117}. A prion protein különlegessége, hogy ebben a tartományban a hisztidinek egymástól távol és jól szeparáltan helyezkednek el egyéb, erősen koordinálódó aminosavat ugyanakkor nem tartalmaz a molekula. A hat hisztidin közül négy az ún. *octarepeat domain*-ben található, amely négy ismétlődő oktapeptid szegmensből áll (PHGGGWGQ). A hisztidinek az aminosav szekvencia 61, 69, 77 és 85 pozíciójában találhatóak meg. A további két hisztidin az *octarepeat* tartományon kívül a 96 és 111 pozícióban van és ez a legvalószínűbbnek vélt fémkötőhely a GTHS és MKHM tetrapeptid szegmenssel.

Számos tanulmány foglalkozik az *octarepeat* tartomány fémion (elsősorban réz(II)) affinitásával is, ugyanis mind az egyensúlyi¹¹⁸, mind a szerkezeti adatok^{119, 120} azt mutatják, hogy a fragmens réz(II)kötő képessége igen nagy, fiziológiás pH-n [CuLH₂] összetételű komplex alakul ki (N_{im}, N⁻, N⁻) koordinációs móddal.

Egykristály diffrakciós eredmények alapján a koordinációs szférában egy axiálisan koordinált vízmolekula is található, amelyet egy közeli triptofán is stabilizál, rögzítve a komplex szerkezetét. pH 8 felett egy újabb lúgfogyasztó folyamatban egy további amidnitrogén is belép a koordinációs szférába. Az *octarepeat* tartomány ismétlődésével előállított dimer és tetramer peptidek jelentős különbséget mutatnak a monomer peptidhez képest¹²¹⁻¹²³. A tetramer peptid rossz oldhatósága nem tette lehetővé az oldategyensúlyi és spektroszkópiai tanulmányokat, így a tetramer PEG-ilálása adott bővebb információt a valós *octarepeat* tartomány fémion affinitásáról¹²⁴. Az egyensúlyi és spektroszkópiai adatok egyértelműen mutatták, hogy a réz(II)-*octarepeat* rendszer részecskeeloszlása a pH függvényében nagymértékben függ a fémion és ligandum arányától. Minden esetben a hisztidin imidazol-N a horgonycsoport a fémion megkötésében, ugyanakkor a monodentát Cu-N_{im} kötésmód termodinamikailag nem stabil, de a tetramer formával képződő Cu-4N_{im} makrokelát már jelentős mértékű stabilitásnövekedést mutatott. Ez a részecske a domináns fiziológiás pH-n és az amidnitrogén deprotonálódást és koordinációt eltolja a lúgos pH tartományba. A monomer PHGGGWGQ esetén fiziológiás pH-n már kialakul az (N_{im},N⁻,N⁻) kötésmódú komplex. A fémion arányának növelése megtöri ezt a makrokelát szerkezetet és polinukleáris komplexek képződnek, ahol minden hisztidin egy független fémion kötőhelyeként funkcionál.

A natív prion protein réz(II) komplexeivel végzett vizsgálatok során megállapították, hogy a molekula több, mint 4 ekvivalens réz(II) megkötésére képes, amely arra utal, hogy a fémion megkötésében az *octarepeat* tartományon kívüli hisztidinek is részt vesznek¹¹⁷. A terminálisan védett kisebb fragmensek (Ac-GTHS-NH₂, Ac-MKHM-NH₂ és Ac-IKQHT-NH₂) oldategyensúlyi vizsgálata azt mutatta, hogy mindhárom ligandum jó fémkötőhely réz(II)ionok számára és a képződő komplexek stabilitása nagyobb, mint az *octarepeat* fragmensessel képződő komplexeké¹²⁵⁻¹²⁹.



Ez jól magyarázható azzal, hogy a védett fragmensekben és az *octarepeat* egységben a kialakuló csatolt kelátrendszer tagszáma különbözik. Míg az *octarepeat*-ben a prolin gátolja az amidnitrogén deprotonálódást az N-terminális irányba, így egy (7,5)-tagú csatolt kelát alakul ki (5a. ábra), addig az

octarepeat-en kívüli tartományban az amidnitrogén deprotonálódás és koordináció az N-terminális irányba halad és a létrejövő csatolt kelát (6,5)-tagú (5b. ábra). Kutatócsoportunkban végzett szisztematikus tanulmányok a prion peptid fragmenseivel megállapították, hogy a H96 és H111 pozíciójú hisztidinek kötik a legnagyobb stabilitással a réz(II)ionokat és ez a stabilitás a következő sorrendben csökken: H111>H96>>H85~H77^{37, 130-132, .} Ez a különbség egyértelműen az oldalláncok különböző fémionokhoz való affinitásából ered. Nikkel(II) esetén a stabilitási sorrend fordul (H96>>H111), amelynek oka, hogy a GTHS szekvencia merev szerkezete jobban stabilizálja a síknégyszetes nikkelt(II), az MKHM szekvencia pedig a réz(II)ionok számára kedvező egy axiális vízmolekula stabilizáló hatásán keresztül¹³³.

Ennek megfelelően a HuPrP(91-115) fragmens képes mindkét fémiont egyidejűleg kötni, ugyanakkor, ha a ligandum két kötőhelyét telítjük réz(II)ionokkal, a nikkel(II) nem képes versengeni a kötőhelyért, csapadék formájában leválik az oldatból⁴². A nikkel(II) azonban jó diamágneses modelljeként szolgál a réz(II)ionoknak, így NMR segítségével további szerkezeti információk nyerhetők a fémionhoz koordinált donorcsoportok minőségéről¹³⁴⁻¹³⁶. Hasonlóan jó modell a palládium(II)ion is¹³⁷, habár a legnagyobb termodinamikai stabilitású komplexek ezzel a fémionnal képződnek⁴¹.

A cink(II)ionok nem képeznek nagy termodinamikai stabilitású komplexeket az emberi és emlős prion fragmensekkel^{138, 41}. Azonban a cink(II) kötő képessége a zebraahal prion proteinnek kiugróan nagy^{139, 140}. Ez azzal magyarázható, hogy ebben a proteinben a hisztidin aminosavak nem szeparáltak, hanem egymás szomszédságában helyezkednek el. A réz(II)ionok természetesen nagyobb stabilitású komplexeket képeznek ezzel a ligandummal is, de a cink(II)ionok jelenléte jelentősen befolyásolhatja a komplexképződési folyamatokat¹⁴¹⁻¹⁴³. A kadmium(II)ionok kis termodinamikai stabilitással kötődnek a prionfragmensek hisztidin imidazol nitrogénjeihez^{41,144}, illetve a mangán(II)ionok esetén sem mutattak ki jelentős mértékű kölcsönhatást¹⁴⁵.

A fent leírtakból is látható, hogy a különböző donorcsoportok egyidejű jelenléte jelentős mértékben változtatja a koordinációs kémiai viszonyokat, így mindenképp indokolt egyszerű, de több, erősen koordinálódó donorcsoportot tartalmazó ligandumok vizsgálata.

3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK

3.1. Felhasznált vegyszerek

A szilárdfázisú peptidszintézis során felhasznált vegyszerek, oldószerek kereskedelmi forrásból származnak, felhasználásuk közvetlenül, tisztítás nélkül történt. A Rink Amide Am gyanta, a 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium-tetrafluoroborát (TBTU), illetve a 9-fluorenil-metoxi-karbonil (Fmoc) védőcsoportot tartalmazó aminosav származékok (Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Ser(Trt)-OH) a svájci Novabiochem cégtől kerültek beszerzésre.

Az analitikai tisztaságú N,N-dimetil-formamid (DMF), az N,N-diizopropil-etilamin (DIPEA) és a trifluorecetsav (TFA) a Merck Kft. termékei, míg az N-hidroxibenzotriazol egy hidrát (HOBt·H₂O), az N-metil-2-pirrolidon (NMP), a triizopropil-szilán (TIS), a 2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol (DOT) és a 2-metil-2-butanol a Sigma-Aldrich Co. termékei. A piperidint, a diklór-metánt (DCM), a dietil-étert (Et₂O) és a 96 %-os ecetsavat a Molar Chemicals Kft.-től szereztük be. A szintézis célra alkalmas DMF és ecetsavanhidrid a VWR International termékei.

A HPLC vizsgálatok során használt acetonitril és TFA a Sigma-Aldrich Co. terméke. Az oldategyensúlyi vizsgálatok során CuCl₂-, NiCl₂-, ZnCl₂-, Cd(NO₃)₂-törzsoldatok a Reanal Finomvegyszergyár Zrt. által gyártott a.l.t. tisztaságú vegyszerekből készültek háromszor ioncserélt vízben való oldásával. A fémion törzsoldatok koncentrációját gravimetriásan, oxinát csapadék formájában határozták meg. A palládium(II)-törzsoldatot K₂[PdCl₄] (Sigma-Aldrich Co.) vízben való oldásával készítettük, 2 ekvivalens mennyiségű sósav hozzáadásával. A palládium(II)-törzsoldat savtartalmát pH-potenciometria segítségével határoztuk meg.

3.2. Szilárdfázisú peptidszintézis, tisztítás

A szilárdfázisú peptidszintézist R. B. Merrifield dolgozta ki, és ezért 1984-ben Nobel-díjat kapott¹⁴⁶. Az ilyen típusú szintézisteknikák nagy előnye, hogy jól automatizálhatóak. A szintézis egy oldhatatlan szilárd hordozón, ún. gyantán történik. A gyantán olyan funkciós csoportú szemcsék találhatók, amelyekhez kémiai kötással aminosav kapcsolható. Első lépésben a peptid C-terminális helyén lévő aminosavat kapcsoljuk, majd erre építjük fel a többi aminosavat. Ugyanakkor az aminosavak oldalláncai tartalmazhatnak olyan funkciós csoportokat, amelyek nem kívánt keresztreakciókat eredményeznének a szintézis során. Emiatt fontos a megfelelő védőcsoportok használata, amelyeknek a szintézis végén könnyen eltávolíthatóknak kell lenniük. Az α -aminocsoport védelmére 9-fluorenil-metoxi-karbonilt¹⁴⁷ (Fmoc)

alkalmaztunk, a hisztidin imidazolil, a cisztein tiolát és a szerin hidroxil oldalláncát tritil, míg az aszparaginsav karboxilcsoportját terc-butil csoporttal védjük.

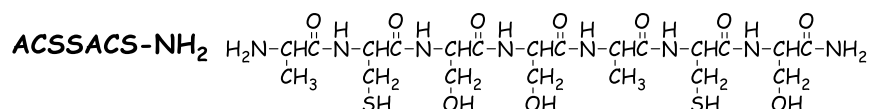
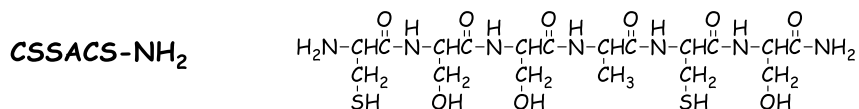
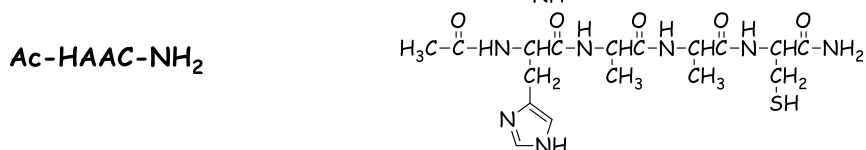
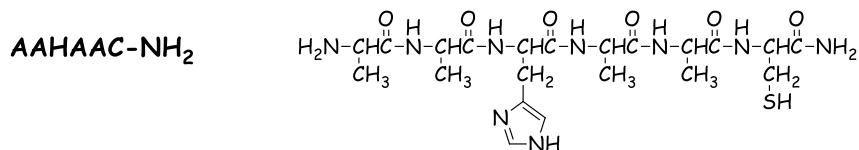
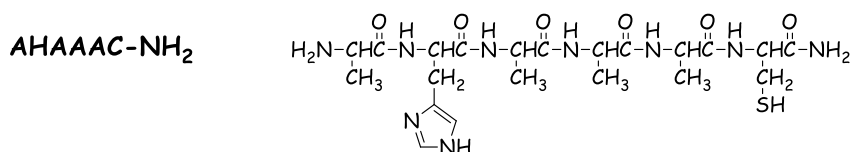
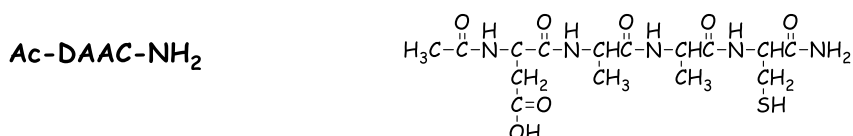
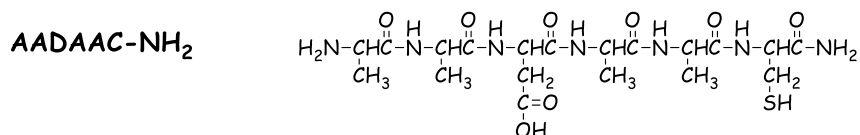
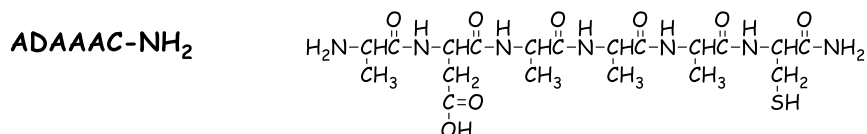
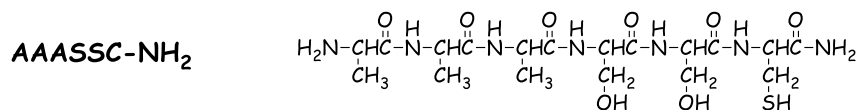
A szilárdfázisú peptidszintézis Liberty peptidszintetizáló készülékkel (CEM, Matthews, NC) történt, oldószerként N,N-dimetil-formamidot használtunk. A szintézis során használt Rink Amide típusú gyanta C-terminálisan savamid csoportot tartalmazó peptidek előállítását teszi lehetővé. A gyantán lévő védőcsoport eltávolítása 0,1 mol/dm³ koncentrációjú HOBt·H₂O és 20 V/V% piperidint tartalmazó DMF oldattal történt 80°C-on 30W teljesítményű mikrohullámmal, 180 másodpercen keresztül. Ezután történik a C-terminális felőli első aminosav hozzáadása, négyszeres feleslegben 0,2 mol/dm³ koncentrációban, az oldószer DMF volt. A funkciós csoportok aktiválásához TBTU/HOBt/DIPEA stratégiát alkalmaztunk. Az aminosav gyantához, illetve következő egységhez való kapcsolását a készülék 80°C-on 30W teljesítményű mikrohullámmal, 300 másodperc alatt végezte el. Ezen lépéseket ciklikusan ismételve a kívánt aminosav-szekvenciájú peptid felépíthető. Azon ligandumok esetén, ahol az N-terminális aminocsoport védett volt, az utolsó aminosavegység Fmoc-védőcsoportjának eltávolítását követően 6 V/V% ecetsavanhidridet és 5 V/V% DIPEA-t tartalmazó DMF oldat segítségével alakítottuk ki az acil védőcsoportot.

A szintézis befejezése után a gyantát és a rajta található peptidet diklórmétán, majd 96%-os ecetsav, 2-metil-2-butanol és dietil-éter segítségével mostuk.

A gyantáról való lehasítás, illetve a védőcsoportok eltávolítása szobahőmérsékleten, 94,0% TFA-t, 1,0% 2,2'-(etiléndioxi)-dietántiolt, 2,5% TIS-t és 2,5% H₂O-t tartalmazó elegyben történt. Az oldatot ezután hideg dietil-éterbe csepegtettük, amelyből a peptid csapadék formájában kivált. A csapadékot centrifugáltuk és szárítottuk. Szárítás után a mintát vízben feloldottuk és liofilizáltuk.

A kapott termék tisztaságát fordított fázisú HPLC segítségével ellenőriztük, amelyhez analitikai Teknokroma Europa Peptide C18 (250 x 4,6 mm, pórusméret: 120 Å, szemcseméret: 5 µm) kolonnát használtunk Jasco MD-2010 diódasoros detektorral. A detektálás a peptidkötésre jellemző abszorpció maximumon, 222 nm-en történt. Gradiens elúciót alkalmaztunk, melynek során az A oldószer víz 0,1 V/V% TFA-val, a B oldószer acetonitril 0,1 V/V% TFA-val volt. Az elúció során 0,8 mL/perc áramlási sebességet alkalmazva az eluens összetételét az 1-15 percben 0-ról 25 %-ra változtattuk a B oldószer esetén. Ezt a 25 %-ot tartottuk a következő 16-20 perc során, majd a következő 5 percben a B eluens mennyiségét 0 %-ra csökkentettük.

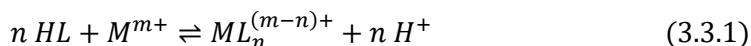
A ligandumok tisztaságát és azonosságát a HPLC mellett ESI-TOF-MS és NMR segítségével is igazoltuk.



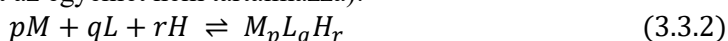
6. ábra Az általunk előállított ligandumok szerkezete.

3.3. pH-potenciometria

A komplexképződési folyamatokat jellemző egyensúlyi állandók meghatározására a pH-potenciometria széleskörűen használt vizsgálati módszer. Alkalmazhatóságának ugyanakkor feltétele, hogy fémion jelenlétében a ligandum protonálódási folyamatai megváltozzanak, így a komplexképződés hatására az oldat pH-ja megváltozik. Ekkor a hidrogénion (H^+) és fémion (M^{m+}) közötti kompetíciós reakció a (3.3.1) egyenlettel adható meg:



A bruttó komplexképződési folyamat általános alakját pedig a (3.3.2) egyenlet szemlélteti (a töltéseket az egyenlet nem tartalmazza):



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

pH-potenciometria segítségével a képződő komplexek sztöchiometriája és stabilitási állandója határozható meg, amelyre felírható a (3.3.3) egyenlet:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_p L_q H_r]}{[M]^p [L]^q [H]^r} \quad (3.3.3)$$

A kísérleti adatok ismeretében a ligandum protonálódási állandóinak, illetve a komplexek stabilitási állandóinak meghatározása a SUPERQUAD¹⁴⁸ és a *Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén* kifejlesztett PSEQUAD¹⁴⁹ számítógépes programokkal történt. A számolásokhoz az alábbi primer adatokra van szükség: a fémion, a ligandum és a hidrogénion analitikai koncentrációja, vízionszorzat, a titráló oldat koncentrációja, az egyedi részecskék pontos, vagy közelítő stabilitási állandói és a térfogat – pH adatpárok. A program a bemenő adatok ismeretében Newton-Raphson iteráció segítségével a finomítani kívánt stabilitási állandókat közelíti mindaddig, amíg a $\Sigma(V_{\text{mért}} - V_{\text{számított}})^2$ összefüggésre minimumot nem talál.

A stabilitási állandók értékeit a kiindulási komponensekre felírható anyagmérleg egyenletek (3.3.4-3.3.6) adják:

$$c_M = [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \quad (3.3.4)$$

$$c_L = [L] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \quad (3.3.5)$$

$$c_H = [H] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \quad (3.3.6)$$

A közelítés jóságát az illesztési paraméterrel – $|V_{\text{mért}} - V_{\text{számított}}|$ átlagértéke – jellemezhetjük. A számolás végén a program megadja a keresett stabilitási állandókat, illetve azok hibáját, valamint az illesztési paraméter értékek átlagát és az egyes pontok eltérését a mért és számolt titrálási pontok között.

A stabilitási állandók ismeretében az adott részecskék koncentráció eloszlását a pH függvényében a MEDUSA¹⁵⁰ programmal szerkesztettük meg.

A pH potenciometriás titrálásokat vizes oldatokban, 298 K hőmérsékleten végeztük, amelyet ultratermosztát segítségével biztosítottunk. A pontosan ismert koncentrációjú KOH oldat ($\sim 0,2 \text{ mol/dm}^3$) adagolását Hamilton fecskendővel felszerelt Mol-AcS mikrobüretta végezte, a pH mérése Metrohm 6.0234.110 kombinált üvegelektóddal történt, amelyet MOLSPIN pH-mérőhöz csatlakoztattunk. Az elektród kalibrálása 298 K-en $0,050 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftaláttal történt, melynek ilyen körülmények közötti pH-ja 4,005. A titrálás során a mintaoldat gőzterébe argont áramoltattunk, a kevertetést pedig mágneses keverőtesttel biztosítottuk.

A titrált mintákban a ligandum kiindulási koncentrációja $1,0 \cdot 10^{-3} - 3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ volt, bennük a fémion:ligandum arány 2:1 és 1:3 között változott. A minták állandó ionerőssége $0,2 \text{ mol/dm}^3$ volt, amelyet KNO_3 vagy KCl oldat hozzáadásával állítottunk be. A $0,2 \text{ mol/dm}^3$ elektrolit-koncentráció megegyezik a mérőoldat koncentrációjával, de nagyobb, mint a fémion és ligandum koncentrációjának összege. Ennek eredményeképpen a titrálás során az oldat ionerőssége állandó értéken tartható. A diffúziós potenciál kiküszöbölésére az Irving és munkatársai által bevezetett módszert alkalmaztuk¹⁵¹.

3.4. UV-látható spektroszkópia

Az átmenetifém ionok komplexeinek fényelnyelését általában a d-d átmenetek, illetve a ligandumról a fémionra, vagy a fordított irányban lejátszódó töltésátviteli folyamatok okozzák. Az általunk vizsgált fémionok közül a réz(II)-, nikkel(II)- és palládium(II)ionok peptid komplexei színesek, így ezen komplexek elektrongerjesztési spektrumait részletesen mutatjuk be.

A **réz(II)ionok** d^9 elektronkonfigurációja az elektron lyuk formalizmus érelmében fordítottja a d^1 -nek, ezáltal viszonylag egyszerű spektrum rendelhető hozzá. A Jahn-Teller effektus következtében a tetragonálisan torzult oktaéderes réz(II)-komplexekben az 2E_g alap- és ${}^2T_{2g}$ gerjesztett állapotú energiaszintek degeneráltsága megszűnik és háromféle d-d átmenet valósulhat meg: $d_{xz} (d_{yz}) \rightarrow d_{x^2-y^2}$; $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$; $d_z^2 \rightarrow d_{x^2-y^2}$. Ezek az átmenetek igen gyakran átfednek egymással, így a réz(II)-komplexek elektrongerjesztési spektruma általában egy széles elnyelési sávval jellemezhető, melynek intenzitása és energiája függ a koordinálódó donoratomok számától és minőségétől. Axiális koordináció hiányában ezen komplexek abszorpciós maximumának helye peptidek réz(II)-komplexei esetén egy empirikus képlet segítségével megbecsülhető, amelyben az egyes koordinálódó donorcsoportok különböző hozzájárulási tényezővel rendelkeznek^{5,152}:

$$\lambda_{max} = \frac{1000}{\sum_{i=1}^n x_i} [nm] \quad (3.4.1)$$

ahol x_i : hozzájárulási tényezők, n pedig azon donoratomok száma, amely hatással van a λ_{max} értékére. A fent leírt egyenlet ugyanakkor nem veszi figyelembe az axiálisan koordinálódó donoratomok hozzájárulását, a keláteffektust, illetve magának a ligandumnak a kromofór csoportjait. Peptidek esetén a koordinált nitrogénatomok száma jellemző abszorpciós maximum értékeket eredményez, amelynek adatai kiegészítve a moláris abszorbancia értékekkel az első táblázatban találhatóak meg.

1. táblázat A réz(II)-komplexek abszorpciós maximumának és moláris abszorbanciájának függése a koordinált nitrogénatomok számától³.

Koordinált nitrogénatomok száma	Abszorpciós maximum λ_{max} (nm)	Moláris abszorbancia ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
1	680-730	30-60
2	620-670	40-120
3	540-590	100-150
4	500-530	120-200

Az oktaéderes elrendeződésű **nikkel(II)**-komplexekben három kis intenzitású átmenet valósul meg, ezek növekvő energia szerint: ${}^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{2g}(F)$, ${}^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{1g}(F)$ és ${}^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{1g}(P)$. Ennek megfelelően az abszorpciós spektrumban három sáv jelenik meg, illetve gyakran megfigyelhető egy váll az ${}^3A_{2g}(F) \rightarrow {}^3T_{1g}(F)$ átmeneten, amely egy kis intenzitású spintiltott átmenet következménye. Az ilyen típusú nagy spinszámú komplexek általában gyenge terű ligandumokkal képződnek. Erős terű, illetve kellően alacsony szimmetriájú donoratomokkal síknégyszetes, kis spinszámú nikkel(II)-komplexek képződnek, amelynek oka, hogy ilyen ligandumtér esetén a d pályák olyan mértékben felhasadnak, ami az elektronok párosodását eredményezi a kisebb energiájú d pályákon és a legnagyobb energiájú $d_{x^2-y^2}$ pálya üres marad. Ezen komplexek intenzitása lényegesen nagyobb az oktaéderes komplexekéhez képest ($\epsilon \sim 50\text{-}500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) és abszorpciós maximuma 400-500 nm környékén jelentkezik.

A komplexképződés d pályákra kifejtett felhasadása számottevőbb a második átmenetifémsor esetén, így a **palládium(II)**-komplexek kevés kivételtől eltekintve síknégyszetes, diamágneses karakterű komplexek. Ennek megfelelően abszorpciós spektrumuk hasonló a síknégyszetes nikkel(II)-komplexek spektrumához, nagy intenzitású sáv jelenik meg 300-500 nm abszorpciós maximummal. Ezen abszorpciós maximum értéke gyakran eltolódhat az UV tartományba, átfedve a ligandum

sávjaival, ami a palládium(II)-komplexek spektrumainak nehéz kiértékelését vonja maga után.

Az UV-látható spektrumokat nikkel(II)-, réz(II)- és palládium(II)ionok esetén a 250-800 nm hullámhossz tartományban rögzítettük Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras fotométer segítségével. A minták koncentrációja megegyezett az oldategyensúlyi vizsgálatok során alkalmazott ligandum koncentrációval, a fémion-ligandum arányát pedig 1:2 és 2:1 között változtattuk. A spektrumokat különböző pH értékeken rögzítettük, a pH állítása az 1,000 cm úthosszúságú kvareküvetében történt. Az adatok feldolgozása a gyártó által mellékelt szoftver segítségével, illetve MS Excel táblázatkezelő programmal történt.

3.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

Az optikailag aktív anyagok kölcsönhatása a síkban polarizált fény balra, illetve jobbra cirkulárisan polarizált komponensével eltérő mértékű, ezáltal a kilépő fénysugár elliptikusan polarizálttá válik. A cirkuláris dikroizmus így a síkban polarizált fény két összetevőjének abszorpciója, amely a teljes abszorpciónak kb. 1 %-át teszi ki. A hullámhossz függvényében ábrázolva az abszorpció különbséget vagy az ebből származtatható moláris abszorpciós különbséget ($\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$), kapjuk a cirkuláris dikroizmus spektrumot (CD). A CD spektrumok általában több információt hordoznak magukban az UV-látható spektrumokhoz képest. Ennek oka, hogy az elektronátmentek viszonylag keskeny sávokkal jelentkeznek, átfedésük ritkán fordul elő, illetve az átmenet előjele is szerkezeti információkat hordoz magában.

Egy fémkomplex optikai aktivitását két tényező okozhatja. Egyik, hogy maga a ligandum is rendelkezik aszimmetria centrummal, a másik, hogy ez az aszimmetria centrum a ligandum fémionhoz való koordinációjának hatására alakul ki. Egyszerű peptidek fémionokkal (jellemzően réz(II), nikkel(II), ritkábban palládium(II)) alkotott komplexeinek CD spektroszkópiás vizsgálatával számos kutatócsoport foglalkozott, így a legfontosabb általános következtetések elérhetőek az irodalomban¹⁵³⁻¹⁵⁷. Ennek megfelelően megadható az XYZ tripeptidek fémkomplexeinek, adott hullámhosszon számítható Cotton-effektusa⁵:

$$\Delta\epsilon = \Delta\epsilon_{\lambda}^{XGG} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{GYG} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{GGZ} \quad (3.5.1)$$

A glicin (G) aminosav, amely optikailag nem aktív, a Cotton-effektus kialakulásához nem járul hozzá. Ugyanakkor az optikailag aktív csoportok a peptidváz különböző pozícióiban különböző hozzájárulásúak a Cotton-effektushoz az $\Delta\epsilon_{\lambda}^{XGG} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{GGX} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{XGX}$ sorrendben. Ennek oka, hogy a donorcsoportok különböző mértékben

továbbítják a királis információt a fémionhoz (kísérleti tapasztalatok alapján a hatás az $\text{NH}_2 < \text{COO}^- < \text{N}^-$ sorrendben nő).

A CD spektroszkópiás vizsgálatokat a *Debreceni Egyetem Szerves Kémia Tanszékén* végeztük JASCO-810 típusú spektrométeren. A minták koncentrációja, illetve fémion-ligandum aránya megegyezett a pH-potenciometria során alkalmazottakkal. A pH függő CD spektrumokat szobahőmérsékleten, 0,100 cm és 1,000 cm úthosszú küvetákban vettük fel 220 – 800 nm hullámhossztartományban. Az adatsor kiértékelése a gyártó által mellékelt szoftveren, illetve MS Excel segítségével történt.

3.6. NMR spektroszkópia

A mag mágneses rezonancia spektroszkópiát a szabad ligandumok, illetve diamágneses fémiont tartalmazó rendszerek esetén alkalmaztunk. Így lehetőségünk nyílt a cink(II)-, kadmium(II)-, palládium(II)- és a d-pályák nagymértékű felhasadása következtében a diamágneses nikkel(II)-komplexeiről is szerkezeti információt nyerni.

Az NMR spektrumokból kinyerhető elsődleges információk a kémiai eltolódás, a jelek intenzitása, a jelek finomszerkezete, illetve a dinamikai jelenségek. Ezek mindegyikének megváltozása utalhat a fémionhoz történő koordinációra.

A ligandumok, illetve a képződő komplexek vizsgálata során ^1H és egy kadmium(II)-rendszer esetén ^{113}Cd 1D spektrumokat, illetve diffúzió NMR (DOSY) és különböző 2D spektrumokat (COSY, TOCSY) is rögzítettünk, egyes esetekben ezeket a módszereket kombináltuk vízelnyomásos technikákkal.

A felhasznált NMR technikák rövid jellemzése:

COSY (COrrrelation SpectroscopY): talán az egyik leggyakrabban alkalmazott homonukleáris 2D technika, melyben az egymással geminális ($^2J_{\text{HH}}$) és vicinális ($^3J_{\text{HH}}$) skaláris csatolásban lévő protonok közötti korrelációt detektálhatjuk¹⁵⁸.

TOCSY (TOtal Correlated SpectroscopY): hasonló homonukleáris 2D technika, mint a fent leírt COSY, de a geminális és vicinális csatolások mellett lehetőségünk van a $^4J_{\text{HH}}$ és egyes esetekben az $^5J_{\text{HH}}$ skaláris csatolásokat is detektálni.

DOSY (Diffusion-Ordered NMR SpectroscopY): Diffúzió NMR segítségével az NMR aktív magot tartalmazó molekulák Brown-mozgását mérhetjük. A kísérlet során az NMR cső z-tengelye mentén szelektív fázisjelölést hozunk létre egy 90° -os impulzus segítségével, amelyet egy újabb 90° -os impulzussal longitudinális információvá kódolunk. A diffúzió idő alatt bekövetkező longitudinális relaxációt gyorsítja a diffúzió a z-irányú mágnesezettségek kicserélődése által. Egy újabb 90° -os impulzus fáziskódolt transzverzális mágnesezettséget hoz létre, amelyet egy gradiens impulzussal megszüntetünk és a létrejövő spin-echót detektáljuk. A jel intenzitásának változását leíró egyenlet¹⁵⁹:

$$I = I_0/2e^{-\left(\frac{2\tau}{T_2} + \frac{T_M}{T_1}\right)}e^{-(\gamma^2\delta^2\left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)DG^2)} \quad (3.6.1)$$

ahol D: diffúziós együttható; δ : gradiens impulzushossz; γ : giromágneses hányados; Δ : diffúzió idő; G: a gradiens nagysága; τ : az az időtartam, amely alatt a transzverzális relaxáció lezajlik; T_M : az az időtartam, amely alatt a longitudinális relaxáció folyik. A diffúziós állandó ismeretében meghatározható egy adott részecske hidrodinamikai sugara (R_H) a Stokes-Einstein összefüggés alapján:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (3.6.2)$$

ahol R_H : hidrodinamikai sugár, k_B : Boltzmann-állandó, T: hőmérséklet (K), η : közeg viszkozitása, D: diffúziós együttható.

Az NMR vizsgálatokat Bruker AM 360 MHz FT-NMR, illetve Bruker Avance 400 MHz FT-NMR készüléken végeztük, a kiértékelés során pedig a TopSpin 3.2 és MestreNova 8.1 szoftvereket használtuk. A DOSY mérések során kapott adatok illesztése az OriginPro 9.0 szoftver segítségével történt.

^1H NMR vizsgálatok során belső standardként trimetilszilil-propánsavat (TSP) használtunk, amelyre $\delta_{\text{TSP}} = 0$ ppm. A ^{113}Cd NMR mérések esetén deuterált DMSO-t alkalmaztunk. 0.1 M koncentrációjú $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ DMSO oldatát alkalmaztuk külső standardnek. Az akvizíciós paraméterek az alábbiak voltak: impulzushossz: 15 μs (60°), várakozási idő (pulse repetition time) 20 s, a spektrum szélessége: 42 kHz, akvizíciós adatpontok száma: 65 356, teljes scan szám 16 000.

A COSY, TOCSY, illetve DOSY mérések során minden esetben meghatároztuk a 90° -hoz tartozó impulzus hosszát. Diffúzió NMR mérésekor a Bruker által elérhető standard impulzusszekvenciát alkalmaztuk¹⁶⁰. A kísérletek során konstans diffúzió időt ($\Delta = 50$ -80 ms) és 2 ms gradiens impulzushosszt (δ) alkalmaztunk. A kiadott gradiens impulzuserősségét (G) 32 lépésben változtattuk 0-ról kb. 50 Gauss $\cdot\text{cm}^{-1}$ értékig. A diffúziós konstans a (3.6.1) egyenletnek megfelelően nemlineáris legkisebb négyzetek módszerével határoztuk meg.

A minták összeállításánál 99,8 %-os tisztaságú deutérium-oxidot (ISOTEC Inc.) használtunk, vizes oldatok esetében pedig deutérium-oxidot tartalmazó kapillárist. A ligandum koncentrációját 3 mM és 10 mM között változtattuk különböző fémion:ligandum arányok mellett. A cink(II)- és nikkell(II)ionokat tartalmazó minták pH állítását NaOD és DCl hozzáadásával, míg palládium(II)- és kadmium(II)ionok esetén NaOD és DNO_3 segítségével végeztük. A pH mérés hordozható Metrohm pH-mérő és Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektrod segítségével történt, a D_2O oldatokban mért pH* értékét a Gross-Butler-Purlee egyenlet alkalmazásával konvertáltuk pD skálává az alábbi egyenletnek megfelelően¹⁶¹⁻¹⁶³:

$$pD = pH^* + 0,44 \quad (3.6.3)$$

3.7. ESR spektroszkópia

Paramágneses fémionok, illetve párosítatlan elektront tartalmazó molekulák vizsgálatára az elektron-spin rezonancia (ESR) spektroszkópia széles körben elterjedt szerkezetvizsgálati módszer. Hasonlóan az NMR spektroszkópiához, ESR esetén is a mintát erős mágneses tér jelenlétében vizsgáljuk, ugyanakkor az anyag-fény kölcsönhatásból eredő abszorpció az NMR-től eltérően nem a magspinek, hanem az elektronspinek következménye. Az ESR segítségével mérhető paraméterek fagyasztott minták, vagy szilárd minták esetén anizotrópok, így megkülönböztetjük a spektrum párhuzamos és merőleges tartományát. Ez az anizotrópia egykristályok rögzített tengely körüli forgatásakor jól nyomon követhető.

A spektrumokból nyerhető elsődleges információ a g értéke, illetve a hiperfinomcsatolási-állandó (A):

$$g_{\parallel} = g_0^{\parallel} \cdot \frac{H_0}{H_{\parallel}} \quad (3.7.1)$$

$$A_{\parallel} [cm^{-1}] = \frac{g_{\parallel} \cdot \mu_B \cdot a_{\parallel}}{h \cdot c} \quad (3.7.2)$$

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

Ezen értékeket összehasonlítva ismert rendszerek paramétereivel, információt nyerhetünk a koordinálódó donoratomok számáról és minőségéről. Abban az esetben, ha a mágneses donoratomok (mint a nitrogén) lépnek kölcsönhatásba a párosítatlan elektronokkal, a rezonanciajelek további felhasadására van lehetőség, ezt szuperhiperfinom-kölcsönhatásnak nevezzük, amely kölcsönhatás lehetőséget ad a különböző pozíciókban koordinálódó mágneses donoratomok megkülönböztetésére.

Az ESR spektrumokat az *Istituto CNR di Chimica Biomolecolare* (Sassari, Olaszország) intézményben, Dr. Daniele Sanna és Dr. Eugenio Garribba (*University of Sassari*, Sassari, Olaszország) segítségével rögzítettük. A mérések során egy HP 53150A mikrohullámú frekvenciaszámlálóval felszerelt Bruker EMX spektrométert használtunk, a spektrumokat 120 K hőmérsékleten etilén-glikol hozzáadása után, illetve szobahőmérsékleten is regisztráltuk. A mintákban a $^{63}\text{Cu(II)}$ koncentrációja 1 mM, illetve 3 mM volt, a fémion:ligandum arány pedig 1:1. A $^{63}\text{Cu(II)}$ -oldatot szilárd $^{63}\text{CuSO}_4$ (JV Isoflex, Moszkva, Oroszország) vízben történő oldásával készítettük el.

3.8. ESI-TOF-MS tömegspektrometria

A pH-potentiometria segítségével a képződő komplexek sztöchiometriája, illetve stabilitási állandója megadható, ugyanakkor a dimer és polimer szerkezetű komplexek

megjelenéséről nem ad információt. Ekkor jó módszer a tömegspektrometria, melyben a jelek tömeg/töltés (m/z) értéke pontosan megadja egy adott komplex molekulatömegét. Mind az előállított ligandumok, mind a fémkomplexek esetén végeztünk tömegspektrometriás vizsgálatokat. A vizes oldatokat elektroporlasztásos ionizáció segítségével alakították gáz halmazállapotúvá, a képződő részecskék lágy ionizáción mentek keresztül, kismértékű fragmentációt eredményezve ezáltal. A jelek hozzárendelése tömeg/töltés értékük alapján, illetve a számolt és mért izotópeloszlással történő egybevetés alapján történt.

Az ESI-TOF méréseket a *Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékének* munkatársai végezték, Bruker micrOTOF-Q 9 ESI-TOF készüléken. Az adatgyűjtés a BioTOF v. 2.2., az adatfeldolgozás az XmassBioTOF v. 6.0.0. szoftverrel történt. A ligandumok tömegspektrumait pozitív módban, míg a komplexeket töltéstől függően pozitív vagy negatív módban rögzítették.

3.9. DFT számítások

Az utóbbi 30 év talán egyik legdinamikusabban fejlődő kvantumkémiai módszere a sűrűségfunkcionál-elmélet (DFT), amely nagy népszerűségnek örvend viszonylag csekély számítási igénye miatt is. A módszer alappillére az elektronsűrűség. A Hohenberg-Kohn elmélet¹⁶⁴ alapján egy funkcionál minimalizálásával a rendszer teljes energiája (E) és N elektron- vagy töltéssűrűsége (ρ) egy külső potenciál (v_{ext}) jelenlétében megadható az alábbi egyenlettel:

$$E[\rho] = F[\rho] + \int v_{ext}(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r})d\mathbf{r} \quad (3.9.1)$$

A Kohn-Sham elmélet¹⁶⁵ szerint a töltéssűrűség kifejezhető N ortonormált pálya függvényeként:

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_p n_p |\psi_p(\mathbf{r})|^2 \quad (3.9.2)$$

amelyben az n_p betöltöttség 0 vagy 1 és az általános (v_{ext} -től független) funkcionál:

$$F[\rho] = -\frac{1}{2} \sum_p n_p \langle \psi_p | \nabla^2 | \psi_p \rangle + E_H[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (3.9.3)$$

amelyben a Hartree, vagy klasszikus Coulomb energia megadható

$$E_H[\rho] = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \quad (3.9.4)$$

alakban.

Az $E_{xc}[\rho]$ pedig a kicserélődési-korrelációs energia funkcionál. Az energia minimálása megadja a Kohn-Sham egyenletet:

$$\widehat{h}_s[\rho]\psi_p(\mathbf{r}) = \epsilon_p \psi_p(\mathbf{r}) \quad (3.9.5)$$

ahol az egy-részecske Hamilton-operátora:

$$\widehat{h}_s[\rho] = -\frac{1}{2}\nabla^2 + v_{ext}(\mathbf{r}) + v_H[\rho](\mathbf{r}) + v_{xc}[\rho](\mathbf{r}) \quad (3.9.6)$$

Itt a Hartree-energia:

$$v_H[\rho](\mathbf{r}_1) = \frac{\delta E_H[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r}_1)} = \int \frac{\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_2 \quad (3.9.7)$$

és az xc-energia:

$$v_{xc}[\rho](\mathbf{r}) = \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r})} \quad (3.9.8)$$

Mivel az xc funkcionál egzakt formáját nem ismerjük, a gyakorlatban csak közelítjük, amely után az egyenlet ön-konzisztens módon megoldható¹⁶⁶.

A DFT számítások során minden egyes komplex szerkezetét teljes geometriaoptimalással határoztuk meg, amelyet frekvencia analízis követett. B3LYP¹⁶⁷ hibrid kicserélődési-korrelációs funkcionált alkalmaztunk, a bázisfüggvény pedig palládium(II) és kadmium(II) esetén LANL2DZ¹⁶⁸ dupla- ζ , míg nikkel(II), réz(II) és a nemfémes elemeknél a Pople-féle polarizációs függvényekkel kiegészített tripla- ζ típusú 6-311g(d) báziskészlet volt¹⁶⁹. A számítások során a fent leírt elméleti szinten meghatároztuk a gázfázisú komplexek szerkezetét, majd az oldószerhatást is figyelembe véve a PCM modell^{170,171} segítségével újraoptimaltunk a komplexek geometriáját, amelyet ismételt frekvenciaanalízis követett. A PCM modell alkalmazása során a molekulát egy dielektromos állandóval ellátott polarizálható közeggel (jelen esetben víz, $\epsilon_r = 78,3553$) vesszük körül.

TD-DFT¹⁷² segítségével meghatároztuk az egyes palládium(II)-komplexek ECD spektrumát. A számolások során a Handy és munkatársai által kidolgozott távolságszeparált CAM-B3LYP¹⁷³ funkcionált, illetve a hibrid BH&HLYP¹⁷⁴ funkcionált alkalmaztunk a fent leírt báziskészlet felhasználásával, oldószermodell figyelembevételével. Az ECD spektrumok generálása az elektronátmenetek ismeretében a Multiwfn¹⁷⁵ szoftver segítségével történt, ahol az átmeneteket reprezentáló Gauss görbék félértékszélességét 0,6 eV-nak definiáltuk a következő egyenlet felhasználásával:

$$\Delta\epsilon(E) = \left(\frac{2\Delta E}{2,296} \cdot 10^{-39} \sqrt{\pi} \sigma \right) \cdot R \exp\{-[2(E - \Delta E)/\sigma]^2\} \quad (3.9.9)$$

ahol ΔE az elektronátmenet energiája, σ pedig a Gauss görbe félértékszélessége (0,6 eV).

A nikkel(II)ionok egyszerű peptidekkel alkotott komplexeinek elméleti vizsgálata, illetve módszerjavaslat UV-vis spektrumok számolására az értekezés részét képezi, így az ott felhasznált funkcionálokat és báziskészleteket a 4.1. alfejezetben részletezzük.

A DFT számolások során Gaussian 09.¹⁷⁶ szoftvert használtunk, amely elérhető a Nemzeti Információs Infrastruktúra Fejlesztési Program szuperszámítógépein.

4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKEKELÉSÜK

4.1. Kistagszámú peptidek nikkel(II)ionokkal alkotott komplexeik szerkezeti jellemzőinek elméleti vizsgálata

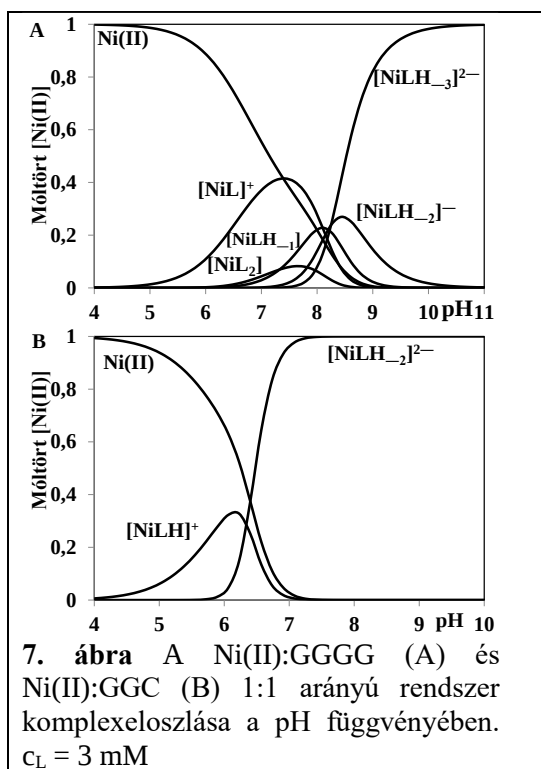
A sűrűségfunktional-elmélet (DFT) ma már széles körben alkalmazott elméleti kémiai technika különböző fémiont és ligandumot tartalmazó rendszerek vizsgálata során. Az ebben a témában fémion-peptid kölcsönhatásokkal foglalkozó cikkek száma viszonylag csekély, így munkánk első felében különböző, egyszerű peptidek nikkel(II)ionokkal alkotott komplexeit kívántuk DFT segítségével részletesen tanulmányozni, illetve TD-DFT segítségével számolni az adott komplexek UV-látható spektrumát amiatt, hogy megismerjük és javaslatot tegyünk arra, hogy milyen funkcionálok alkalmazása mellett kapjuk a legjobb egyezést a mért és számolt spektrumokkal. Ehhez tehát olyan rendszerek kiválasztása indokolt, amely mind oldategyensúlyi, mind pedig spektroszkópai aspektusból már széleskörűen jellemzett. Ezek alapján négy egyszerű oligopeptid (glicil-glicil-glicin (GGG), glicil-glicil-glicil-glicin (GGGG), glicil-glicil-hisztidin (GGH) és glicil-glicil-cisztein (GGC)) nikkel(II)ionokkal alkotott síknégyszetes elrendeződésű komplexeinek geometriaoptimalizálását végeztük el mind gáz, mind pedig oldatfázisban (víz) PCM oldószermodell alkalmazása mellett.

Az irodalomból már ismertek ezen ligandumok nikkel(II)-komplexeinek stabilitási állandói, amelyet a 2. táblázat foglal össze.

2. táblázat A vizsgált ligandumok nikkel(II)ionokkal képzett komplexeinek stabilitási állandói ($\log\beta_{\text{pqr}}$).

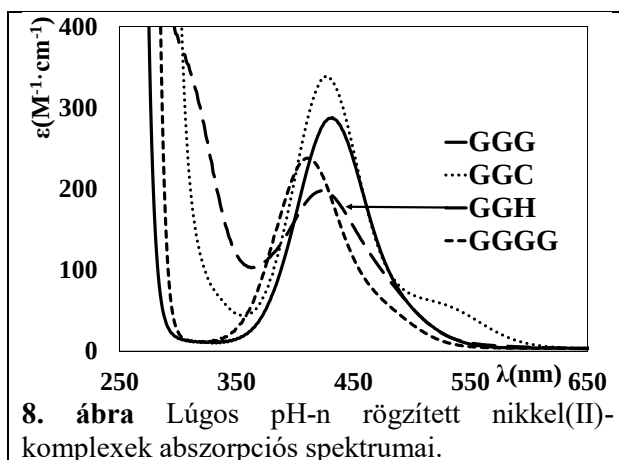
Részecske	GGG ¹⁷⁷	GGGG ¹⁷⁸	GGH ¹⁷⁹	GGC ⁴⁴
[ML] ⁺	3,75	3,65	4,76	-
[ML ₂]	6,77	6,55	-	-
[MLH] ⁺	-	-	11,33	13,67
[MLH ₋₁]	-5,45	-4,45	-	-
[MLH ₋₂] ⁻	-12,85	-12,65	-6,93	-5,36
[MLH ₋₃] ²⁻	-	-20,90	-	-

A 2. táblázat adataiból látható, hogy a komplexképződés a csak glicint tartalmazó oligopeptidek esetén különbözik a harmadik helyen hisztidint vagy ciszteint tartalmazó peptidekétől. Ennek oka, hogy míg a GGG és GGGG esetén az amidnitrogének deprotonálódása lépcsőzetes és megjelennek a közbenső amidnitrogén koordinált komplexek is (MLH₋₁, vagy MLH₋₂), addig a GGC és GGH



sáv is vállként ráépül a spektrumokra. Így például a nikkel(II):GGC MLH₂ komplexében a 427 nm-nél megjelenő nagy intenzitású átmenet mellett 531 nm-nél egy kisebb moláris abszorbanciájú sáv is megjelenik, amely egyértelműen mutatja a tiolátcsoport jelenlétét a koordinációs szférában. A vizsgált komplexek abszorpciós maximumainak helyét a 3. táblázat foglalja össze, kiegészítve a koordináló donorcsoportokkal.

Ezen komplexek geometriaoptimalizálását végeztük el hét különböző funkcionál alkalmazásával. Ezek a B3LYP¹⁶⁷ és B3P86¹⁸⁰ nemlokális vagy gradienssel korrigált funkcionálok, a CAM-B3LYP¹⁷³, PBE0¹⁸¹, M06¹⁸², HSE06¹⁸³ távolság-szeparált korrelációs funkcionálok, illetve a BHandHLYP¹⁷⁴ „half-and-half” típusú funkcionál volt.



ligandumoknál az amidnitrogén deprotonálódás és koordináció kooperatív módon játszódik le. Ez a trend az eloszlási görbéken is jól látható, amelyet a 7. ábra mutat be.

Mi a lúgos pH tartományban képződő síknégyszetes, telített koordinációs szférájú komplexekre fókuszáltunk és ezek UV-látható spektrumait rögzítettük. Ezen spektrumokat a 8. ábra tartalmazza. A spektrumokból jól látható a 400 nm környékén jelentkező nagy intenzitású elnyelési sáv, amely a síknégyszetes nikkel(II)komplexekre jellemző. Ugyanakkor a koordinálódó donorcsoportok minősége jelentősen befolyásolja az elnyelési sáv maximumának a helyét, illetve több esetben egy másik, kisebb intenzitású

3. táblázat A nikkel(II)-peptid komplexek abszorpciós maximumának értékei.

Komplex	Koordinálódó donoratomok	$\lambda_{\max}$
Ni(II):GGG MLH ₂	NH ₂ , N ⁻ , N ⁻ , COO ⁻	433
Ni(II):GGGG MLH ₃	NH ₂ , N ⁻ , N ⁻ , N ⁻	411 (487)
Ni(II):GGH MLH ₂	NH ₂ , N ⁻ , N ⁻ , N _{im}	425 (307)
Ni(II):GGC MLH ₂	NH ₂ , N ⁻ , N ⁻ , S ⁻	427 (527)

Az optimalálás során def2-TZVP¹⁸⁴ báziskészletet alkalmaztunk. Általánosan elmondható, hogy a különböző funkcionálok alkalmazása nincs jelentős hatással egy adott komplex kötéshossz, illetve kötésszög értékére és a Ni(II):GGGG rendszerben jó egyezést kaptunk az egykristály-diffrakcióból származó eredményekkel is (4. táblázat). Ez az egyezés ugyanakkor bizonyos fenntartással kezelhető, a két technika jelentős különbsége miatt.

4. táblázat A Ni(II):GGGG MLH₃ komplexének kötéstávolság és kötésszög értékei.

Funkcionál	Kötéstávolság (pm)				Kötésszög (°)		
	Ni(II)- NH ₂	Ni(II)- N ₁ ⁻	Ni(II)- N ₂ ⁻	Ni(II)- N ₃ ⁻	NH ₂ - Ni(II)- N ₁ ⁻	N ₁ ⁻ - Ni(II)- N ₂ ⁻	N ₂ ⁻ - Ni(II)- N ₃ ⁻
B3LYP	196	185	184	190	85,4	85,3	85,7
B3P86	193	183	182	188	85,8	85,5	85,8
CAM- B3LYP	194	184	182	189	85,6	85,3	85,7
M06	195	184	183	189	85,9	85,2	85,8
PBE0	193	183	182	187	86,0	85,4	85,9
HSE06	193	184	182	189	86,0	85,4	86,0
BHandHLYP	194	185	184	191	85,3	85,0	85,5
Kísérleti 185	193	184	183	187	85,8	84,5	86,8

Amiatt, hogy elkülöníthessük, az egyes funkcionálok okozta, a geometriaoptimalálás során jelentkező kismértékű különbségeket a B3P86/Def2-TZVP elméleti szinten számolt szerkezeteket használtuk fel az UV-látható spektrumok számolása során. Ennek oka, hogy a B3P86 funkcionált az irodalomban széles körűen alkalmazzák az első átmenetifém-sor komplexeinek geometriaoptimalálására¹⁸⁰. Kiegészítve a def2-TZVP báziskészlettel, egy geometriaoptimalásra jól alkalmazható, robosztus módszer állhat rendelkezésünkre. Ennek „ára” ugyanakkor az, hogy a tripla- ζ típusú

polarizációs báziskészlet jelentősen növeli a számítási igényt, egy klasszikus polarizációs függvénnyel kiegészített dupla- ζ báziskészlethez képest¹⁸⁰.

TD-DFT segítségével összesen kilenc funkcionállal (B3LYP, B3P86, CAM-B3LYP, M06, M06-2X¹⁸², BHandHLYP, HSE06, PBE0, mPW1PW91¹⁸⁶) és két báziskészlettel (LANL2DZ és Def2-TZVP) számítottuk az egyes komplexek UV-látható spektrumát. Az egyes funkcionálokkal és a két báziskészlettel kapott abszorpciós maximumok értékeit az 5. és 6. táblázat tartalmazza, kiegészítve a kísérleti spektrumból származókkal, illetve az eltérést jellemző relatív hibával, amely a 4.1.1. egyenlet alapján adható meg.

$$\text{Relatív hiba} = \frac{\lambda_{\text{mért}} - \lambda_{\text{számolt}}}{\lambda_{\text{számolt}}} * 100 \quad (4.1.1)$$

5. táblázat A vizsgált nikkell(II)-komplexek különböző funkcionálokkal számolt abszorpciós spektrumának maximumai def2-TZVP báziskészlet alkalmazása mellett.

Báziskészlet		def2-TZVP			
Komplex	Funkcionál	λ_{max}	Relatív hiba	λ_{max} (váll)	Relatív hiba
Ni(II):GGC MLH₋₂	B3LYP	414	3,5	519	1,5
	B3P86	417	2,8	525	0,4
	CAM-B3LYP	416	3,0	525	0,4
	HSE06	431	-0,5	541	-2,7
	PBE0	432	-0,7	542	-2,8
	mPW1PW91	429	0,0	539	-2,3
	BHandHLYP	491	-14,5	662	-25,6
	M06	493	-14,9	613	-16,3
	M06-2X	594	-38,5	600	-13,9
	Kísérleti	429		527	
Ni(II):GGG MLH₋₂	B3LYP	409	5,5		
	B3P86	413	4,6		
	CAM-B3LYP	413	4,6		
	HSE06	427	1,4		
	PBE0	428	1,2		
	mPW1PW91	424	2,1		
	BHandHLYP	484	-11,8		
	M06	495	-14,3		
	M06-2X	592	-36,7		
	Kísérleti	433			

A tiolátcsoport hatása oldalláncban egyéb donorcsoportot tartalmazó peptidek komplexképző sajátságaira

Ni(II):GGGG MLH₋₃	B3LYP	382	7,1	498	-2,2
	B3P86	385	6,3	492	-1,0
	CAM- B3LYP	385	6,3	477	2,1
	HSE06	397	3,4	498	-2,2
	PBE0	398	3,2	488	-0,2
	mPW1PW91	396	3,6	489	-0,4
	BHandHLYP	450	-9,5	586	-7,6
	M06	455	-10,7	581	-19,3
	M06-2X	538	-30,9		
	Kísérleti	411		487	
Ni(II):GGH MLH₋₂	B3LYP	409	3,8	522	
	B3P86	413	2,8	529	
	CAM- B3LYP	414	2,6	533	
	HSE06	428	-0,7	545	
	PBE0	428	-0,7	546	
	mPW1PW91	426	-0,2	543	
	BHandHLYP	489	-15,1	672	
	M06	496	-16,7	608	
	M06-2X	593	-39,5	803	
	Kísérleti	425			

6. táblázat A vizsgált nikkell(II)-komplexek különböző funkcionálokkal számolt abszorpciós spektrumának maximumai LANL2DZ báziskészlet alkalmazása mellett.

Báziskészlet		LANL2DZ			
Komplex	Funkcionál	$\lambda_{\max}$	Relatív hiba	$\lambda_{\max}$ (váll)	Relatív hiba
Ni(II):GGC MLH₋₂	B3LYP	392	8,6	502	4,7
	B3P86	399	7,0	512	2,8
	CAM-B3LYP	395	7,9	520	1,3
	HSE06	417	2,8	537	-1,9
	PBE0	416	3,0	537	-1,9
	mPW1PW91	411	4,2	532	-0,9
	BHandHLYP	466	-8,6	646	-22,6
	M06	522	-21,7	633	-20,1
	M06-2X			671	-27,3
	Kísérleti	429		527	

Ni(II):GGG MLH₋₂	B3LYP	387	10,6		
	B3P86	396	8,5		
	CAM-B3LYP	391	9,7	520	
	HSE06	415	4,2	535	
	PBE0	414	4,4		
	mPW1PW91	407	6,0	530	
	BHandHLYP	461	-6,5		
	M06	526	-21,5		
	M06-2X	711	-64,2		
	Kísérleti	433			
Ni(II):GGGG MLH₋₃	B3LYP	363	11,7	481	1,2
	B3P86	397	3,4	455	6,6
	CAM-B3LYP	367	10,7	471	3,3
	HSE06	386	6,1	492	-1,0
	PBE0	385	6,3	507	-4,1
	mPW1PW91	381	7,3	492	-1,0
	BHandHLYP	432	-5,1		
	M06	484	-17,8	611	-25,5
	M06-2X	614	-49,4		
	Kísérleti	411		487	
Ni(II):GGH MLH₋₂	B3LYP	389	8,5	504	
	B3P86	397	6,6	510	
	CAM-B3LYP	393	7,5	526	
	HSE06	416	2,1	541	
	PBE0	415	2,4	542	
	mPW1PW91	410	3,5	537	
	BHandHLYP	468	-10,1	669	
	M06	539	-26,8		
	M06-2X	682	-60,5		
	Kísérleti	425			

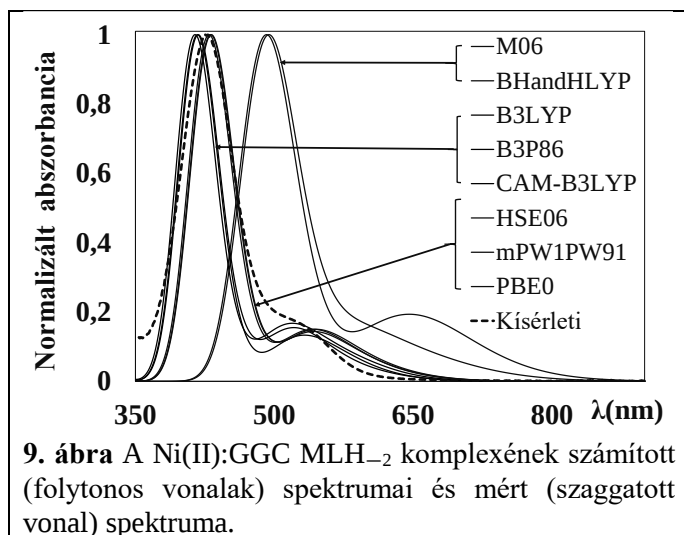
Az 5. és 6. táblázat alapján az alábbi megállapításokat tehetjük:

(i) A vizsgált funkcionálok három csoportba sorolhatók annak megfelelően, hogy milyen relatív hibával jellemzik a 400 nm környékén jelentkező d-d átmenetet. Ennek megfelelően a B3LYP, B3P86 és CAM-B3LYP funkcionálok jól közelítik a kísérleti spektrum abszorpciós maximumának megfelelő hullámhossz értéket, míg a BHandHLYP, M06 és M06-2X funkcionálok esetén jelentős mértékű (általában 10%

feletti) kék eltolódást tapasztalunk a számított spektrumokban, így ezek kevésbé jól alkalmazhatóak a vizsgált rendszerekben. Egy harmadik csoportot a HSE06, PBE0 és mPW1PW91 funkcionálok adnak, amelyek igen jó egyezésben, 1-2%-os relatív hibával számítják az abszorpciós maximum helyét def2-TZVP báziskészlet alkalmazása mellett. Ennek oka lehet, hogy a három funkcionál nagy hasonlóságot mutat egymással, illetve a PBE0 és mPW1PW91 funkcionálok mindegyike 25% Hartree-Fock kicserélődési tagot tartalmaznak.

(ii) A LANL2DZ báziskészlet alkalmazása habár jelentősen csökkentette a számítási időt, az egyes átmenetekhez tartozó relatív hibák értékei nagyobbak adódtak. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy például a Ni(II):GGC MLH₂ komplexe esetén a kisebb intenzitású 527 nm-nél jelentkező kisebb oszcillátorerősségű átmenet a CAM-B3LYP, HSE06, PBE0 és mPW1PW91 funkcionálokkal egyaránt jobb relatív hibával volt számítható.

(iii) Érdekes tény, hogy az irodalomban az M06 funkcionált általában egy közbenső funkcionálnak tekintik abból a szempontból, hogy a számolt abszorpciós maximum helye a B3 funkcionálsalád, illetve a PBE0 típusú funkcionálok által számított értékek közé esik. Mi ezt a számításaink során nem tapasztaltuk, ugyanakkor az egyértelműen kijelenthető, hogy a 20-30% Hartree-Fock kicserélődést tartalmazó funkcionálok képesek a legjobb relatív hibával számítani az UV-látható spektrumokat. Ez jól megfelel az irodalomban is leírt tapasztalatoknak.



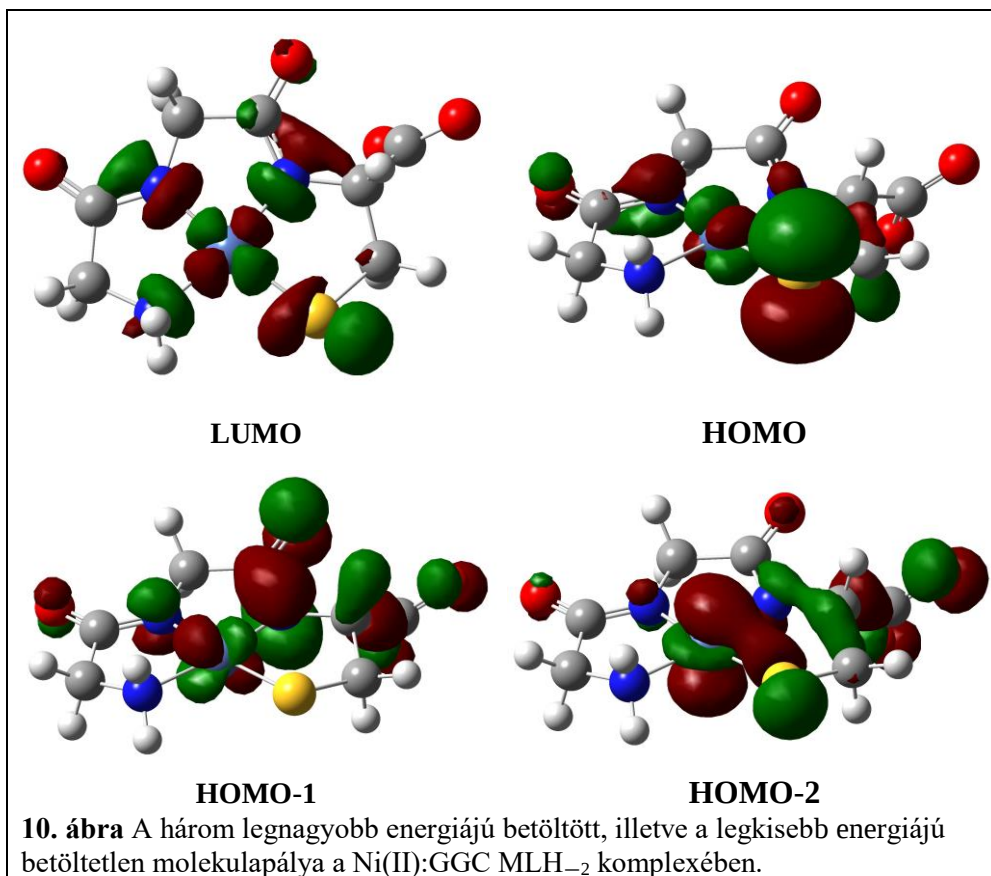
Egy reprezentatív példa a 9. ábra, amely a nikkel(II):GGC rendszer MLH₂ komplexének mért és számolt spektrumait tartalmazza def2-TZVP báziskészlet alkalmazása mellett. Jól látható a kísérleti és számított spektrumok jó egyezése az M06 és BHandHLYP funkcionálok kivételével. Ezen túlmenően a korábban

említett 530 nm-nél jelentkező váll a kísérleti spektrumban is jól értelmezhető, ugyanis ott egy kisebb oszcillátorerősségű átmenet valósul meg, amelyet a számított spektrumok egyértelműen mutatnak. Az ábra az M06-2X funkcionállal számolt spektrumot nem tartalmazza, annak nagy, kb. 40%-os relatív hibája miatt. Mivel az mPW1PW91 funkcionállal tudtuk a legpontosabban közelíteni a kísérleti

spektrumokat, elvégeztük a komplexek látható tartományban jelentkező átmeneteinek analízisét. Ezek eredményeit a 7. táblázat foglalja össze, kiegészítve a 10. ábrával, amely a Ni(II):GGC MLH₋₂ komplexében az elektronsűrűség eloszlását szemlélteti az egyes molekulapályákon.

7. táblázat A látható tartományban jelentkező átmenetek oszcillátorerőssége és az átmenetet jellemző molekulapályák hozzájárulása.

Komplex	Átmenethez tartozó hullámhossz (λ_{calc})	Oszcillátorerősség (f)	Molekulapálya hozzájárulása
Ni(II):GGC MLH ₋₂	598	0,0001	HOMO→LUMO (71%)
	539	0,0003	H-1→LUMO (57%)
	531	0,0001	H-2→LUMO (55%)
			H-3→LUMO(34%)
	429	0,0029	H-12→LUMO (43%) H-10→LUMO (22%)
Ni(II):GGG MLH ₋₂	546	0,0001	HOMO→LUMO (54%) H-1→LUMO (25%)
	512	0,0001	H-1→LUMO (40%) H-2→LUMO (25%)
	511	0,0001	H-2→LUMO (75%)
	425	0,0041	H-7→LUMO (44%)
Ni(II):GGGG MLH ₋₃	517	0,0001	HOMO→LUMO (72%)
	475	0,0001	H-1→LUMO (65%)
	468	0,0002	H-2→LUMO (93%)
	396	0,0024	H-11→LUMO (50%)
Ni(II):GGH MLH ₋₂	543	0,0001	HOMO→LUMO (30%) H-1→LUMO (29%) H-9→LUMO (26%)
	539	0,0002	H-1→LUMO (31%)
	535	0,0002	H-4→LUMO (61%) H-3→LUMO (22%)
	425	0,0016	H-10→LUMO (24%) H-11→LUMO (51%)



A 10. ábra, illetve a pályaanalízis alapján elmondható, hogy a HOMO→LUMO átmenet során a fémcentrumon az elektronsűrűség a d_{yz} pályáról a $d_{x^2-y^2}$ pályára, míg a HOMO-1→LUMO átmenetben a d_{xz} pályáról a $d_{x^2-y^2}$ pályára, a HOMO-2→LUMO átmenet esetén pedig a d_z^2 pályáról a $d_{x^2-y^2}$ pályára kerül.

4.2. Ciszteint, illetve aszparaginsavat és ciszteint is tartalmazó peptidek komplexképző sajátságai

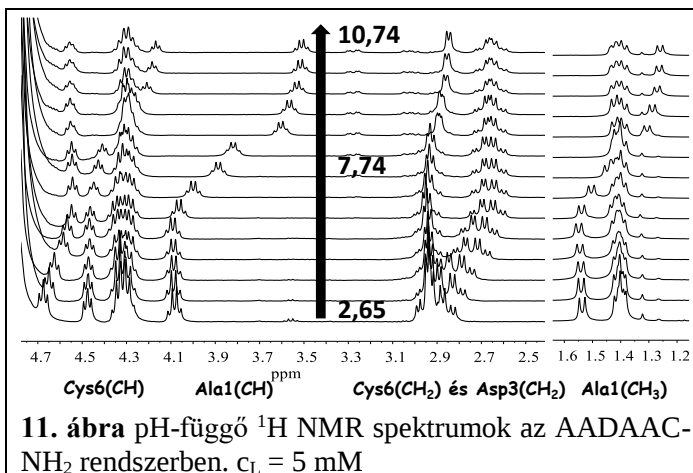
4.2.1. A ligandumok deprotonálódási makro- és mikrofolyamatai

A peptidek pH-potenciometria segítségével meghatározott makroszkopikus deprotonálódási állandóit a 8. táblázat tartalmazza, kiegészítve a pH-függő ^1H NMR spektrumok egyes csoportjainak eltolódása alapján számolt mikroszkopikus egyensúlyi állandók értékeivel.

8. táblázat A csak ciszteint, valamint aszparaginsavat és ciszteint tartalmazó peptidek deprotonálódási állandói ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,2\text{ M KCl}$).

	AAASSC-NH ₂	Ac-DAAC-NH ₂	AADAAC-NH ₂	ADAAAC-NH ₂
pK ₁	7,78(1)	3,80(2)	3,71(2)	3,55(2)
pK ₂	8,73(1)	8,87(1)	7,79(2)	7,82(2)
pK ₃			8,88(1)	8,90(1)
k ₁			8,53	8,45
k ₂			7,88	7,93
k ₃			8,79	8,76
k ₄			8,14	8,33

Míg az ADAAAC-NH₂ és AADAAC-NH₂ esetén három, addig az AAASSC-NH₂ és a terminálisan védett Ac-DAAC-NH₂ peptidnél két makroszkopikus deprotonálódási állandó határozható meg. Összevetve korábban vizsgált rendszerekkel az általunk tanulmányozott ligandumokat, egyértelmű, hogy a legkisebb pK érték az AAASSC-NH₂ kivételével a β -karboxilátcsoport deprotonálódását jellemző érték. Ezt a pH függő ^1H NMR spektrumok is alátámasztják, ugyanis az aszparaginsav β helyzetű hidrogénjeinek kémiai eltolódása 3-5 pH tartományban következik be, e felett helyzete változatlan. A következő két deprotonálódás ennek megfelelően a terminális ammóniumcsoport, illetve a C-terminális cisztein tiolcsoportjának deprotonálódásához köthető. Ez a két folyamat ugyanakkor átfed egymással, így a

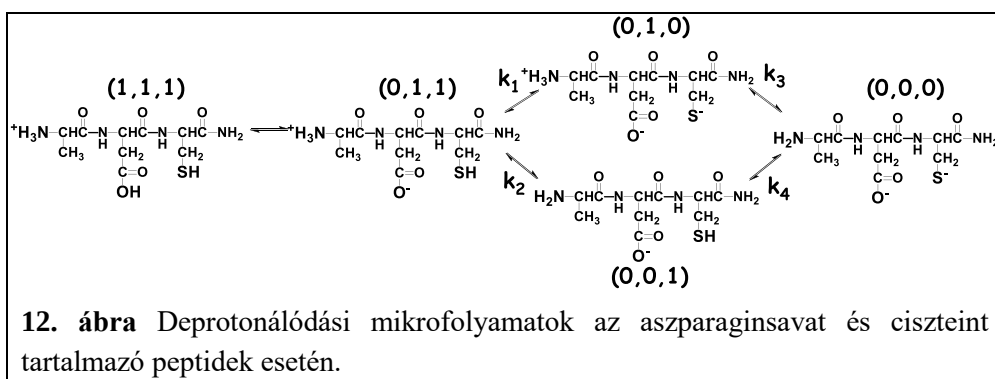


11. ábra pH-függő ^1H NMR spektrumok az AADAAC-NH₂ rendszerben. $C_L = 5\text{ mM}$

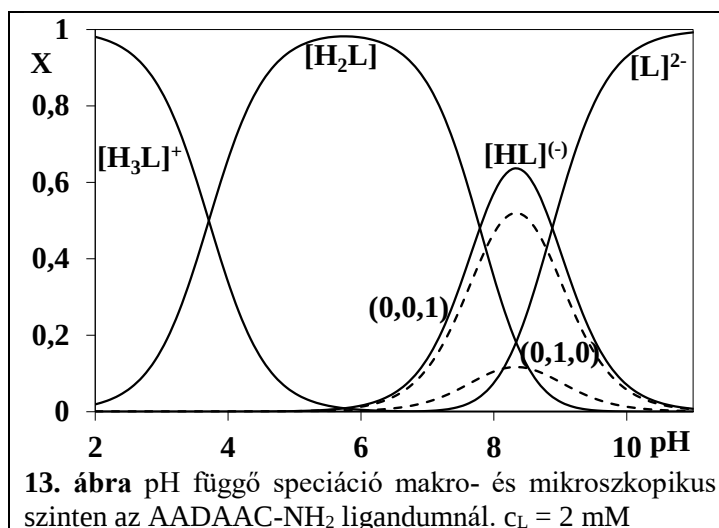
rendszer mikrofolyamatait az irodalomban megtalálható módon¹⁸⁷, az ^1H NMR

spektrumok terminális alanin metil és metin protonjainak és a cisztein β helyzetű hidrogénjeinek pH függéséből határoztuk meg (11. ábra).

Ezen mikrofolyamatokat vázlatosan mutatja be a 12. ábra. Ennek megfelelően a [HL] összetételű forma két izomernek feleltethető meg, míg a (0,1,0) izomerben a terminális ammóniumcsoport, addig a (0,0,1) esetén a cisztein tiolátsoportja protonált. Eredményeink alapján az AADAAC-NH₂ peptid [HL] formájában a



cisztein tiolátsoportja 82%-ban, míg az AADAAC-NH₂ ligandum esetén 77%-ban protonált. Ezt a fajta hatást, vagyis a terminális aminocsoport és tiolcsoport deprotonálódásának átfedését korábban, más ciszteint tartalmazó dipeptidek esetén is leírták¹⁸⁸. A különböző protonáltságú izomerek pH függő speciációját az AADAAC-NH₂ ligandumnál a 13. ábra mutatja be.



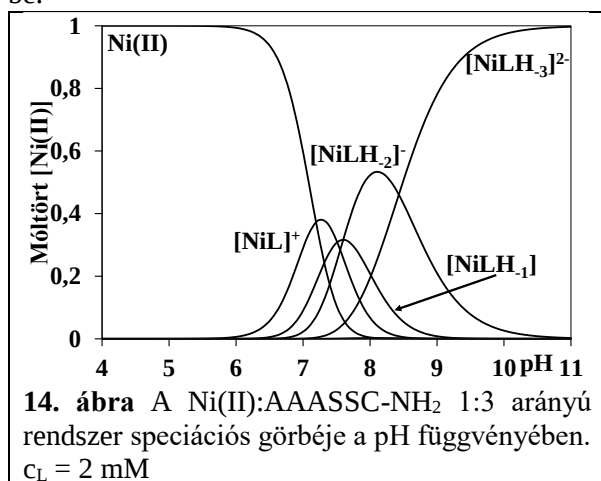
4.2.2. Az AAASSC-NH₂ peptid nikkel(II)-, cink(II)- és kadmium(II)-komplexei

A ligandum általunk vizsgált fémionokkal alkotott komplexeinek stabilitási állandóját a 9. táblázat tartalmazza.

9. táblázat Az AAASSC-NH₂ Ni(II)-, Zn(II)- és Cd(II)-ionokkal alkotott komplexeinek képződési ($\log\beta_{\text{pqr}}$) és származtatott állandói (I = 0,2 M, T = 298 K).

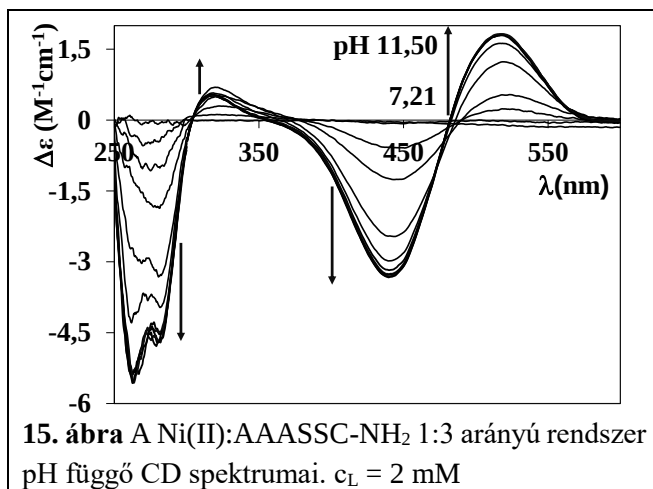
Részecske	Ni(II)	Zn(II)	Cd(II)
[MLH] ²⁺		12,8(1)	13,96(7)
[ML] ⁺	4,85(6)	5,97(4)	7,34(6)
[MLH ₁]	-2,66(7)	-1,91(5)	-3,4(3)
[MLH ₂] ⁻	-10,26(5)	-11,24(6)	
[MLH ₃] ²⁻	-18,69(4)		
pK(MLH/ML)		6,81	6,62
pK(ML/MLH ₁)	7,51	7,88	10,74
pK(MLH ₁ /MLH ₂)	7,60	9,33	
pK(MLH ₂ /MLH ₃)	8,43		

A nikkel(II)ionok pH-függő speciációs görbáját a pH függvényében a 14. ábra mutatja be.



Az ábra alapján látható, hogy a komplexképződés pH 6,5 felett indul az ML összetételű komplex megjelenésével. Ugyanakkor nem zárható ki egy MLH összetételű komplex jelenléte sem, amelyben hasonlóan más, N-terminálisan szabad peptidekhez, (NH₂,CO) kötismód jelenik meg. A titrálási görbék illesztésekor mi ezt a komplexet nem tudtuk

leírni, ugyanakkor kis mennyiségű (10% alatti) jelenléte feltételezhető. Az ML összetételű komplexben a ligandum kétfogú koordinációja valósul meg a terminális aminosocsoport, illetve a tiolátsocsoport kötődésével. Szerkezetét tekintve a komplex oktaéderes geometriájú, amelyet a kis intenzitású abszorpciós spektrum és a CD aktivitás hiánya is mutat. CD aktivitást pH 7,2 felett tapasztalhatunk, amely az amidnitrogének deprotonálódásával és koordinációjával magyarázható. A CD spektrumban 520 nm-nél jelentkező pozitív Cotton-effektus, illetve a 320 nm-nél



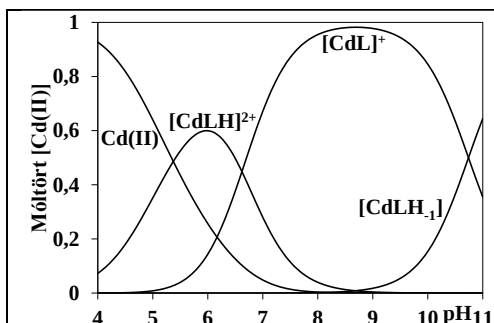
jelentkező S→nikkel(II) töltésviteltel sáv alapján az amidnitrogének belépése a koordinációs szférába a peptid C-terminális régiója felől indul. A spektrum pH 9,8 után további intenzitásváltozást nem mutat, jelezve az MLH₋₃ forma kizárólagosságát. Ezen sztöchiometriához ugyanakkor kétfajta izomer szerkezet feleltethető meg,

egyik esetben az N-terminus felől indul az amidnitrogének deprotonálódása, míg a másik lehetőség a C-terminus felőli tiolátcsoport kötődése által, aminek megfelelően (N⁻,N⁻,N⁻,S⁻) kötésmódú komplex alakul ki. A CD spektroszkópiás adatok ugyanakkor egyértelműen jelzik az utóbbi részecske kizárólagosságát. Az 1:3 arányú rendszer pH-függő CD spektrumát az 15. ábra mutatja be. Maga a CD spektrum jó felbontású, így az MLH₋₃ spektrális paraméterei az egyes átmenetek pontos asszignációjával megadhatóak, amelyet a 10. táblázatban foglaltunk össze.

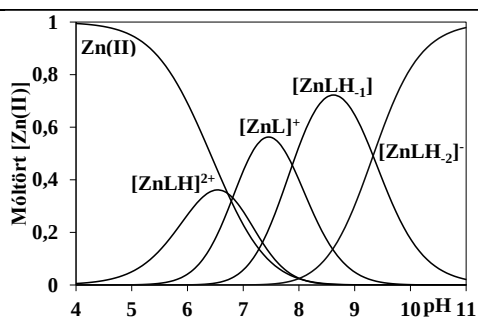
10. táblázat A NiLH₋₃ összetételű komplex CD spektrális paraméterei.

	λ (nm)	Δε (M ⁻¹ ·cm ⁻¹)	átmenet
NiLH ₋₃	238	+4,52	S _{oy} →Ni(II)
	261	-5,42	N ⁻ →Ni(II)
	279	-4,75	S _{ox} →Ni(II)
	319	+0,54	S _{πx} →Ni(II)
	441	-3,27	d→d
	520	+1,77	d→d

A cink(II)- és kadmium(II)ionok AAASSC-NH₂ ligandummal alkotott komplexeinek eloszlását a pH függvényében a 16. és 17. ábrák mutatják be. Az ábra alapján egyértelmű, hogy a képződő komplexek speciációja viszonylag egyszerű, az ML összetételű komplexben a ligandum kétfogú koordinációja valósul meg az amino- és tiolátcsoport kötődésével. Ez a kétfogú koordináció kadmium(II)ionok esetén széles pH tartományban uralkodó részecske megjelenését eredményezi, a cink(II)ionokat tartalmazó rendszerben ugyanakkor nem akadályozza meg a fémionhoz koordinált vízmolekula deprotonálódását és vegyes hidroxidokomplexek megjelenését. Fontos



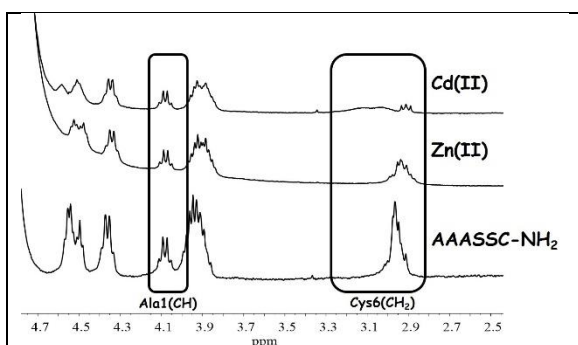
16. ábra A Cd(II):AAASSC-NH₂ 1:1 arányú rendszerben képződő komplexek eloszlása a pH függvényében. $c_L = 2 \text{ mM}$



17. ábra A Zn(II):AAASSC-NH₂ 1:1 arányú rendszerben képződő komplexek eloszlása a pH függvényében. $c_L = 2 \text{ mM}$

megjegyezni, hogy ligandumfelesleget tartalmazó minta esetén sem tudtuk kimutatni biszkomplexek képződését, amely a molekula méretével jól magyarázható.

A kérdés ezek után az, hogy a savas pH tartományban megjelenő MLH összetételű komplexben a fémiont a terminális aminocsoport, vagy a cisztein tiolátcsoportja koordinálja-e. Ennek eldöntésére az ¹H NMR spektroszkópai egyértelmű választ adott. A 18. ábra a pH 6,0-on rögzített csak ligandumot, illetve a cink(II)- és kadmium(II)ionokat is tartalmazó rendszerek ¹H NMR spektrumait mutatja be.



18. ábra Az AAASSC-NH₂, illetve a cink(II)- és kadmium(II)ionokat tartalmazó rendszer pH 6,0-on rögzített ¹H NMR spektrumai. $c_L = 5 \text{ mM}$

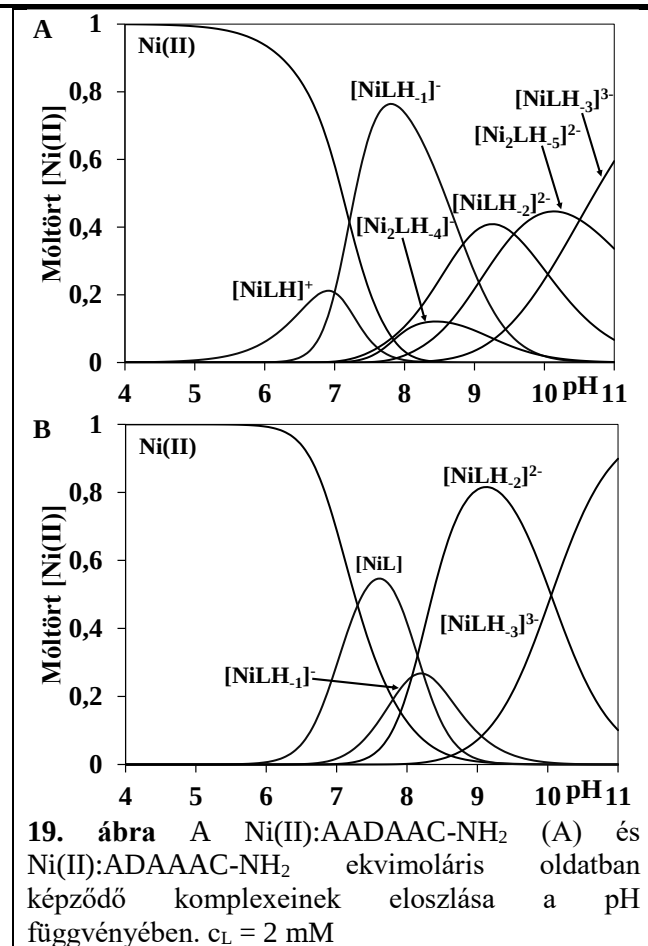
MLH összetételű komplexben a fémionok elsődleges kötőhelye a cisztein tiolátcsoportja.

A koordináció eldöntésére jó indikátorként szolgál a terminális alanin α -helyzetű hidrogénje, illetve a cisztein β hidrogénjei. Az ábra alapján egyértelmű, hogy a terminális alanin metincsoportjának kémiai eltolódása változatlan a fémeket is tartalmazó rendszerben a szabad ligandumhoz képest, míg a cisztein β hidrogénjeinek jelentős kémiai eltolódása, illetve szélesedése igazolja, hogy az

4.2.3. Az AADAAC-NH₂, ADAAAC-NH₂ és Ac-DAAC-NH₂ komplexképződési
folyamatai nikkell(II)ionokkal

11. táblázat Az AADAAC-NH₂, ADAAAC-NH₂ és Ac-DAAC-NH₂ nikkell(II)-komplexeinek stabilitási állandója ($\log\beta_{\text{pqr}}$) (T = 298 K, I = 0,2 M KCl).

Részecske	AADAAC-NH ₂	ADAAAC-NH ₂	Ac-DAAC-NH ₂
[NiLH] ⁺	12,22(6)		
[NiL] ⁺		5,27(2)	3,81(9)
[NiLH ₋₁] ⁻	-1,78(2)	-2,96(4)	
[NiLH ₋₂] ²⁻	-10,62(5)	-11,03(3)	-11,78(3)
[NiLH ₋₃] ³⁻	-20,67(4)	-21,08(4)	-20,60(4)
[Ni ₂ LH ₋₄] ⁻	-22,80(4)		
[Ni ₂ LH ₋₅] ²⁻	-31,4(1)		
[NiL ₂]			13,3 (2)



A ligandumok nikkell(II)ionokkal alkotott komplexeinek pH-potenciometriával meghatározott stabilitási állandóit az 11. táblázat tartalmazza. Az ezek alapján szerkesztett speciációs görbék a két hexapeptid esetén a 19. ábrán láthatóak. Az ábra és a táblázat alapján látható, hogy a két rendszerben hasonló sztöchiometriájú komplexek képződnek, ugyanakkor lényegi különbségek vannak ezen komplexek szerkezetei között.

A nikkell(II):AADAAC-NH₂ peptid pH függő CD spektrumai (20. ábra) alapján egyértelmű, hogy a NiLH összetételű komplex

oktaédres geometriájú és a komplexben a tiolátsoport protonált. Figyelembe véve a tiolcsoport deprotonálódásához rendelhető mikrokonsztans értékét, felírható a NiLH komplex képződését jellemző egyensúlyi állandó a 4.2.3.1. egyenletnek megfelelően:

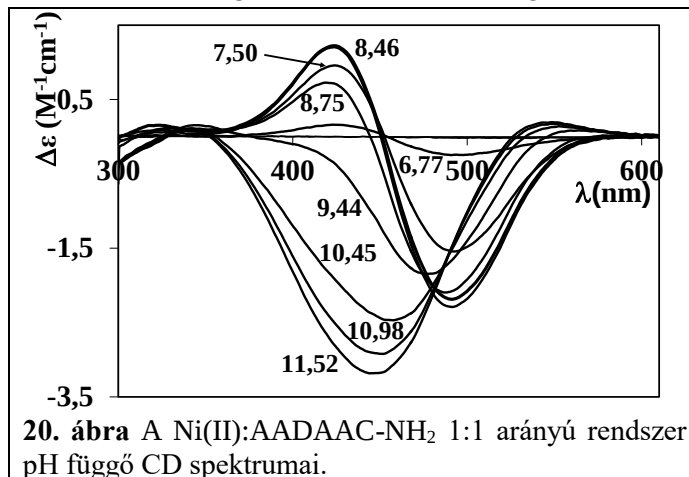
$$\log K = \log \beta(\text{NiLH}) - pK(\text{SH}) = 12,22 - 8,53 = 3,69 \quad (4.2.3.1)$$

Ez az érték jó egyezésben van a nikkell(II):glicilglicin rendszerben kialakuló NiL összetételű komplex egyensúlyi állandójának értékével ($\log K = 3,96^{177}$), amely komplexben (NH₂,CO) kötőmód valósul meg a fémionnal. Ennek megfelelően

a NiLH összetételű komplexhez a Ni(II):AADAAC-NH₂ rendszerben (NH₂,CO) szerkezet rendelhető.

A NiL komplex hiánya, illetve a titrálási görbe lefutása egyértelműen jelzi két amidnitrogén kooperatív

deprotonálódását és koordinációját a



20. ábra A Ni(II):AADAAC-NH₂ 1:1 arányú rendszer pH függő CD spektrumai.

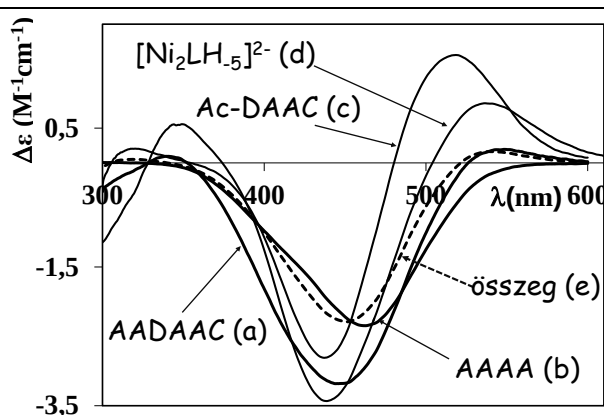
NiLH₋₁ összetételű komplex megjelenése közben. Szerkezetét tekintve a nikkell(II) az (NH₂,N⁻,N⁻,β-COO⁻) donorcsoporthoz kötődik és mind a CD spektrumból számolható paraméterek, mind pedig az UV-látható spektrum abszorpciós maximumának helye jó egyezésben vannak a korábban vizsgált, harmadik helyen aszparaginsavat tartalmazó ligandumok megegyező kötőmódú nikkell(II)-komplexeinek megfelelő értékeivel (12. táblázat).

12. táblázat (NH₂,N⁻,N⁻,β-COO⁻) koordinációs módú nikkell(II)-komplekek spektrális paraméterei.

Ligandum	UV-vis $\lambda_{\text{max}}(\epsilon)$ [nm(M ⁻¹ ·cm ⁻¹)]	CD $\lambda_{\text{max}}(\Delta\epsilon)$ [nm(M ⁻¹ ·cm ⁻¹)]	
		N ⁻ → Ni(II)	d-d
Asp ₃ ¹⁴	440 (265)	232 (-5,08)	492 (-2,60) 422 (+0,88)
Asp ₄ ¹⁴	438 (229)	234 (-12,19)	499 (-2,10) 426 (+1,55)
AADAAC-NH ₂	440 (278)	233 (-15,09)	490 (-2,29) 430 (+0,96)

pH 7,4 felett a CD spektrum karakterisztikájának megváltozása a fémion körüli koordinációs szféra átrendeződésére utal a NiLH_{-2} és NiLH_{-3} összetételű komplexek megjelenésével párhuzamosan. Mivel lúgos pH tartományban mind a tiolcsoport deprotonálódása lejátszódik, mind pedig az N-terminális felőli harmadik amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja bekövetkezhet, a tetraalanin (AAAA), illetve az Ac-DAAC-NH₂ modellvegyület nikkel(II)-komplexei jól alkalmazhatók az egyes koordinációs módok igazolására.

A 21. ábra a lúgos pH-n kialakuló NiLH_{-3} összetételű komplexek CD spektrumát tartalmazza a vizsgált AADAAC-NH₂, illetve modellként használt AAAA és Ac-DAAC-NH₂ peptidekével együtt. Az ábra alapján látható, hogy a Ni(II):AAAA CD spektrumához hasonló, ugyanakkor mégsem megegyező a vizsgált rendszer spektruma. Ennek megfelelően a $\text{Ni(II):AADAAC-NH}_2$



21. ábra A lúgos pH-n kialakuló NiLH_{-3} összetételű komplexek CD spektruma AADAAC-NH₂ (a), AAAA (b), Ac-DAAC-NH₂ (c) és a $\text{Ni}_2\text{H}_{-5}\text{L}$ AADAAC-NH₂ ligandummal alkotott komplexe (d). Az (e) spektrum (b) és (c) 75% és 25%-os összegzéséből adódik.

rendszerben koordinációs izomerek képződnek. Összevetve tehát az AAASSC-NH₂ ligandum nikkel(II)-komplexével, ahol a C-terminális egyértelműen a fémion preferált kötőhelye volt, az aszparaginsav peptidvázba történő építésével már az N-terminális régió is kedvezményezett lesz a fémion megkötése szempontjából.

A 11. táblázat stabilitási állandói alapján az Ac-DAAC-NH₂ ligandum a nikkel(II)ionokkal hasonló stabilitású NiLH_{-3} összetételű komplexet képez, mint az AADAAC-NH₂ ligandum. Ugyanakkor a terminális aminocsoport hiányában a tetrapeptid cisztein tiolátcsoportja a fémion elsődleges kötőhelye, amelyet a CD spektrumban az 520 nm-nél jelentkező pozitív Cotton-effektus is egyértelműen jelez. Ennek megfelelően a NiLH_{-3} összetételű komplexben ($\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S}^-$) kötésmód valósul meg. Ezen koordinációs módú nikkel(II)-komplex CD spektrumának, illetve a tetraalanin ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-$) kötésmódú nikkel(II)-komplexe CD spektrumának a segítségével az AADAAC-NH₂ NiLH_{-3} koordinációs izomereinek aránya megadható. Mégpedig a fémion 75%-ban az N-terminális felől koordinált ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-$), míg 25%-ban a cisztein tiolátcsoportja felől, ($\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S}^-$) kötésmóddal. Ezt a fajta összegzést a 21. ábra szintén tartalmazza. Ennek megfelelően

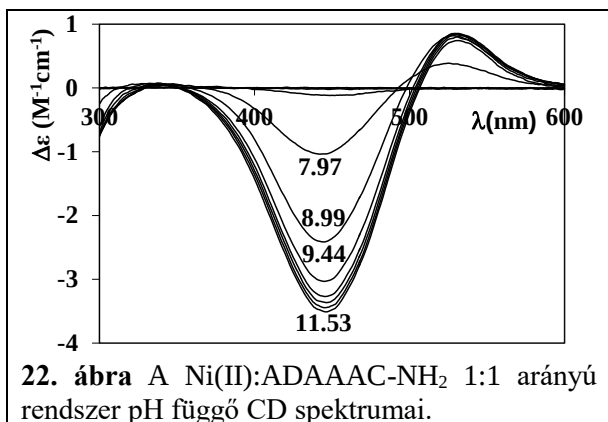
a karboxilátcsoport nem képes lúgos pH tartományban koordinálni a nikkel(II)ionokat és oligoglicinszerű kötémód alakul ki, párhuzamosan a cisztein tiolátcsoportja felől induló amidnitrogén koordinált részecske megjelenésével. Utóbbi kötémód a fémiont feleslegben tartalmazó minta esetén jelentősebb, amelyet a pozitív Cotton-effektus intenzitásnövekedése egyértelműen alátámaszt a CD spektrumban, a $\text{Ni}_2\text{LH}_{-4}$ és összetételű komplexek keletkezésének megfelelő pH tartományban. Ezen dinukleáris komplexek esetén a $\text{Ni}_2\text{LH}_{-5}$ komplexben az egyik fémion ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \beta\text{-COO}^-$) donoratomok által koordinált, míg a másik fémion a peptid C-terminális részéhez kötődik az ($\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S}^-$) donoratomok által.

Összevetve a 19. ábra speciációs görbéit, a fő különbség az, hogy a $\text{Ni(II):ADAAAC-NH}_2$ rendszerben a NiL összetételű komplex viszonylag széles pH tartományban uralkodó részecske. Az eddigi eredmények alapján a komplex összetételének két szerkezet feleltethető meg. Egyik esetben a ligandum csak az oldalláncokon keresztül ($\text{NH}_2, \beta\text{-COO}^-, \text{S}^-$) koordinálódik makrokelát szerkezetű komplexet kialakítva, addig a másik lehetőség az (5,6)-tagú csatolt ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \beta\text{-COO}^-$) kelátrendszer kialakulása, amelyben a C-terminális cisztein tiolátcsoportja protonált. Utóbbi koordinációs mód létjogosultságát két tényező is alátámasztja:

- (i) Az Ac-DAAC-NH_2 és AADAAC-NH_2 rendszerek vizsgálatából származó eredmények egyértelműen mutatják, hogy a tiolátcsoport koordinációja nem következik be csak pH 7,5 felett.
- (ii) A kis intenzitású UV-vis spektrum és a mérhető CD effektus hiánya alátámasztja, hogy a NiL komplex oktaéderes összetételű, amely jellemző az olyan nikkel(II)-dipeptidekkel alkotott komplexeire, amelyeknél a koordinációs szférában egy amidnitrogén található.

Ez az eredmény jó összhangban van az irodalmi tapasztalatokkal, amely szerint az Xaa-Asp-Yaa... szekvenciájú peptidekben az aszparaginsav $\beta\text{-COO}^-$ csoportjának kötődése kedvez az N-terminus felőli első amidnitrogén deprotonálódásnak és koordinációnak, míg a következőt a lúgosabb pH tartomány felé szorítja¹⁴. Ennek megfelelően az UV-vis és CD spektrumok intenzitásának jelentős növekedését pH 7,5 felett tapasztaltuk. A pozitív Cotton-effektus 530 nm környékén jelzi a tiolátcsoport koordinációját a fémionhoz. Ez az elnyelési sáv pH 9-re eléri intenzitásának maximumát, az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját jellemző d-d átmenet intenzitása ugyanakkor tovább nő, aminek megfelelően a két folyamat átfed egymással (22. ábra).

Így a NiLH_{-3} komplex szintén két koordinációs izomernek feleltethető meg a ($3\text{N}^-, \text{S}^-$) és ($\text{NH}_2, 3\text{N}^-$) donoratomok részvételével. A CD spektrumok összegzéséből a két koordinációs izomer aránya 60/40-nek adódott. Ez a különbség az AADAAC-NH_2 NiLH_{-3} összetételű komplexének izomerarányához képest jól értelmezhető.

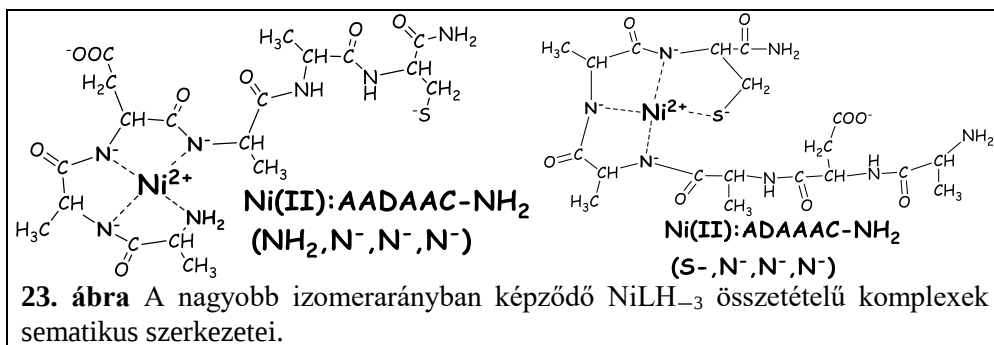


Míg az (NH₂,N⁻,N⁻,β-COO⁻) kötés mód az AADAAC-NH₂ ligandumnál a nikkell(II)ionokat az N-terminális régióban stabilizálja, ami miatt a következő amidnitrogén deprotonálódás ott kedvezményezett, addig az ADAAAC-NH₂-nél kialakuló (NH₂,N⁻,β-COO⁻) kevésbé preferált a nikkell(II)ionok

számára. Így a következő amidnitrogén deprotonálódás és koordináció olyan pH tartományban játszódik le, ahol a tiolátcsoport is képes versengeni a fémionért, növelve ezzel a C-terminális régió részvételével képződő izomer arányát. Ennek megfelelően a C-terminális régióhoz való kötődés az aszparaginsav helyzetének változtatásával szabályozható a nikkell(II)ionok esetén. Ez a hatás ugyanakkor meg kell hogy jelenjen az adott komplexek energiaértékében is. Így DFT segítségével vizsgáltuk, hogy mennyire kedvezményezett a C-terminális régióhoz való kötődés az ADAAAC-NH₂ és az AADAAC-NH₂ ligandum esetén. Ehhez elvégeztük a két (3N⁻,S⁻) koordinált nikkell(II)-komplex geometriaoptimalizálását és vizsgáltuk a komplexek egymáshoz viszonyított relatív energiáját a (4.2.3.2) egyenletnek megfelelően:

$$\Delta G_{aq}^{tot}(AADAAC) \rightarrow \Delta G_{aq}^{tot}(ADAAAC) \quad (4.2.3.2)$$

A folyamatot jellemző szabadenergia változás értéke -21,7 kJ/mol B3LYP/def2-TZVP elméleti szinten, amely egyértelműen jelzi, hogy a C-terminális régióhoz való kötődés az ADAAAC-NH₂ esetén kedvezményezett. Ez azt is jelenti, hogyha a peptid N-terminális régiójához való koordinációt vizsgáljuk, épp ellentétes hatást várunk. Ehhez szintén elvégeztük az N-terminális régióban kialakuló (NH₂,3N⁻) donoratómú nikkell(II)-komplexek geometriaoptimalizálását, majd a (4.2.3.2) egyenletnek megfelelően meghatároztuk egymáshoz viszonyított relatív energiájukat. Ez 3,9 kJ/mol értéknek adódott, vagyis az AADAAC-NH₂ esetén DFT segítségével is igazolható az N-terminális régió fémion-preferenciája. A nagyobb izomerarányban megjelenő két komplex, vagyis a Ni(II):AADAAC-NH₂ (NH₂,3N⁻), illetve a Ni(II):ADAAAC-NH₂ (3N⁻,S⁻) koordinációjú komplexek sematikus szerkezeteit a 23. ábra mutatja be.



4.2.4. Az AADAAC-NH₂, ADAAAC-NH₂ és modellvegyületük, az Ac-DAAC-NH₂ komplexképző sajátosságai cink(II)- és kadmium(II)ionokkal

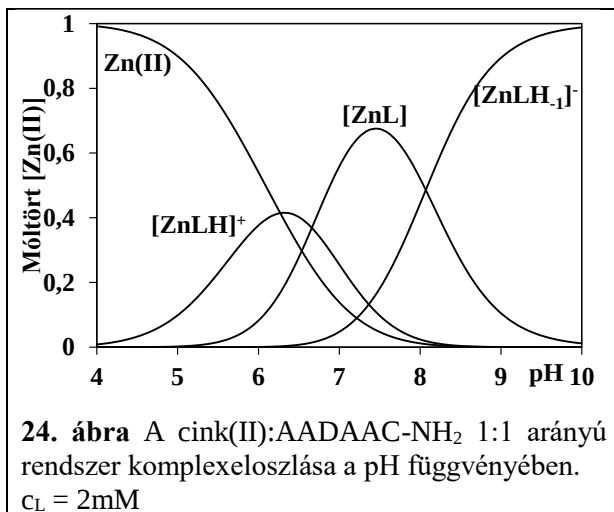
A ligandumok fenti fémionokkal alkotott komplexeinek pH-potenciometriával meghatározott képződési állandóit a 13. táblázat tartalmazza. A táblázat adataiból látható, hogy a vizsgált rendszerekben csak mononukleáris komplexek képződnek, illetve a cink(II)ionokat tartalmazó rendszerben biszkomplexek képződése csak az Ac-DAAC-NH₂ peptid esetén feltételezhető .

13. táblázat Az AADAAC-NH₂, ADAAAC-NH₂ és Ac-DAAC-NH₂ cink(II)- és kadmium(II)-komplexeinek stabilitási állandója ($\log\beta_{\text{pqr}}$) (T = 298 K, I = 0,2 M KCl/KNO₃).

Részecske	AADAAC-NH ₂	ADAAAC-NH ₂	Ac-DAAC-NH ₂
[ZnLH] ⁺	13,3(1)	13,2(1)	
[ZnL]	6,64(6)	6,37(6)	5,32(6)
[ZnLH ₋₁] ⁻	-1,43(8)	-1,14(6)	-3,3(1)
[ZnLH ₋₂] ²⁻		-11,13(8)	-13,32(6)
[ZnL ₂] ²⁻			-10,34(6)
[CdLH] ⁺	14,86(6)	14,34(2)	
[CdL]	7,97(6)	7,06(2)	6,51(5)
[CdLH ₋₁] ⁻	-1,99(7)	-2,07(2)	-3,2(1)
[CdLH ₋₂] ²⁻		-13,36(3)	
[CdL ₂ H ₂]	28,3(1)	27,87(5)	
[CdL ₂ H] ⁺	21,4(2)	20,34(5)	
[CdL ₂] ²⁻	13,3(2)	11,88(3)	11,9(1)
lg(K ₁ /K ₂) ^H	0,73	0,81	
lg(K ₁ /K ₂)	2,60	2,24	1,08

A cink(II):AADAAC-NH₂ komplexeloszlását a pH függvényében a 24. ábra mutatja be. A komplexképződés pH ~ 5-től indul a ZnLH összetételű komplex megjelenésével, amelyben az aminos csoport vagy a tiolátcsoport protonált formában van jelen. A modellként alkalmazott Ac-DAAC-NH₂ peptid ZnL összetételű komplexe segít eldönteni a koordinálódó donorcsoport minőségét. Mivel a Zn(II):Ac-DAAC-NH₂ rendszerben nem jelenik meg protonált komplex, az ML összetételű komplexben a ligandum kétfogúan a (β-COO⁻, S⁻) donorcsoportokon keresztül koordinálódik a fémionhoz. Az AADAAC-NH₂ és ADAAAC-NH₂ terminális aminos csoportjához rendelhető mikroállandó értékét figyelembe véve számolható a ZnLH komplex képződését jellemző egyensúlyi állandó értéke a (4.2.4.1) egyenletnek megfelelően:

$$\log K = \log \beta(\text{ZnLH}) - pk(\text{NH}_3^+) \quad (4.2.4.1)$$

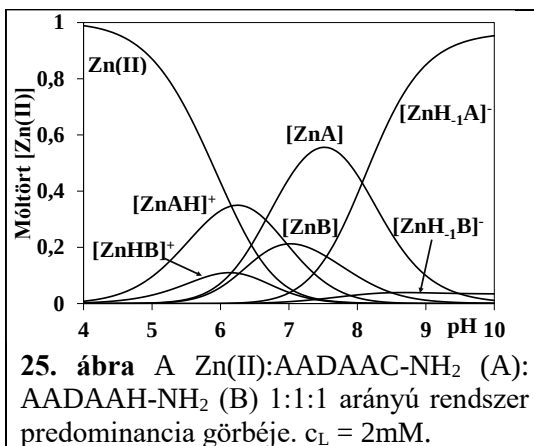


Ezen egyensúlyi állandó értéke 5,42 az AADAAC-NH₂, míg 5,24 az ADAAAC-NH₂ esetén. A kapott egyensúlyi állandók értékei jó egyezésben vannak az Ac-DAAC-NH₂ ZnL összetételű komplexének képződési állandójával, alátámasztva, hogy a hexapeptidek ZnLH komplexében a ligandum a cisztein tiolátcsoportja, illetve a β -karboxilátcsoport által

koordinált.

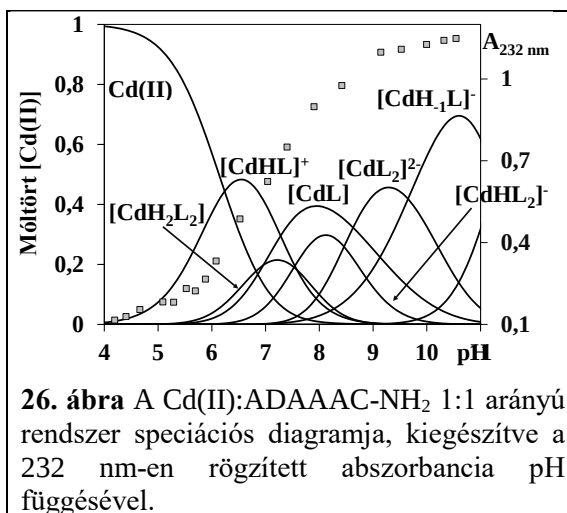
A pH növelésével a protonált ZnLH komplexben a terminális aminocsoport deprotonálódik és koordinálódik a fémionhoz, ugyanis mind az AADAAC-NH₂, mind pedig az ADAAAC-NH₂ esetén a ZnL komplexek képződési állandói jelentősen nagyobb értékűek, mint az Ac-DAAC-NH₂ ZnL összetételű komplexe. Lúgos pH tartományban ez a háromfogú koordináció ugyanakkor nem akadályozza meg a koordinált vízmolekula deprotonálódását és vegyes hidroxidokomplexek képződését. A cisztein tiolátcsoportjának kötődésére, ezáltal stabilitásnövelő hatásának bizonyítására jó modell a korábban vizsgált AADAAC-NH₂ ligandum¹⁸⁹. Utóbbi peptid a C-terminusában cisztein helyett hisztidin található, ugyanakkor a két rendszer speciációja hasonló. A 25. ábra a Zn(II):AADAAC-NH₂:AADAAC-NH₂ 1:1:1 arányú rendszer predomancia görbét mutatja be. Jól látható, hogy a fémion nagyobb hányadban a ciszteint tartalmazó peptidhez kötődik, jelezve nagyobb affinitását a tiolátcsoportot tartalmazó ligandum felé.

A cink(II) Ac-DAAC-NH₂ rendszer ligandumfelesleget tartalmazó oldatában biszkomplexek képződése is tapasztalható, de a hidrolízissel átfedő folyamatban. A hexapeptidek esetén a biszkomplexek képződésének hiánya jól magyarázható azzal a ténnyel, hogy a tiolátcsoport koordinációja a cink(II)ionokhoz általában tetraédres geometriát eredményez. Így a fémion koordinációs szféráját a



kétfogú Ac-DAAC-NH₂ kötődése telíteni tudja a 2x(β-COO⁻,S⁻) donoratómú komplex képződése közben, a hexapeptidek esetén ugyanakkor a háromfogú koordináció gátolja a biszligandumú komplex megjelenését.

Kadmium(II)ionok esetén a képződő komplexek sztöchiometriája megegyezik a cink(II) rendszerek esetén leírtakkal, azzal kiegészítve, hogy míg a kadmium(II)ionok esetén az oktaéderez elrendeződés preferált, ezáltal biszkomplexek képződése is tapasztalható a ligandumot feleslegben tartalmazó oldatban (11. táblázat). Ezen ligandumfelesleget tartalmazó rendszerek közül a

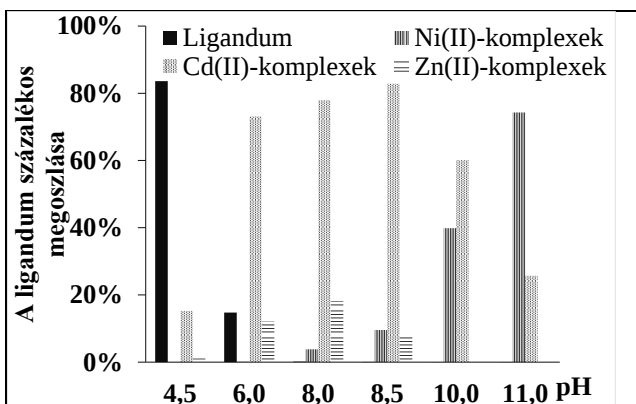


26. ábra A Cd(II):ADAAAC-NH₂ 1:1 arányú rendszer speciációs diagramja, kiegészítve a 232 nm-en rögzített abszorbanca pH függésével.

Cd(II):ADAAAC-NH₂ komplexeloszlási diagramját a 26. ábra mutatja be. Az ábrát összevetve a nikkel(II)-, vagy cink(II)ionokat tartalmazó rendszerek speciációs görbéivel jól látható, hogy a komplexképződés savasabb pH tartományban indul. Ez a kadmium(II)ionok nagy affinitását mutatja tiolátcsoportot tartalmazó ligandumok irányába. A tiolátcsoport koordinációját a 232 nm-nél megjelenő ligandumsáv is egyértelműen mutatja. A tiolátcsoport stabilitásnövelő hatása ugyanakkor jobban szemléltethető a 27. ábrán, ahol a Cd(II):Zn(II):Ni(II):ADAAAC-NH₂ 1:1:1:1 arányú hipotetikus rendszer komplexmegoszlását tüntettük fel enyhén savas, illetve lúgos pH tartományban. Az ábra egyértelműen jelzi a kadmium(II)-komplexek preferenciáját széles pH tartományban és a

nikkel(II)ionok ott válnak kedvező kötőhelyé a ligandum számára, ahol már amidnitrogén koordinált komplex formájában vannak jelen.

Mindkét hexapeptid protonált komplexeket képez savas pH tartományban a kadmium(II)ionokkal. Az ezen komplexek képződését jellemző egyensúlyi



27. ábra Az ADAAAC-NH₂:Cd(II):Zn(II):Ni(II) 1:1:1:1 arányú rendszerben képződő komplexek megoszlása egyes pH értékeken. cL = 2 mM.

állandók értékei (a 4.2.4.1 egyenlethez hasonló számítást alkalmazva) 6,41-nek, illetve 6,98-nak adódtak az ADAAAC-NH₂ és AADAAC-NH₂ peptid esetén. Ezen értékek jó egyezésben vannak a modell Ac-DAAC-NH₂ CdL komplexének képződési állandójával, ahol is (β -COO⁻, S⁻) koordináció alakul ki. Ennek megfelelően a hexapeptidek kadmium(II)ionokkal alkotott protonált komplexekben a terminális aminos csoport protonált. A következő lúgfogyasztó folyamat ezen terminális aminos csoport deprotonálódása és koordinációja, ugyanis a hexapeptidek kadmium(II)ionokkal képzett CdL összetételű komplexei nagyobb stabilitásúak az Ac-DAAC-NH₂ CdL komplexének stabilitásához képest, jelezve az aminos csoport kötődését a fémionhoz.

A legnagyobb különbség a cink(II)- és kadmium(II)ionokat tartalmazó rendszerek között egyértelműen a kadmium(II) biszkomplexek képződéséhez köthető. Ligandumfelesleget tartalmazó oldatban ezen biszkomplexek széles pH tartományban uralkodó részecskék és jelentős mértékben visszaszorítják a fémion hidrolízisét. A biszkomplexek képződésének preferenciája egyértelműen a korábban említett oktaéderes geometriával magyarázható, ugyanakkor a 13. táblázat $\lg(K_1/K_2)^H$ és $\lg(K_1/K_2)$ értékei jelzik, hogy a biszkomplexek képződése a protonált komplexek esetén kedvezőbb, ahol a ligandum kétfogú koordinációja valósul meg.

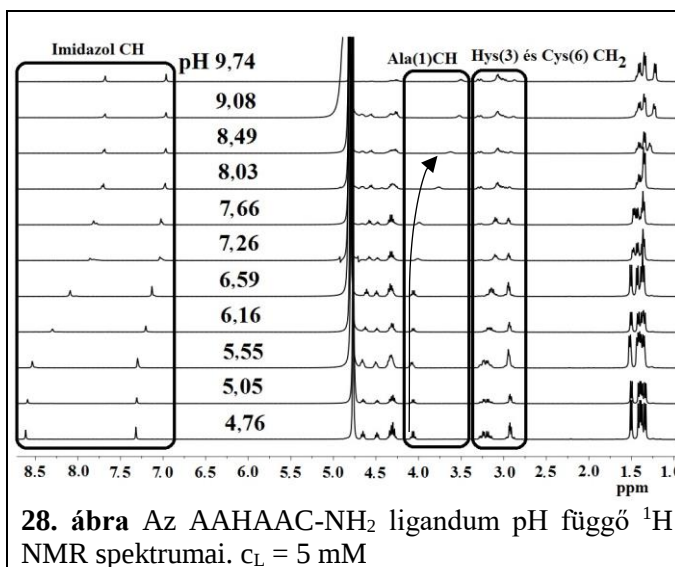
4.3. Ciszteint és hisztidint tartalmazó peptidek komplexképző sajátságai

14. táblázat A hisztidint és ciszteint tartalmazó peptidek deprotonálódási állandói (T = 298 K, I = 0,2 M KCl).

Részecske	AAHAAC-NH ₂		AHAAAC-NH ₂	
	logβ _{pqr}	pK	logβ _{pqr}	pK
[HL]	8,77(1)	8,77	8,77(1)	8,77
[H ₂ L] ⁺	16,49(1)	7,72	16,48(1)	7,71
[H ₃ L] ²⁺	22,77(1)	6,28	22,64(1)	6,16

A két peptid (AAHAAC-NH₂ és AHAAAC-NH₂) sav-bázis jellegét tekintve három deprotonálódásra képes csoportot tartalmaz. Ez az N-terminális aminocsoport, a hisztidin imidazolil csoportja, illetve a cisztein tiol csoportja. A szabad ligandum deprotonálódási állandóit a 14. táblázat tartalmazza. A táblázat adataiból látható, hogy a pK értékek a két ligandum esetén nagyon hasonlóak, vagyis a hisztidin pozíciója gyakorlatilag nem befolyásolja az egyes disszociábilis protonnal rendelkező csoportok bázicitását. A pH függő ¹H NMR spektrumok alapján a deprotonálódási sorrend meghatározható, illetve a rendszert jellemző mikroállandók is. Az AAHAAC-NH₂ ligandum pH függő NMR spektrumait a 28. ábra mutatja. Ezek alapján a bázicitás az imidazol-N, terminális amino, cisztein tiolát sorrendben nő. Azonban az átfedés az egyes mikrofolyamatok között kevesebb, mint 5 %-nak adódott, amely alapján a rendszert jellemző mikroállandók egyben makroállandóknak is tekinthetők.

Az értekezés további részében a két ligandum komplexképző



sajátságait nikkel(II)-, cink(II)- és kadmium(II)ionokkal egy külön alfejezetben részletezzük, míg a réz(II)- és palládium(II)-komplexek egy másik alfejezetben kerülnek ismertetésre. Ennek oka, hogy utóbbi két fémion speciális komplexkémiail viselkedést mutatott a vizsgált ligandumokkal, így azok részletes jellemzése külön alfejezetben indokolt.

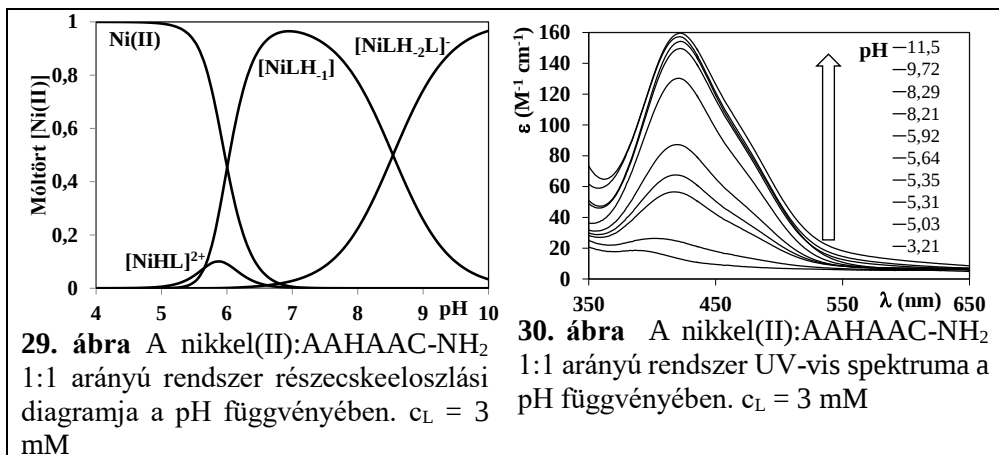
4.3.1. Az AAHAAC-NH₂ és AHAAAC-NH₂ nikkel(II)-, cink(II)- és kadmium(II)-komplexei

A ligandumok nikkel(II)-, cink(II)- és kadmium(II)ionokkal alkotott komplexeinek stabilitási állandói a 15. táblázatban találhatóak meg.

15. táblázat Az AAHAAC-NH₂ és AHAAAC-NH₂ nikkel(II)- cink(II)- és kadmium(II)-komplexeinek stabilitási állandója ($\log\beta_{\text{pqr}}$), illetve származtatott állandók (T = 298 K, I = 0,2 M KCl (Ni(II) és Zn(II)) és 0,2 M KNO₃ (Cd(II))).

Részecske	AAHAAC-NH ₂			AHAAAC-NH ₂		
	Ni(II)	Zn(II)	Cd(II)	Ni(II)	Zn(II)	Cd(II)
[MLH] ²⁺	13,1(2)	14,45(2)	15,06(1)	13,08(5)	14,31(3)	14,80(2)
[ML] ⁺		7,11(6)	7,75(3)	7,62(1)	8,09(3)	7,84(5)
[MLH ₋₁]	1,79(3)	-0,90(4)	-1,88(4)	1,10(1)	0,85(4)	-0,88(6)
[MLH ₋₂] ⁻	-6,7 (1)	-10,76(7)				
[ML ₂ H ₂] ²⁺		28,11(4)	28,71(5)			28,1(1)
[ML ₂ H] ⁺		20,81(8)	21,29(8)			20,9(1)
[ML ₂]		13,14(7)	13,35(6)			13,17(9)
log K ₁ /K ₂		1,08	2,15			2,51
log K ₁ /K ₂ (H)		0,79	1,41			1,50
pK (MLH/ML)		7,34	7,31	5,46	6,22	6,96
pK (ML/MLH ₋₁)		8,01	9,63	6,52	7,24	8,72
pK (MLH ₋₁ /MLH ₋₂)	8,49	11,66				
pK (ML ₂ H ₂ /ML ₂ H)		7,30	7,42			7,20
pK (ML ₂ H/ML ₂)		7,67	7,94			7,73

Az AAHAAC-NH₂ esetén a nikkel(II)ionok komplexképződési folyamatai lényegesen különböznek a másik két fémionétól. Ez a várakozásnak megfelelően azért van, mert az N-terminálisan szabad, harmadik helyen hisztidint tartalmazó peptidek kiugró stabilitással képesek kötni a nikkel(II)- és réz(II)ionokat (ATCUN-motívum, 2.1.2. fejezet). Emiatt a nikkel(II):AAHAAC-NH₂ 1:1 arányú rendszer komplexeloszlása a pH függvényében viszonylag egyszerű, három részecske jelenik meg a vizsgált pH tartományban (29. ábra). A savas pH-n megjelenő NiLH részecske csak kis mennyiségben van jelen, az UV-látható spektrum alapján a komplex oktaéderes szerkezetű és az N-terminális aminocsoport és a hisztidin imidazol nitrogénje kötik a fémiont. A NiL komplex megjelenésének hiánya, illetve a titrálási görbe lefutása miatt a következő lépés két amidnitrogén kooperatív, fémion indukált deprotonálódása és koordinációja pH 5,5 felett.



29. ábra A nikkel(II):AAHAAC-NH₂ 1:1 arányú rendszer részecskeeloszlási diagramja a pH függvényében. $c_L = 3$ mM

30. ábra A nikkel(II):AAHAAC-NH₂ 1:1 arányú rendszer UV-vis spektruma a pH függvényében. $c_L = 3$ mM

A NiLH₋₁ összetételű komplexben a fémiont az N-terminális aminos csoport, két amidnitrogén és a hisztidin imidazol nitrogénje koordinálja, létrehozva a csatolt (5,5,6)-tagú kelátrendszert. Ennek megfelelően a komplex [NiLH₋₂](H) összetétellel adható meg, amelyben a C-terminális cisztein protonált. A képződési állandók ismeretében számolható az albumin-szerű koordináció kialakulását jellemző egyensúlyi állandó ($\log K_{ATCUN-motívum}$) értéke a következő 4.2.2.1 egyenletnek megfelelően:

$$\log K_{ATCUN-motívum} = \log \beta(NiLH_{-1}) - pK(SH) = -6,98 \quad (4.2.2.1)$$

Ezen egyensúlyi állandó értékét a Ni(II):AAHAAAHG NiLH₋₁ komplexében, ahol a C-terminális hisztidin szintén nem koordinált és a peptid N-terminusán alakul ki az albumin koordináció, a 4.2.2.2 egyenlet adja meg¹⁹⁰:

$$\log K_{ATCUN-motívum} = \log \beta(NiLH_{-1}) - pK(Im) = -7,18 \quad (4.2.2.2)$$

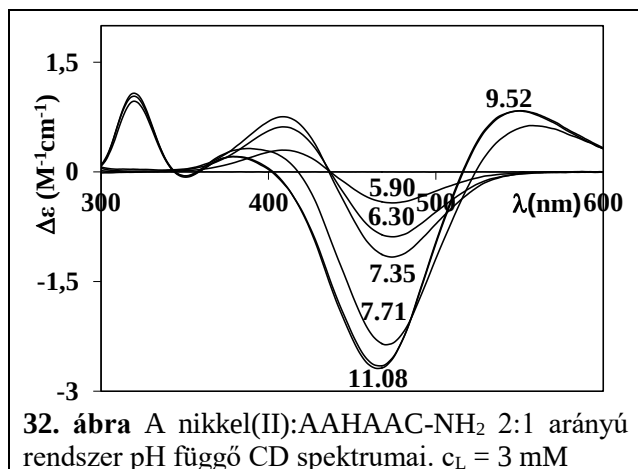
Ezen két egyensúlyi állandó értéke egymással jó egyezésben van, amely alátámasztja a megegyező koordinációs módot.

Az UV-látható spektrumban megjelenő d-d átmenet egyértelműen jelzi, hogy a komplex síknégyszetes geometriájú és a 425 nm-nél jelentkező abszorpciós maximum ($\epsilon = 157 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) jól megfeleltethető a nikkel(II)ion albumin-szerű koordinációjának (30. ábra), illetve jó egyezésben van az irodalomban található megegyező kötémódú komplexek spektrális paramétereinek értékével (AAHAAAHG: $\lambda = 422 \text{ nm}$ ($138 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$))¹⁹⁰. A pH függő CD spektrumok szintén ennek a részecskének a jelenlétét támasztják alá, illetve azt is jól mutatják, hogy a NiLH₋₂ komplex megjelenése nem jár a koordinációs szféra átrendeződésével, vagyis ezen részecske megjelenésekor csak a nem koordinálódó tiolcsoport deprotonálódik (31. ábra). A folyamatot jellemző pK érték 8,49, míg a szabad ligandumban 8,77, amely kis különbség a koordináció hatására a töltésviszonyok megváltozásával jól magyarázható.

A lúgos pH-n regisztrált NMR spektrumok szintén azt mutatják, hogy a tiolátcsoport nem koordinálódik a fémionhoz. Ez az eredmény meglepő, ugyanis a nikkel(II)ionok rendkívül nagy hajlamot mutatnak a tiolát donorcsoportot tartalmazó ligandumok irányába⁵⁶, ugyanakkor a tiolátcsoport

távoli makrokelát helyzete nem képes versengeni az albumin-szerű koordináció csatolt kelátrendszerével.

Ez azonban azt is jelentheti, hogy a tiolátcsoport egy független kötőhelye lehet a nikkel(II)ionoknak fémiont feleslegben tartalmazó oldatok esetén. Ennek megfelelően, pH 7,7 felett egy újabb fémion kötődik a ligandumhoz, párhuzamosan a nikkel(II)hidroxid csapadék megjelenésével is. Emiatt a dinukleáris komplexek stabilitási állandóját nem tudtuk meghatározni, de az UV-látható és CD spektrumok alapján a komplexben koordinált donorcsoportok azonosíthatóak. Az UV-látható spektrumokban lúgos pH tartományban 320 nm-nél egy nagy intenzitású, $S^{-} \rightarrow Ni(II)$ töltésátviteli sáv megjelenése detektálható, amivel párhuzamosan 550 nm-nél a d-d átmenetnél egy váll jelenik meg. Ez jellemzően a Ni(II)-tiolát kölcsönhatás következménye. A CD spektrumok még drasztikusabb változást mutatnak a lúgos tartományban (32. ábra). pH 7,7-nél egy új, pozitív Cotton effektus látható 550 nm-nél, amely jellemzően akkor alakul ki, ha az amidnitrogén deprotonálódás a peptidváz C-terminusa felől indul. Ennek megfelelően a tiolátcsoport horgonycsoportként köti



a nikkel(II)iont elősegítve a peptidváz két amidnitrogénjének deprotonálódását és koordinációját.

A peptid -HAAC-NH₂ régiójának komplexkémiailag tanulmányozása miatt előállítottuk az Ac-HAAC-NH₂ szekvenciájú peptidet, mint modellvegyületet. A ligandum protonálódási állandóit, illetve nikkel(II)-

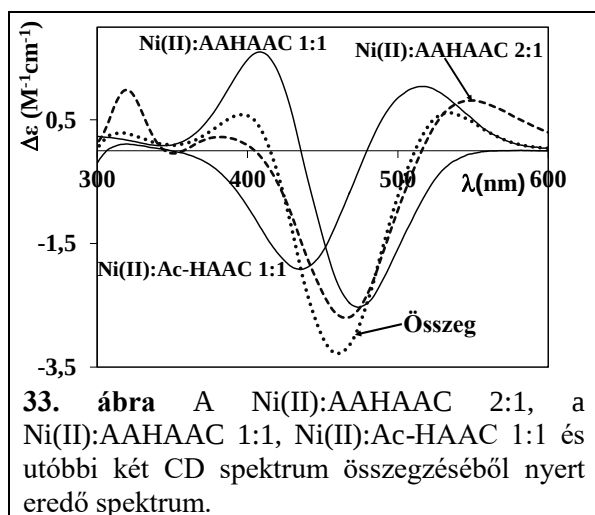
cink(II)- és kadmium(II)ionokkal alkotott komplexeinek egyensúlyi állandóit a 15. táblázat tartalmazza.

15. táblázat Az Ac-HAAC-NH₂ nikkel(II)-cink(II)- és kadmium(II)-komplexeinek stabilitási állandója ($\log\beta_{\text{pqr}}$) és származtatott állandói (T = 298 K, I = 0,2 M KCl (Ni(II) és Zn(II)) és 0,2 M KNO₃ (Cd(II))).

Részecske	Ac-HAAC-NH ₂		
	$\log\beta_{\text{pqr}}$	pK	
[HL]	8,81(2)	8,81	
[H ₂ L] ⁺	15,30(3)	6,49	
	Ni(II)	Zn(II)	Cd(II)
[MLH] ²⁺	11,2(2)	12,1(2)	12,5 (1)
[ML] ⁺	5,17(3)	7,02(3)	7,70(2)
[MLH ₋₁]		-0,35(7)	-2,35(5)
[MLH ₋₂] ⁻	-10,81(3)	-10,39(6)	-14,21(6)
[MLH ₋₃] ²⁻	-21,53(8)		
[ML ₂]	9,1(1)	13,58(4)	13,34(7)
[MH ₋₁ L ₂] ⁻		3,1(1)	2,27(9)
$\log K_1/K_2$	1,27	0,46	2,06
pK (MLH/ML)	6,06	5,03	4,84
pK (ML/MLH ₋₁)		7,37	10,05
pK (MLH ₋₁ /MLH ₋₂)		10,04	11,86
pK (MLH ₋₂ /MLH ₋₃)	10,72		
pK (ML ₂ /ML ₂ H ₋₁)		10,52	11,07

A modellpeptid nikkel(II)-komplexeit illetően a protonált, NiLH összetételű komplexben az imidazol nitrogén koordinálja a fémiont. Ennek egy közvetett bizonyítéka, hogy a NiL komplex képződését jellemző pK érték kisebb, mint a szabad ligandumban az imidazol deprotonálódásához rendelhető deprotonálódási állandó, aminek eredményeképpen a NiLH → NiL folyamat a tiolcsoport deprotonálódásához és koordinációjához köthető. Mind a NiLH, mind pedig a NiL összetételű komplex oktaéderez geometriájú, amelyet a CD aktivitás hiánya, illetve az UV-látható spektrumok kis intenzitása egyértelműen alátámaszt. A NiLH₋₂ összetételű komplexben a NiLH₋₁ komplex megjelenésének a hiánya két amidnitrogén kooperatív deprotonálódására és koordinációjára utal. Ennek megfelelően kialakul az (N_{im}, N⁻, N⁻, S⁻) donoratommokkal koordinált komplex. Mivel mind a hisztidin imidazol, mind pedig a tiolát S horgonycsoportként kötődik a fémionhoz és ez indukálja a peptidváz amidnitrogénjeinek a deprotonálódását és koordinációját, a kérdés hogy a peptidváz N-, vagy C-terminusáról indul-e ez a folyamat, esetleg a

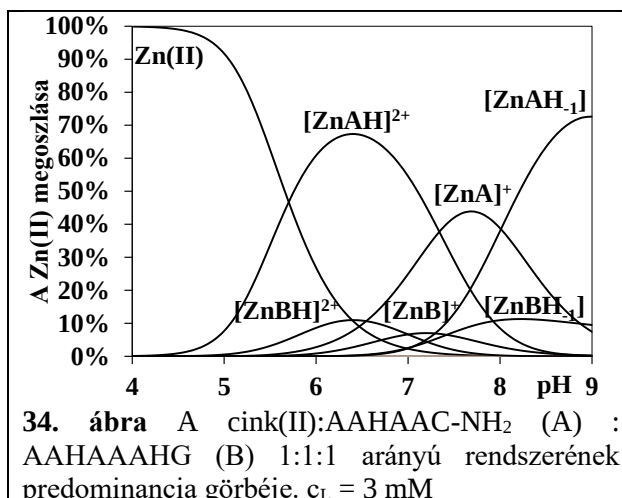
peptidváz mindkét végéről, koordinációs izomerek képződése közben. A pH függő CD spektrumok segítettek ezen kérdés megválaszolását, ugyanis az 520 nm-nél megjelenő pozitív Cotton-effektus egyértelmű bizonyítéka a C-terminus felől induló amidnitrogén deprotonálódásnak és koordinációnak. Ennek megfelelően a NiLH_{-2} komplexben kialakul a csatolt (5,5)-tagú (S^- , N^- , N^-) kelát, amelyet a hisztidin imidazol makrokelát koordinációja egészít ki. Ennek megfelelően a $\text{Ni(II):AAHAAC-NH}_2$ 2:1 arányú rendszerben megjelenő dinukleáris komplex CD spektruma



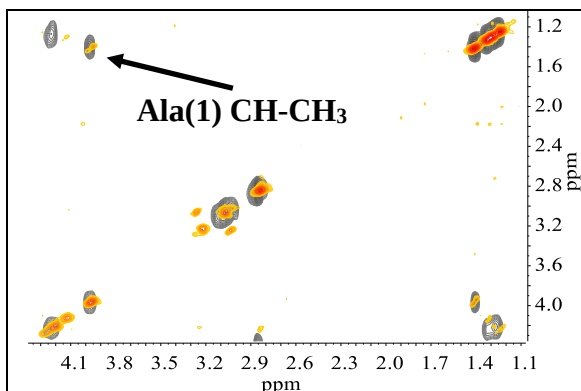
megadható a $\text{Ni(II):AAHAAC-NH}_2$ 1:1 arányú rendszerben képződő albumin-szerű kötésmódú komplex, illetve a $\text{Ni(II):Ac-DAAC-NH}_2$ 1:1 (N_{im} , N^- , N^- , S^-) donoratomú komplex CD spektrumainak összegzéséből. A 33. ábra ezt az összegzést mutatja be, alátámasztandó a hexapeptid dinukleáris komplexében a nikkell(II)ionok C-terminus régiójához való kötődését is.

A cink(II)- és kadmium(II)ionok albumin-szerű peptidekkel végzett oldategyensúlyi vizsgálatai alapján ismert, hogy egyik fémion sem képes indukálni az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját. Ugyanakkor a két fémion AAHAAC- NH_2 ligandummal alkotott komplexei nagy stabilitásúak, amely stabilitásnövekedés a tiolátcsoport koordinációjával magyarázható, amelyhez mindkét fémion nagy affinitást mutat.

A 34. ábra a cink(II):AAHAAC- NH_2 : AAHAAAHG-OH multikomponensű rendszer predomancia görbéjét mutatja be. A két hisztidint tartalmazó peptid hasonló az általunk vizsgált peptidhez abban az értelemben, hogy a peptidváz harmadik pozíciójában hisztidin található és különbözik amiatt, hogy a távoli



koordinálódó csoport szintén hisztidin. A predomancia görbe alapján a cink(II) a ciszteint tartalmazó peptidhez kötődik lényegesen nagyobb mennyiségben, jelezve a tiolátcsoporthoz való nagyobb affinitását. 2D homonukleáris NMR segítségével szintén igazoltuk a tiolátcsoport koordinációját pH 6,0-nál, ahol a ZnLH komplex domináns (35. ábra). Ebben a komplexben a ligandum (N_{im}, S^-) kétfogú



35. ábra Az AAHAAC-NH₂ (szürke) és Zn(II):AAHAAC-NH₂ 1:1 arányú rendszer (sárga) alifás tartományának WG TOCSY spektruma pH = 6,0-on. $c_L = 3$ mM

koordinációja valósul meg, ugyanis az N-terminális alanin CH-CH₃ keresztcsúcs gyakorlatilag megegyezik a szabad ligandum megfelelő keresztcsúcsával, jelezve, hogy a terminális aminos csoport protonált.

Mivel az AAHAAC-NH₂ peptidben az NMR vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a rendszert jellemző deprotonálódási makroállandók egyben mikroállandók is, így megadható az (N_{im}, S^-) kétfogú koordinációt jellemző egyensúlyi állandó értéke a 4.2.2.3. egyenletnek megfelelően:

$$\log K = \log \beta(ZnLH) - pK(NH_3^+) = 6,73 \quad (4.2.2.3)$$

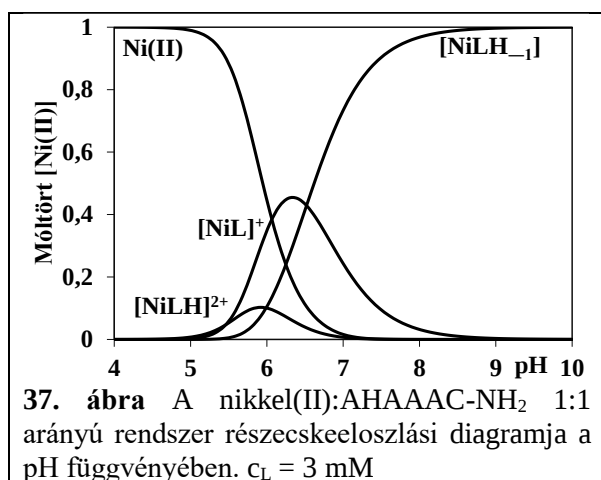
Ez az érték jó egyezésben van az Ac-HAAC-NH₂ ZnL komplexe képződési állandójának az értékével, amelyben szintén az (N_{im}, S^-) donorcsoportok vesznek részt a fémion megkötésében.

Hasonló viselkedést figyeltünk meg kadmium(II)ionok esetén is. A 4.2.2.3 egyenlet értelmében szintén számolható az ezen részecske képződését jellemző egyensúlyi állandó, amely 7,34-nek adódott. Összevetve az Ac-HAAC-NH₂ CdL komplexének képződési állandójával ($\log \beta = 7,70$) ismételtén jó egyezést kaptunk, amely alátámasztja, hogy a protonált komplexben (N_{im}, S^-) koordináció valósul meg. Ez a kétfogú koordináció a következménye annak, hogy ligandumfelesleget tartalmazó oldatban biszkomplexek megjelenése tapasztalható (36. ábra). A protonált biszkomplexekben a koordináció szintén (N_{im}, S^-). Az ML₂ komplexben az N-terminális aminos csoport gyengén koordinált, a folyamatot jellemző pK érték cink(II) esetén 7,67, míg kadmium(II)ionoknál 7,76 (vö. szabad ligandum pK = 7,72). A protonált, illetve a mono- és biszkomplexekre vonatkozó lépcsőzetes stabilitási állandók aránya sem mutat szignifikáns változást, amely szintén az aminos csoport gyenge koordinációjával, vagy annak hiányával magyarázható.

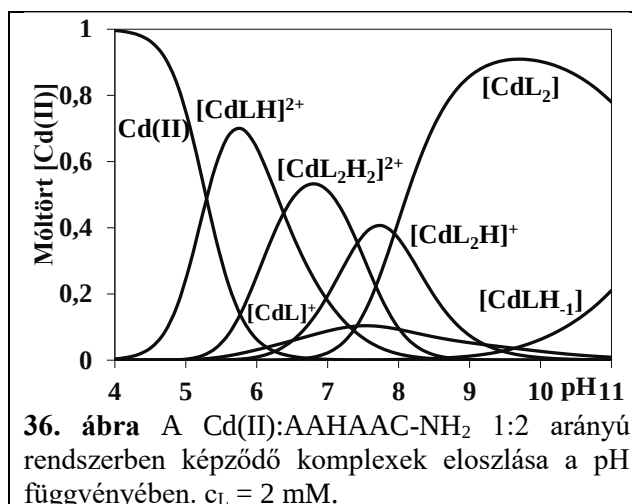
Lúgos pH tartományban, ekvimoláris oldatban a koordinált vízmolekula deprotonálódása és vegyes hidroxokomplexek megjelenése következik be. Ez a hidrolízis cink(II)ionok esetén egy másfél pH egységgel hamarabb játszódik le, mint kadmium(II)ionoknál, amely a cink(II)ionok nagyobb hajlamát mutatja a hidroxido komplexek képződése felé.

Az AHAAAC-NH₂ ligandum komplexképződési folyamatai nikkel(II)- és cink(II)ionokkal nagy hasonlóságot mutatnak, míg jelentős különbség a kadmium(II)ionot tartalmazó rendszerek esetén figyelhető meg.

Az egyensúlyi vizsgálatok alapján a nikkel(II)- és cink(II)ionokat tartalmazó rendszerekben csak mononukleáris 1:1 komplexek képződése írható le és a cink(II)-komplexek képződése kis mértékben, de preferált a nikkel(II)-komplexekhez képest. Ez a fajta trend azt mutatja, hogy a koordinációs szférában a tiolát donorcsoport megtalálható, amelynek eredményeképpen a cink(II)-komplexek kis mértékben ugyan, de nagyobb stabilitásúak.

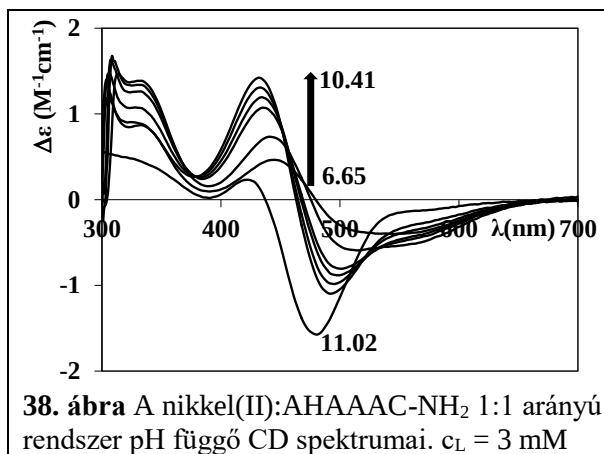


aminek megfelelően a NiL komplexben a ligandum háromfóguán, az amino-, imidazol- és tiolát donorcsoportokon keresztül koordinálódik a fémionhoz. pH 7,0 felett az egyetlen részecske az amidnitrogén deprotonálódásával és koordinációjával

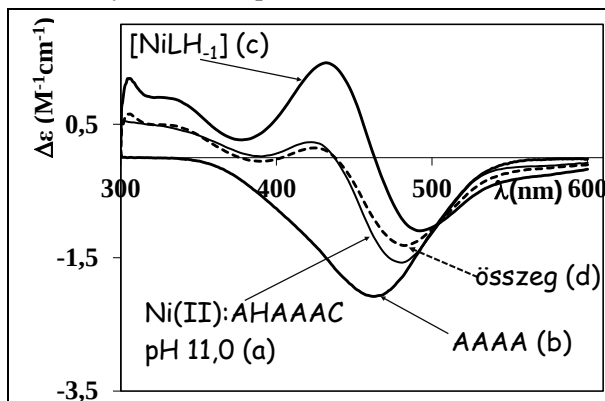


Ezt a fajta kötősmódot az UV-látható spektrumokkal is igazoltuk a megfelelő nikkel(II)-komplexek esetén. A savas oldatban megjelenő NiLH komplex kis mennyiségben van jelen, kötősmódját tekintve vagy az N-terminális aminocsoport, vagy a tiolátcsoport protonált. Ezen csoportok egyikének deprotonálódása és koordinációjá nem okoz változást a CD spektrumban,

képződő NiLH_{-1} összetételű részecske (37. ábra). A folyamatot jellemző pK érték 6,52, míg a GlyHis rendszerben 6,03³⁰. Ez a fajta különbség szintén a tiolátcsoport koordinációjával magyarázható, amely az ML összetételű komplexet stabilizálja és a peptidváz amidnitrogénjének deprotonálódását és koordinációját a nagyobb pH tartomány felé tolja. Az UV-látható spektrumok alapján a komplex síknégyzetes geometriájú és széles pH tartományban uralkodó részecske. A pH függő CD spektrumok is alátámasztották ennek a részecskének a jelenlétét, ugyanakkor lúgos pH tartományban a CD spektrumok változása következik be.



38. ábra A nikkel(II):AHAAAC-NH₂ 1:1 arányú rendszer pH függő CD spektrumai. c_L = 3 mM

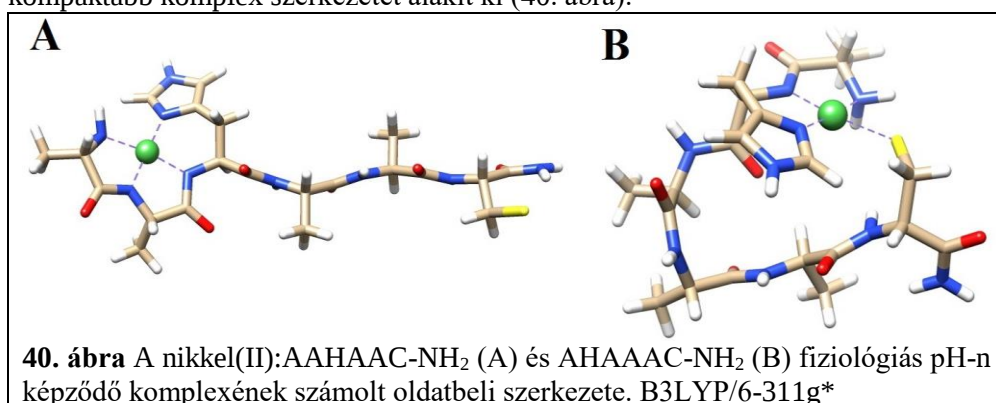


39. ábra pH 11,0-en rögzített CD spektrum a Ni(II):AHAAAC rendszerben (a), kiegészítve az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}, \text{S}^-)$ koordinációjú (b) és a tetraalanin $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-)$ koordinációjú nikkel(II)-komplexek (c) CD spektrumával. A (d) spektrum (b) és (c) 55/45 arányban történő összegzéséből adódott.

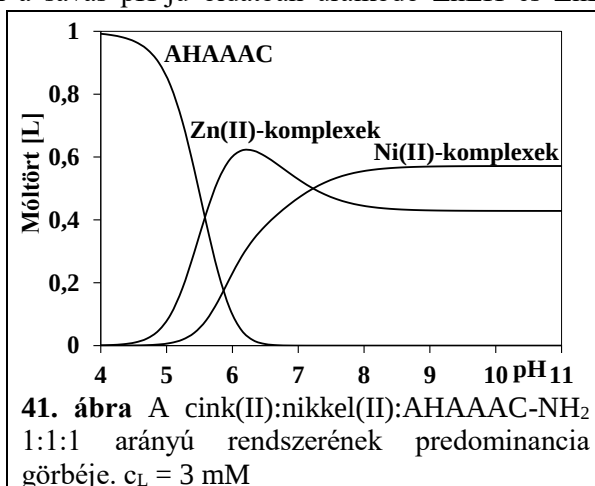
Az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}, \text{S}^-)$ koordinációs módú nikkel(II)-komplexre jellemző 444 nm-nél jelentkező pozitív Cotton-effektus a pH növelésével intenzitás csökkenést mutat, amivel párhuzamosan egy széles negatív sáv jelenik meg 494 nm-nél, amely jellemzően a tetraalanin-szerű vagyis $(\text{NH}_2, 3 \times \text{N}^-)$ koordinációra utaló sáv (38. ábra). Ezen koordinációs mód kialakulása ugyanakkor nem 100%-os, pH 11,63-on a komplexben a fémion 55%-

ban $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}, \text{S}^-)$ donortomok által koordinált, míg 45%-ban az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-)$ koordinációs mód valósul meg. Ezt a tetraalanin NiLH_{-3} komplexe CD spektrumának és a $\text{Ni(II):AHAAAC-NH}_2$ $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}, \text{S}^-)$ koordinációs módú komplex CD spektrumának megfelelő arányú összegzésével, azok additív jellege alapján határoztunk meg (39. ábra).

A nikkel(II)ionokat feleslegben tartalmazó minta CD spektruma lúgos pH-jú oldatban jól mutatja az (S^- , N^-, N^-) kötés mód kialakulását, de ezzel párhuzamosan a nikkel(II) csapadék formájában kiválik az oldatból, vagyis ellentétben az AAHAAC-NH₂ peptiddel, ez a ligandum nem képes két ekvivalens nikkel(II)iont oldatban tartani, amely különbség könnyen magyarázható a tiolátcsoport koordinációjával. Vagyis míg az AAHAAC-NH₂ peptidben az albumin-szerű kötés mód mellett a tiolátcsoport független kötőhelyként viselkedik, az AHAAAC-NH₂ esetén a mononukleáris komplexben is kötött a tiolátcsoport, amely gátolja egy újabb fémion megkötését. Ezt a különbséget szemlélteti a két komplex oldatfázisban, DFT segítségével számolt szerkezete is. Míg a nikkel(II)ionok koordinációja az AAHAAC-NH₂ ligandumhoz nem jár a peptidlánc visszafordulásával, addig a második helyen hisztidint tartalmazó peptid nikkel(II)-komplexében a tiolátcsoport makrokelát koordinációja sokkal kompaktabb komplex szerkezetet alakít ki (40. ábra).

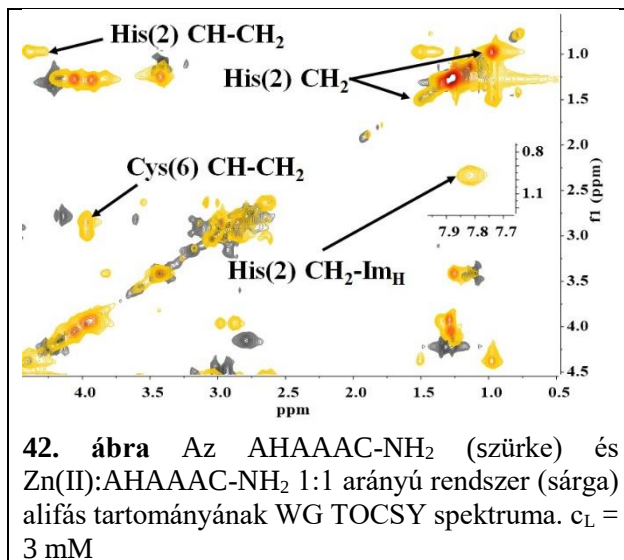


A 41. ábra a Ni(II):Zn(II):AHAAAC-NH₂ 1:1:1 arányú rendszer részecskeeloszlási diagramját mutatja be a pH függvényében. Az ábrán látható, hogy savas pH tartományban a cink(II)ionok nagyobb hányadban kötődnek a ligandumhoz, mint a nikkel(II). ¹H NMR segítségével a savas pH-jú oldatban uralkodó ZnLH és ZnL komplex szerkezetét sikerült azonosítani. Ennek megfelelően, hasonlóan az AAHAAC-NH₂ peptidhez, a ZnLH komplexben a ligandum a tiolát- és imidazol csoportokon keresztül koordinálódik a fémionhoz, ugyanis a komplexben az N-terminális alanin metin- és metil-csoportjának a jele megegyezik a szabad liganduméval.



A következő lépésben a ligandum háromfogú koordinációja valósul meg létrehozva a ZnL összetételű komplexet. Ugyanakkor a 41. ábra eloszlása azt is mutatja, hogy a $\text{Zn(II)} > \text{Ni(II)}$ stabilitási sorrend az amidnitrogén koordinált komplex esetén megfordul, amely azzal magyarázható, hogy a nikkell(II)ionok jelenlétében ennek a komplexnek a képződése jobban preferált.

Az amidnitrogén koordináció a cink(II)ionokat tartalmazó rendszer ^1H spektrumában drasztikus változást okoz, nevezetesen a TOCSY spektrumban jelentkező imidazol aromás CH, hisztidin CH_2 keresztcsúcs változása egyértelműen jelzi a negatív töltés megjelenését a koordinációs szférában (42. ábra). Ezt a fajta ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}$) kötésmódot számos, hisztidint második pozícióban tartalmazó, N-



42. ábra Az AHAAC-NH₂ (szürke) és Zn(II):AHAAC-NH₂ 1:1 arányú rendszer (sárga) alifás tartományának WG TOCSY spektruma. $c_L = 3 \text{ mM}$

terminálisan szabad peptid esetén leírták. Hasonlóan a nikkell(II)ionokhoz, az ezt a folyamatot jellemző pK érték 0,5 lg egységgel nagyobb, mint a GlyHis megfelelő komplexére vonatkozó érték ($pK(\text{ML}/\text{MLH}_{-1})=6,03^{30}$), amely közvetett bizonyítékaul szolgál a tiolátcsoport jelenlétének a koordinációs szférában. Az AAHAAC-NH₂ peptidhez hasonlóan az AHAAC-NH₂ ligandummal is a kadmium(II)ionok képeznek nagyobb stabilitású komplexeket, a cink(II) - kadmium(II) viszonylatban. A speciáció és a koordinációs mód ugyanakkor eltér a nikkell(II)- és cink(II)ionok esetén tapasztaltakkal. A koordináció a tiolátcsoport és hisztidin imidazol csoportjának kötődésével indul, amely ligandumfelesleg esetén biszkomplexek megjelenését is lehetővé teszi. A következő lépés az N-terminális aminocsoport deprotonálódása és koordinációja, amely által a ligandum háromfogú koordinációja valósul meg. A nikkell(II)- és cink(II)ionokat tartalmazó rendszerektől eltérően, a következő protonfelszabadulással járó lépés nem az amidnitrogén deprotonálódásához és koordinációjához rendelhető, hanem a koordinált vízmolekula deprotonálódásához, ezáltal vegyes hidroxidkomplex képződéséhez. Ezt a fajta kötésmódot az ^1H NMR is alátámasztotta, ugyanis nem tapasztaltunk olyan drasztikus kémiai eltolódás változást, mint az amidnitrogén koordinált cink(II)-komplex esetén.

4.3.2. Az AAHAAC-NH₂ és AHAAAC-NH₂ komplexképző sajátságai réz(II)- és palládium(II)ionokkal

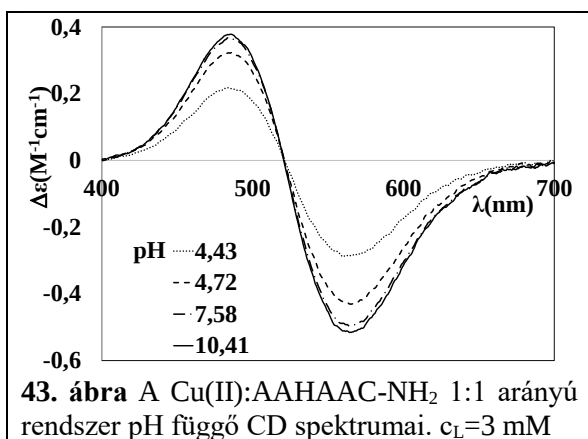
Az AAHAAC-NH₂ ligandum réz(II)ionokkal meglepő módon nem mutatott redoxi reakciót, így az oldategyensúlyi vizsgálatokat elvégezhetjük a fémiont és ligandumot 1:1 arányban tartalmazó minta esetén pH 3,6 és 7 között. Egyetlen részecske, nevezetesen a CuLH₋₁ sztöchiometriájú komplex van jelen már enyhén savas pH tartományban, amely hasonlóan a nikkel(II)-komplexhez, az albumin-szerű koordinációval képződő (NH₂,N⁻,N⁻,N_{im}) kötismódú részecske, amelyben a nem koordinálódó tiols csoport protonált. A komplex feltételezett szerkezetéről a származtatott stabilitási állandók bővebb információt adnak. Az egyensúlyi mérésekből a komplex stabilitási állandója 8,00(6)-nak adódott, amelyet korrigálva a nem koordinálódó tiols csoport pK értékével a 4.3.2.1 egyenletnek megfelelően

$$\log K_{ATCUN-motivum} = \log \beta(CuLH_{-1}) - pK(SH) \quad (4.3.2.1)$$

-0,77-es értéket kapunk. Ezt összevetve az AAHAAHG¹⁹⁰ 4.3.2.2. egyenlet alapján számolt állandójával

$$\log K_{ATCUN-motivum} = \log \beta(CuLH_{-1}) - pK(Im) = -0,82 \quad (4.3.2.2)$$

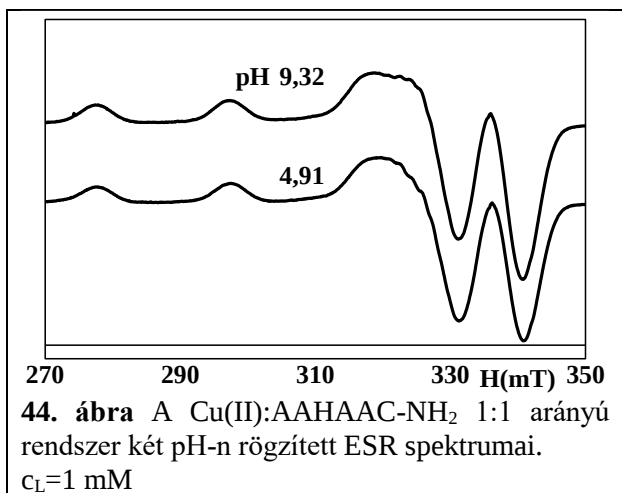
látható, hogy a két származtatott állandó értéke jól egyezik egymással, jelezve a két komplexben az azonos koordinációs módot.



Mind a látható, mind pedig a pH függő CD (43. ábra) spektrumok egyértelműen jelzik ennek a részecskének a kizárólagosságát az enyhén savastól a lúgos pH tartományig.

Az UV-látható spektrumban 522 nm-nél megjelenő abszorpciós maximum az (NH₂,N⁻,N⁻,N_{im}) módra jellemző d-d átmenet értéke. A vizsgált rendszer két pH-n rögzített ESR spektrumait a

44. ábra mutatja. A spektrum párhuzamos tartományából számolt hiperfinom csatolási állandó és a g paraméter értékei ($A_1 = 201,4 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ és $g_1 = 2,186$) szintén az albumin-szerű koordinációs módot támasztják alá¹⁹⁰, illetve a lúgos pH tartományban rögzített spektrumban semmilyen változást nem tapasztaltunk, amely azt jelzi, hogy a tioláts csoport nem lép sem redoxi-, sem pedig koordinatív kölcsönhatásba a fémcentrummal. Ezen a ponton fontos megjegyezni, hogy a réz(I)ionok megjelenése

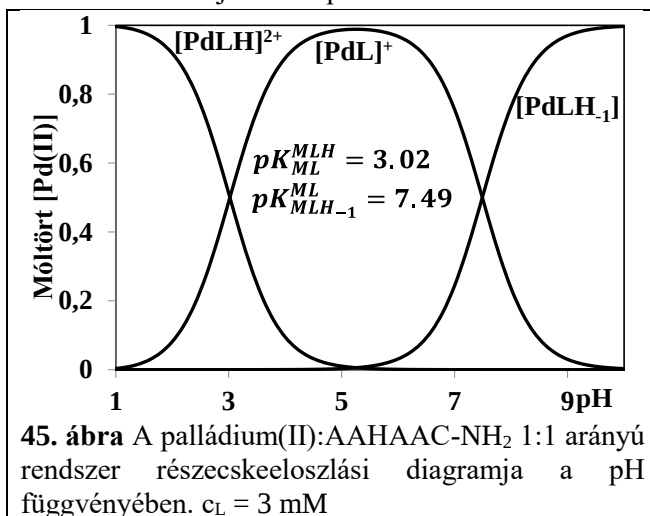


–amely a redoxi reakció egy közvetett bizonyítéka lenne– az intenzitás drasztikus csökkenését eredményezné az ESR spektrumban, amely hatást a vizsgált két pH-n nem tapasztaltunk.

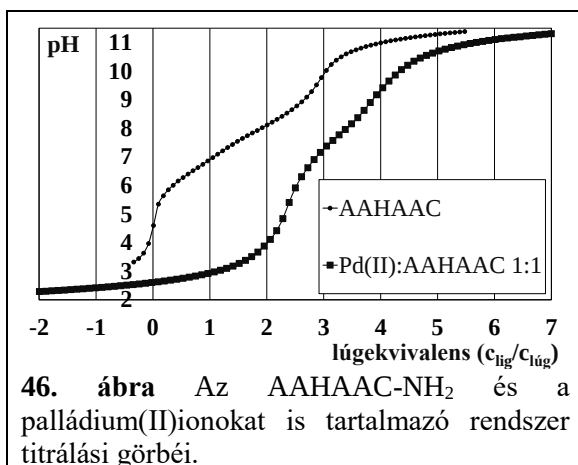
Palládium(II)ionok esetén az AAHAAC-NH₂ ligandummal a komplexképződési folyamatok jelentős különbséget mutatnak a réz(II)- és nikkel(II)ionokhoz

képest. Nevezetesen három részecske képződése írható le az egyensúlyi adatokból, ugyanakkor a képződési állandók meghatározása nem lehetséges a PdLH összetételű komplex nagy stabilitása miatt. Emiatt ezen komplex esetén a stabilitási állandó egy alsó határértéke adható meg ($\lg\beta(\text{PdLH}) = 24,00$) és ezen állandót rögzítve az egyes komplexek deprotonálódási állandóit a 45. ábra részecskeeloszlási diagramja tartalmazza. Ezen eloszlási görbén látható, hogy erősen savas oldatban (pH~2) a komplexképződés már 100%-os és a PdLH összetételű komplexben az ¹H NMR vizsgálatok alapján a hisztidin imidazol nitrogénje és a tiolátcsoport koordinálja a fémiont.

A következő lépés az N-terminális aminos csoport koordinációja, az így létrejövő PdL összetételű komplex széles pH tartományban uralkodó és a háromfogú koordináció képes a fémion indukált amidnitrogén deprotonálódást és koordinációt az enyhén lúgos pH tartományba eltolni. Ez a fajta komplexkémiaili viselkedése a palládium(II)ionnak igen meglepő, ugyanis az egyik legnagyobb affinitással képes kötni a peptidváz amidnitrogénjeit. Így például oldalláncban koordinálódó donorcsoportot nem tartalmazó peptidek esetén az amidnitrogén koordinált részecske pH 2-3 tartományban kialakul⁷⁵. Ugyanakkor a CD spektrum



kis intenzitása a gyengén savas pH tartományban szintén alátámasztja az amidnitrogén koordináció nélküli komplex jelenlétét. Drasztikus változás a CD spektrumban csak a lúgos pH tartományban tapasztalható.

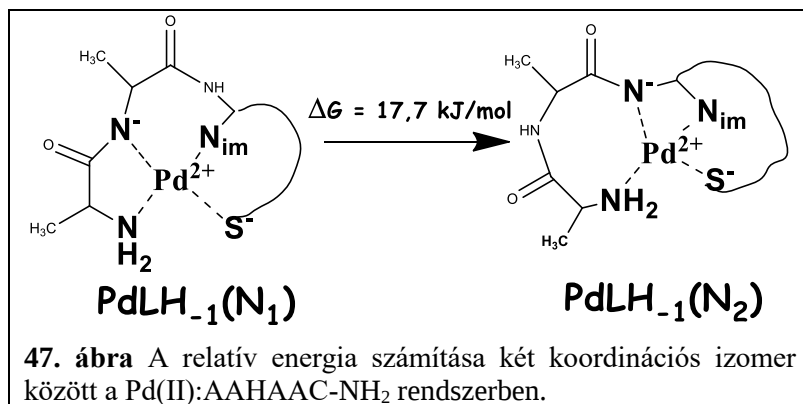


A 46. ábrán bemutatott titrálási görbe egy ekvivalens extra lúgfogyasztó folyamatot mutat a szabad ligandum titrálási görbéjéhez képest, amely egy amidnitrogén jelenlétére utal a koordinációs szférában. Ez azt jelenti, hogy a tiolátcsoport koordinációja képes megakadályozni az (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer képződését a peptid N-terminusa felől. Mivel az

amidnitrogénnel az amino, a hisztidin imidazol nitrogén, illetve a cisztein tiolátcsoportja is kelátképző helyzetben van, a koordinációs izomerek száma megnő. Emiatt DFT segítségével számoltuk az egyes koordinációs izomerek egymáshoz viszonyított relatív energiáját, amelyben a koordinálódó amidnitrogén peptidvázban betöltött pozícióját változtattuk. A relatív energiaérték számolásának egy reprezentatív példáját a 47. ábra mutatja a (4.3.2.3) egyenletnek megfelelően:

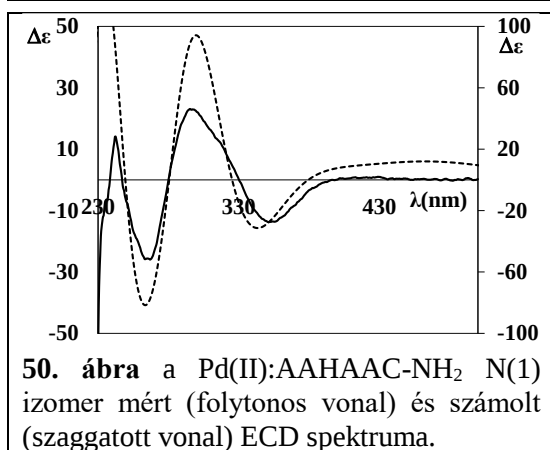
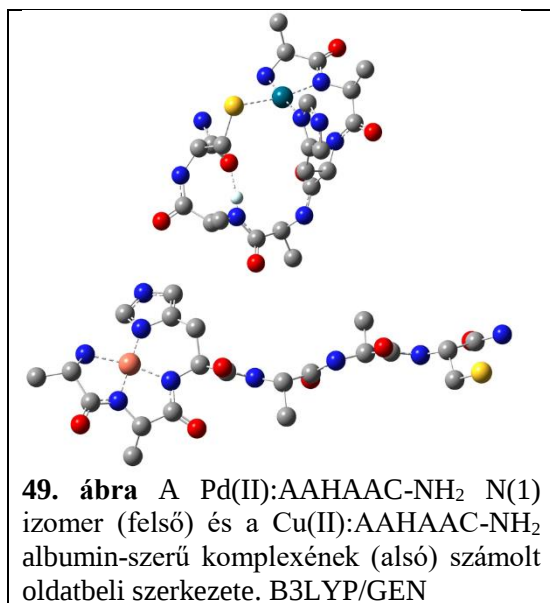
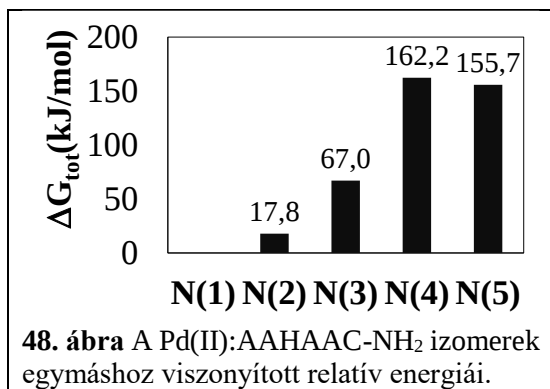
$$\Delta G_{tot}[PdLH_{-1}(N_1)] \rightleftharpoons \Delta G_{tot}[PdLH_{-1}(N_{1...5})] \quad (4.3.2.3)$$

ahol $N_{1...5}$ a koordinált amidnitrogén peptidvázbeli pozícióját jelöli.



A 48. ábra relatív energiaértékei alapján egyértelmű, hogy a peptidváz első amidnitrogénjének koordinációja preferált, ebben az esetben a ΔG_{tot} értéke kedvezőbb, optimális Pd-NH₂, Pd-N₁⁻ és Pd-S⁻ távolságokkal.

Ezen komplex optimált szerkezetét a 49. ábra mutatja, kiegészítve a réz(II) albumin-szerű koordinációs módjának optimált szerkezetével. Míg a réz(II)-komplex esetén

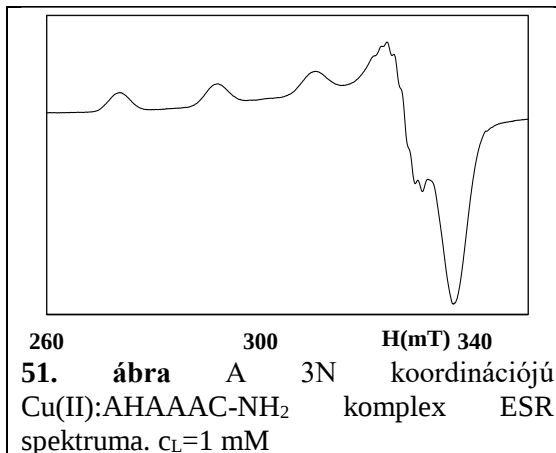


látható, hogy a peptidlánc megnyúlt, addig a palládium(II)-komplexben a tiolát koordinációja egy sokkal merevebb szerkezetet ad, amelyet hidrogén-híd is stabilizál.

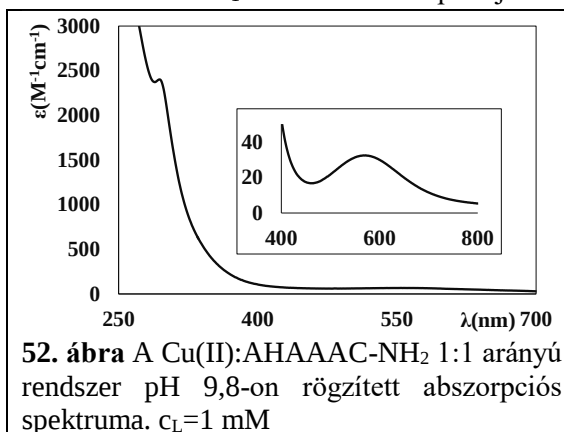
TD-DFT segítségével számítottuk az egyes koordinációs izomerek ECD spektrumát és hasonló megállapítást tehetünk a kapott spektrumokra, mint az egymáshoz viszonyított relatív energiák esetén. Vagyis a mért és számolt ECD spektrumok az első amidnitrogén koordinált komplex esetén adtak egymással nagyon jó egyezést a CAM-B3LYP funkcionál alkalmazása mellett (50. ábra). Ugyanakkor ismert, hogy a tiolátcsoport kétfogú ligandumként is viselkedhet és palládium(II)ionok esetén nagy hajlamot mutat oligomer szerkezetek képzésére^{191,192}. Emiatt diffúzió NMR segítségével vizsgáltuk a szabad ligandum, illetve két különböző koncentrációjú (1 mM és 5 mM) PdLH₋₁ komplex pH 9,8-on rögzített hipotetikus hidrodinamikai sugarát. A szabad ligandum diffúziós koefficiense $D = 3,35(7) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ -nek adódott, amelyből a hidrodinamikai sugár 0,73 nm. Ez a viszonylag kis méret magyarázható a ligandumban kialakuló intramolekuláris hidrogénhid hálózattal. A palládium(II) koordinációja változást eredményez a diffúziós

koefficiensben, nevezetesen $D_{1mM} = 1,61(2) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, illetve $D_{5mM} = 1,58(1) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, amely értékekből 1,53(2) nm átmérőjű hidrodinamikai rádiusz számolható. Ez a méretbeli növekedés a palládium(II)ionok koordinációjának következménye, ugyanakkor a viszonylag kis méretnövekedés nem magyarázható oligomer szerkezet megjelenésével, ugyanis a mért két koncentrációban a diffúziós koefficiensek jól megfeleltethetők egymásnak.

A második helyen hisztidint tartalmazó peptid réz(II)ionokkal való komplexképződési folyamatainak megismerésére csak spektroszkópiai módszereket használtunk, kizárva a lehetséges redoxi reakció zavaró hatását az egyensúlyi vizsgálatok alatt. Ennek oka, hogy az egyensúlyi mérések időskálája lényegesen hosszabb, így a komplexképződés mellett számolhatunk egyéb lassú redoxi reakcióval is. Spektroszkópiai vizsgálatok során az adott komplexet közvetlenül állítjuk elő, kizárva ezáltal a redoxi reakciókat. Ezek alapján a gyengén savas pH tartományban rögzített UV-látható spektrumban 596 nm-nél tapasztalható d-d átmenet hasonlóan az N-terminálisan szabad, második helyen hisztidint tartalmazó peptidekhez, a 3 N-es, $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{im})$ koordinációt támasztja alá, létrehozva ezáltal egy csatolt (5,6)-tagú kelátrendszer. Ezt a fajta koordinációs módot az ESR spektrum is alátámasztotta (51. ábra). Hasonlóan az AAHAAC-NH₂ peptidhez, a spektrumban nem figyeltünk meg intenzitáscsökkenést a pH változtatásával, ezáltal a redoxi reakció kizárható. A 3 nitrogén koordinációja által a koordinációs szféra telítetlen, amelyet a tiolátcsoport kötődése telíteni tud és CuLH₋₁ összetételű komplex jelenik meg. Ennek a fajta komplexnek a képződése mind a nikkel(II)- mind pedig a cink(II)ionokat tartalmazó rendszerben megfigyelhető volt, ugyanakkor a donatoratomok belépése a koordinációs szférába különbözik. Míg a réz(II)ionok esetén az ML összetételű komplexben a fémiont az N-terminális aminocsoport, a hisztidin imidazol nitrogénje és a



tartományban rögzített UV-látható spektrumban 596 nm-nél tapasztalható d-d átmenet hasonlóan az N-terminálisan szabad, második helyen hisztidint tartalmazó peptidekhez, a 3 N-es, $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{im})$ koordinációt támasztja alá, létrehozva ezáltal egy csatolt (5,6)-tagú kelátrendszer. Ezt a fajta koordinációs módot az ESR spektrum is alátámasztotta (51. ábra). Hasonlóan az AAHAAC-NH₂ peptidhez, a spektrumban nem figyeltünk meg intenzitáscsökkenést a pH változtatásával, ezáltal a redoxi reakció kizárható. A 3 nitrogén koordinációja által a koordinációs szféra telítetlen, amelyet a tiolátcsoport kötődése telíteni tud és CuLH₋₁ összetételű komplex jelenik meg. Ennek a fajta komplexnek a képződése mind a nikkel(II)- mind pedig a cink(II)ionokat tartalmazó rendszerben megfigyelhető volt, ugyanakkor a donatoratomok belépése a koordinációs szférába különbözik. Míg a réz(II)ionok esetén az ML összetételű komplexben a fémiont az N-terminális aminocsoport, a hisztidin imidazol nitrogénje és a

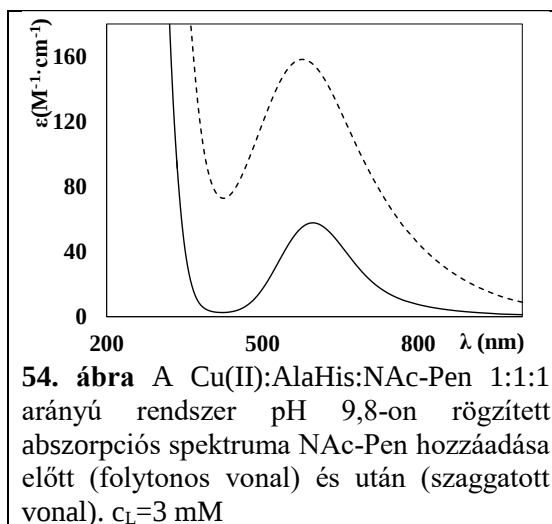
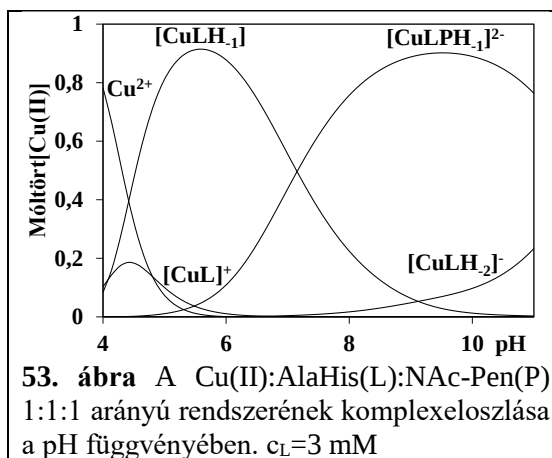


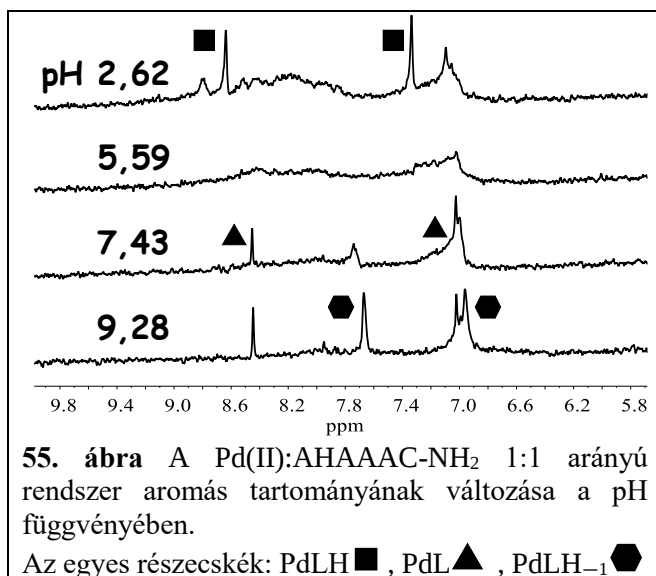
köztük lévő peptidkötés koordinálja, a tiolátcsoport ugyanakkor protonált, addig a nikkel(II)- és cink(II)ionok esetén az ML összetételű komplexet ($\text{NH}_2, \text{N}_{\text{im}}, \text{S}^-$) kötésmód jellemez. Az MLH_{-1} összetételű komplex ennek megfelelően a réz(II)ionok esetén a tiolátcsoport koordinációjával, míg nikkel(II) és cink(II) esetén az amidnitrogén deprotonálódásával és koordinációjával alakul ki. Nitrogén atmoszféra alkalmazása mellett a réz(II)-tiolát töltésátviteli sáv megjelenése tapasztalható az UV-látható spektrumban, amelyet az 52. ábra mutat. Ezt a koordinációs módot kívántuk modellezni a réz(II):alanil-hisztidin:N-acetil-penicillamin 1:1:1 arányú vegyes rendszer vizsgálatával.

Egy vegyes részecske képződése tapasztalható pH 6 felett, amely részecske képződését jól mutatja az 53. ábra eloszlási görbéje, illetve az 54. ábra UV-látható spektruma, amely a réz(II):alanil-hisztidin rendszer abszorpciós spektrumát ábrázolja N-acetil-penicillamin hozzáadása előtt és után. A spektrum eltolódása és intenzitásának nagymértékű növekedése egyértelműen utal a tiolátcsoport koordinációjára, míg az alanil-hisztidin az amino, amid, imidazol donorcsoportjai által koordinálja a fémiont.

A palládium(II)ionok esetén a komplexképződési folyamatok hasonlóak a harmadik helyen hisztidint tartalmazó peptid komplexképződési folyamataihoz. Ezen rendszerben is nagy stabilitású komplexek képződnek, így csak az egyes deprotonálódásokhoz rendelhető pK értékeket tudtuk meghatározni a PdLH komplex

stabilitási állandójának rögzítése által. Az NMR spektroszkópiai ugyanakkor több információt adott az egyes komplexek szerkezetéről. Az 55. ábra a Pd(II):AHAAAC- NH_2 1:1 arányú rendszer NMR spektrumának aromás tartományát mutatja be. Az ábrán jól látható, hogy a savas pH oldatban megjelenő két imidazol jel



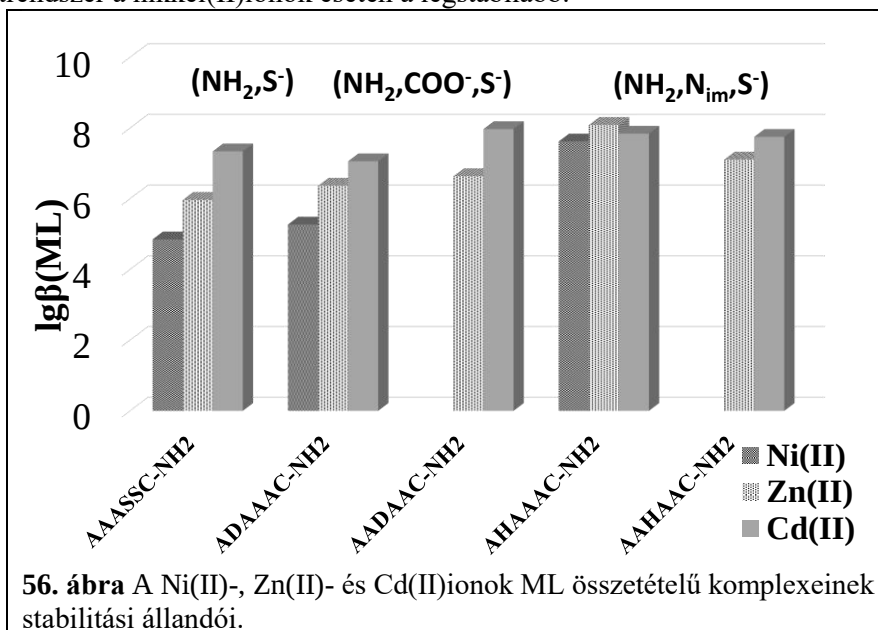


nitrogénje található. A következő lépés ezek deprotonálódása és koordinációja az ML összetételű komplex megjelenésével és az amidnitrogén deprotonálódás és koordináció ismételt a lúgos pH tartományba tolódik, amit az aromás imidazol protonok drasztikus kémiai eltolódása egyértelműen mutat. Az amidnitrogén koordinált részecske oldatbeli feltételezett szerkezetét DFT segítségével meghatároztuk és hasonló kötéstávolságokat kaptunk, mint a Pd(II):AAHAAC-NH₂ N(1) izomere esetén, amely egyértelműen utal a megegyező koordinációs környezetre. Ezen részecske ECD spektrumát összevetve a kísérleti spektrummal a 250 és 400 nm hullámhossztartományban két átmenetet jó relatív hibával tudtunk meghatározni, a 365 nm-nél megjelenő pozitív Cotton-effektust 4,3 %-os, míg a 267 nm-nél megjelenő pozitív Cotton-effektust 3,0 %-os hibával.

A két, hisztidint és ciszteint tartalmazó peptid oldategyensúlyi vizsgálata alapján elmondható, hogy a hisztidin jelenléte tovább növeli a képződő komplexek stabilitását a csak (NH₂,S⁻) koordinációjú AAASSC-NH₂, illetve az aszparaginsavat tartalmazó két peptidhez képest. Ugyanakkor a specifikus peptidszekvencia, amely a harmadik helyen hisztidint tartalmazó AAHAAC-NH₂ esetén alakul ki, már a nikkel(II)- és réz(II)ionok számára elsődleges kötőhelyet teremt a tiolátcsoporttal szemben. Az így kialakuló (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer már nem kedvező a palládium(II)ionoknak, a tiolátcsoporthoz való nagy affinitása, illetve a koordinációból származó energianyereség képes fedezni a keláthatás okozta energianyereség mértékét. A második helyen hisztidint tartalmazó peptid esetén az N-terminális csoport felőli koordináció kedvezményezett mind a réz(II)-, mind a nikkel(II)- és a cink(II)ionok számára is. A donortomok belépésének sorrendje a pH növelésével ugyanakkor különbözik a három fémion esetén. Míg réz(II)ionok

két koordinációs izomerhez tartozik. Összehasonlítva az N-terminális alanin metin csoportját a szabad ligandumot és a fémiont is tartalmazó rendszerekével, azok között jelentős kémiai eltolódás különbség van. Ennek megfelelően mindkét komplexben az N-terminális aminos csoport koordinált, míg a koordinációs szféra másik pozíciójában a tiolátcsoport vagy a hisztidin imidazol

jelenlétében az enyhén savas pH tartományban már kialakul a 3 N koordinációjú komplex és a tiolátcsoport koordinációja csak pH 7 felett következik be, addig a nikkel(II)- és cink(II)ionok esetén a terminális aminocsoport és az oldalláncbeli donorcsoportok szolgálnak elsődleges kötőhelyül, kialakítva az ML összetételű komplexet. A kadmium(II)ionok ML összetételű komplexekben szintén $(\text{NH}_2, \text{N}_{\text{im}}, \text{S}^-)$ koordináció valósul meg. A három fémion ML komplexekének stabilitási állandóit összevetve az Irwing-Williams sor megfordulását tapasztaljuk, nevezetesen a kadmium(II)ionok képezik a legnagyobb termodinamikai stabilitású komplexeket, amelyet a cink(II)- és végül a nikkel(II)-komplexek követnek. Ez a fajta trend jellemző a tiolátcsoportot tartalmazó ligandumok esetén és közvetett bizonyítékként szolgál a tiolátcsoport jelenlétének a koordinációs szférában. Az 56. ábra ezen stabilitásnövekedést mutatja be, ahol a különböző koordinációs módú nikkel(II), cink(II)- és kadmium(II) 1:1 összetételű komplexek egyensúlyi állandóit tüntettük fel. Fontos megjegyezni, hogy ez a fajta trend csak abban az esetben érvényes, ha makrokelát szerkezetű komplexeket hasonlítunk össze, ugyanis az $(\text{NH}_2, \text{S}^-)$ kelátrendszer a nikkel(II)ionok esetén a legstabilabb.



4.3. Két ciszteint tartalmazó peptidek átmenetifém komplexei

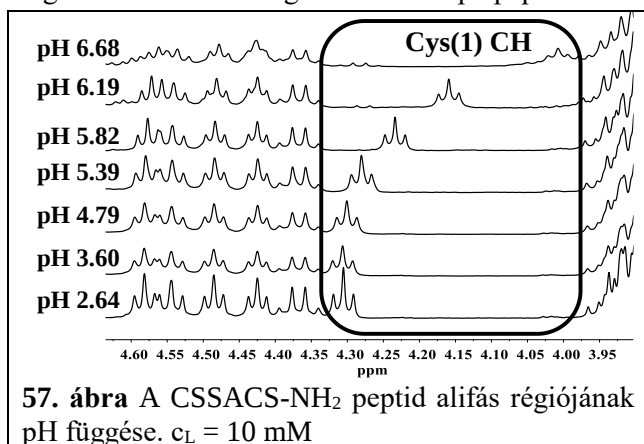
A két szintetizált peptid jelentős különbséget mutat abban az értelemben, a korábban előállított ligandumokhoz képest, hogy az alanin aminosavakat szerinekre cseréltük (6. ábra). Ennek legfőbb célja az oldékonyság növelése volt, ugyanis a Kutatócsoportunkban korábban előállított nagyobb tagszámú, csak alanint és két ciszteint tartalmazó peptidek gyakorlatilag oldhatatlanok voltak vízben. Az oldategyensúlyi és spektroszkópiai vizsgálatokat ugyanakkor csak kadmium(II)- és cink(II)ionok mellett végeztük el. Ennek oka, hogy a nikkel(II)ionok még nagy ligandumfelesleg esetén is oligomer szerkezetű komplexek megjelenését eredményezték, így az egyensúlyi és spektroszkópiai paraméterek meghatározása nem volt lehetséges. Másik különbségként említhető, hogy az eddig bemutatott peptidekben (kivételt ez alól az AAASSC-NH₂ képez), az egyik kötőhely mindig a peptidváz második, vagy harmadik pozíciójában volt található. A következőkben bemutatandó CSSACS-NH₂ ligandumban az egyik cisztein a peptid N-terminális pozíciójában található. Ennek oka a vizsgált fémionok jellege, ugyanis eddig egyik esetben sem sikerült kimutatni sem a cink(II)-, sem a kadmium(II)ionokkal két amidnitrogén fémion indukált deprotonálódását és koordinációját harmadik helyen ciszteint tartalmazó szabad N-terminusú peptidek esetén. Mivel a peptid C-terminális vége savamid csoportot tartalmaz, a távoli ciszteinnel nincs lehetőség (S⁻,O⁻) koordináció kialakítására, ugyanakkor koordinációs kémia szempontból érdekes lehet a peptid N-terminális vége az (NH₂,S⁻) 5-tagú kelát kialakulása szempontjából. Sav-bázis karakterüket tekintve mindkét ligandum három deprotonálódásra képes csoportot tartalmaz, az N-terminális aminocsoportot, illetve a két cisztein tiol-csoportjait. A ligandumok pK értékeit a 16. táblázat tartalmazza, kiegészítve a GlyCys és CysGly ligandumokra vonatkozó értékekkel. A táblázat adataiból látható, hogy a deprotonálódási lépcsők egymással jelentős mértékben átfednek, különösen a heptapeptid esetén, ahol a pK értékek mintegy másfél logaritmus egységen belül vannak.

16. táblázat A két ciszteint tartalmazó peptidek, illetve egy ciszteint tartalmazó dipeptidek deprotonálódási állandói (T = 298 K, I = 0,2 M KCl).

Részecske	CSSACS-NH ₂		ACSSACS-NH ₂		GlyCys ¹⁸⁸		CysGly ¹⁸⁸	
	logβ _{pqr}	pK	logβ _{pqr}	pK	logβ _{pqr}	pK	logβ _{pqr}	pK
[HL] ⁻	9,21(3)	9,21	9,01(1)	9,01	9,48	9,48	9,37	9,37
[H ₂ L]	17,56(1)	8,35	17,21(1)	8,20	17,52	8,04	16,31	6,94
[H ₃ L] ⁺	24,06(2)	6,50	24,69(1)	7,48	20,25	2,73	19,44	3,13

A szabad ligandumok pH függő NMR spektrumai alapján elmondható, hogy a jelek jelentős mértékben átfednek egymással, amely a mikroállandók meghatározását nem tette lehetővé, de az egyes csoportok relatív bázicitása ennek hiányában is megbecsülhető volt.

Ugyanakkor a heptapeptid N-terminusán található alanin metil protonján jól követhető az ammóniumcsoport deprotonálódása, amely alapján az első pK érték ($pK = 7,48$) nagyrészt ezen csoport deprotonálódásához rendelhető, amelyet a tiolcsoportok deprotonálódása követ két, egymással átfedő lépésekben. Ezek közül a kisebb pK érték ($pK = 8,20$) elsősorban az N-terminushoz közelebbi tiolcsoport deprotonálódásához rendelhető, amelyet korábban a GlyCys esetén a mikroállandók meghatározásával is bizonyítottak. A CSSACS-NH₂ ligandum első pK értéke megnövekedett savasságot mutat a heptapeptidhez képest. Ennek oka, hogy az első



deprotonálódási lépés a peptid N-terminusán kedvezményezett a létrejövő hattagú intramolekuláris hidrogénhíd miatt, amelyet a pH függő NMR spektrumok is bizonyítottak, a terminális cisztein alfa CH hidrogénjén ugyanis ez a deprotonálódási lépés jól követhető, amelyet az 57. ábra is mutat.

4.3.1. A CSSACS-NH₂ hexapeptid cink(II)- és kadmium(II)-komplexei

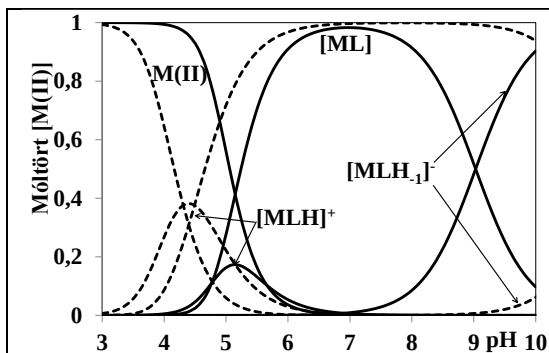
A pH-potenciometria adataiból származtatott stabilitási állandók a 17. táblázatban találhatóak meg. Csak mononukleáris, 1:1 arányú komplexek írhatóak le, egyensúlyi tekintetben a két rendszer nagyon hasonló, speciációjuk egyszerű (58. ábra).

17. táblázat A CSSACS-NH₂ és az ACSSACS-NH₂ cink(II)- és kadmium(II)-komplexeinek stabilitási állandója ($\lg\beta_{\text{pqr}}$) és származtatott állandói (T = 298 K, I = 0,2 M KCl (Zn(II)) és 0,2 M KNO₃ (Cd(II))).

Részecske	CSSACS-NH ₂		ACSSACS-NH ₂	
	Zn(II)	Cd(II)	Zn(II)	Cd(II)
[MLH] ⁺	16,79(2)	18,87(4)	17,00(4)	19,23(2)
[ML]	12,02(3)	14,38(3)	9,88(7)	11,98(5)
[MLH ₋₁] ⁻	2,99(9)	3,20(3)	1,92(6)	3,41(5)
[ML ₂ H ₂]			32,68(4)	34,35(9)
[ML ₂ H] ⁻			24,94(5)	26,40(10)
[ML ₂] ²⁻			16,80(4)	17,29(8)
log K ₁ /K ₂			2,96	6,67
log K ₁ /K ₂ (H)			1,32	4,11
pK (MLH/ML)	4,77	4,49	7,12	7,25
pK (ML/MLH ₋₁)	9,03	11,18	7,96	8,57
pK (ML ₂ H ₂ /ML ₂ H)			7,74	7,95
pK (ML ₂ H/ML ₂)			8,14	9,11

Az MLH összetételű komplexben a ligandum az N-terminális amino- és tioláts csoportján keresztül koordinálódik a fémionhoz, létrehozva egy öttagú kelátot. A képződő komplex kiugró stabilitású és képes indukálni a távoli tioláts csoport koordinációját, vagyis az ML komplex képződése egy kvázi kooperatív folyamat eredménye. Ezen C-terminus felőli tiols csoport deprotonálódását és koordinációját jellemző pK érték megnövekedett savasságot mutat a szabad ligandumhoz képest (17. táblázat). A stabilitási állandókat összevetve a korábban vizsgált egyszerű, N-terminuson ciszteint vagy penicillamint tartalmazó peptidek cink(II)- és kadmium(II)-komplexeivel elmondható, hogy a hexapeptiddel képződő komplexek nagyobb stabilitásúak, amely a másik tioláts csoport jelenlétével magyarázható a koordinációs szférában. Így például az L-cisztein¹⁹³ és CysGly¹⁸⁸ ZnL komplexeinek stabilitási állandója $\lg\beta = 8,20$, illetve $\lg\beta = 8,15$, míg a CysGly⁴³ CdL komplexe $\lg\beta = 9,84$, a D-penicillamin⁴³ pedig $\lg\beta = 11,53$. Ezek a kisebb stabilitási állandók egyértelműen jelzik, hogy a hexapeptid esetén a ligandum háromfokúan koordinálódik a fémionokhoz.

A létrejövő ML összetételű komplex széles pH tartományban egyedüli részecske, jelentős mértékben gátolja a fémion hidrolízisét és vegyes hidroxidokomplexek megjelenését. További különbségként említhető az egyszerű dipeptidekhez képest a biszkomplexek megjelenésének hiánya még nagy ligandumfelesleget tartalmazó mintákban is. N-terminális ciszteint tartalmazó dipeptidek esetén ligandumfelesleget

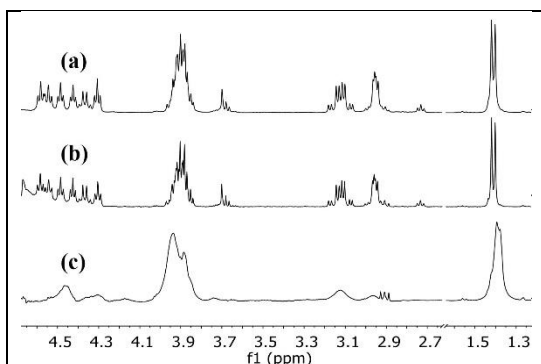


58. ábra A CSSACS-NH₂ peptid Zn(II)- (folytonos vonal) és Cd(II)-ionokkal (szaggatott vonal) alkotott komplexeinek eloszlása a pH függvényében 1:1 fémion/ligandum arányánál. $c_L = 3 \text{ mM}$

tartalmazó rendszerben nagy stabilitású biszkomplexek képződnek $2x(S^-, NH_2)$ koordinációs móddal. Az általunk vizsgált rendszerekben ezen biszkomplexek hiánya szintén a ligandum háromfogú koordinációjával magyarázható, ugyanis a létrejövő 5-tagú kelát, kiegészítve egy 18-tagú makrokeláttal sztérikus okok miatt akadályozza egy másik ligandum belépését a koordinációs szférába.

Másik okként említhető, hogy a vizsgált fémionok ezen rendszerekben torzult tetraédes geometriával jellemezhetők, amelyet a tiolátcsoportok koordinációja okoz.

A stabilitási állandók alapján feltételezett részecskék jelenlétét a spektroszkópai vizsgálatok is alátámasztották. Az 59. ábra a szabad ligandumot, illetve a fémionokat is tartalmazó rendszerekben pH 4,00-nál regisztrált NMR spektrumokat mutatja be.

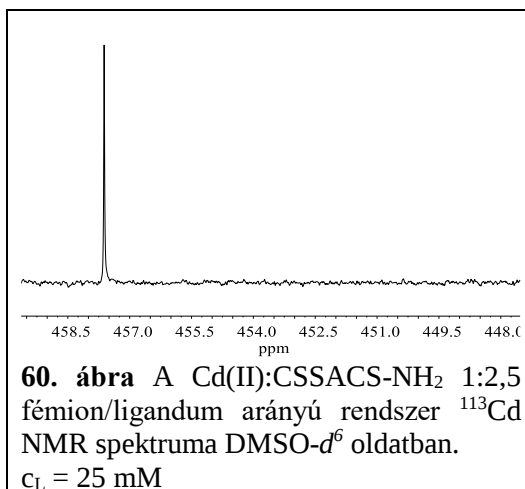


59. ábra A CSSACS-NH₂ (a), illetve a Zn(II)- (b) és Cd(II)-ionokat (c) tartalmazó ekvimoláris oldat ¹H NMR spektruma pH 4,00-on rögzítve. $c_L = 5 \text{ mM}$

Az ábrán jól látható, összhangban a speciációs görbével, hogy ezen a pH-n a kadmium(II)ionok már komplexben kötöttek, ugyanis a jelek jelentős szélesedése, illetve az alanin metilcsoportjának eltolódása következett be. Cink(II)ionok esetén az NMR spektrum teljes mértékben megfeleltethető a ligandum spektrumának, jelezve, hogy a cink(II) ezen a pH-n még nem komplexben kötött. pH 4,6 felett a cink(II)ionokat tartalmazó

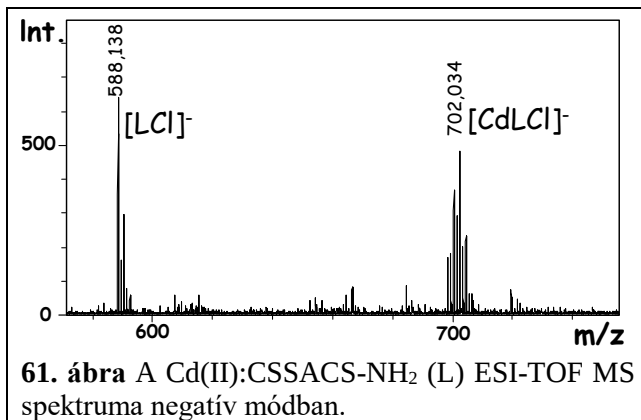
rendszerben is a jelek eltolódása és szélesedése figyelhető meg. Ez a fajta jelszélesedés megnehezíti az NMR spektrumok asszignációját, ugyanakkor bizonyos

tendencia levonható belőle. Nevezetesen pH 5 és 10 között az NMR spektrumokban semmilyen jelentős változás nem látható, utalva egyetlen részecske jelenlétére. Kadmium(II)ionok jelenlétében ^{113}Cd NMR segítségével bizonyítottuk az ML összetételű komplex koordinációs módját. Ebben a pontban fontos megemlíteni, hogy a ^{113}Cd NMR kémiai eltolódása rendkívül érzékeny a koordinálódó donorcsoportokra, egy tiolátcsoport koordinációja akár 100 ppm-mel is eltolhatja a rezonancia frekvenciát.



Emiatt előfordulhat, hogy egy egyensúlyi rendszerben, ahol több részecske is jelen van, rezonanciafrekvenciájuk pedig egymástól több száz ppm távolságra található, az egyes jelek közötti kémiai csere okozta jelszélesedés miatt az alapvonalban elvész a detektálható jel. A cserét emiatt be kell fagyasztani (vagy az NMR időskálájához mérten felgyorsítani), ami történhet oldószerváltással, vagy a hőmérséklet változtatásával. Habár a

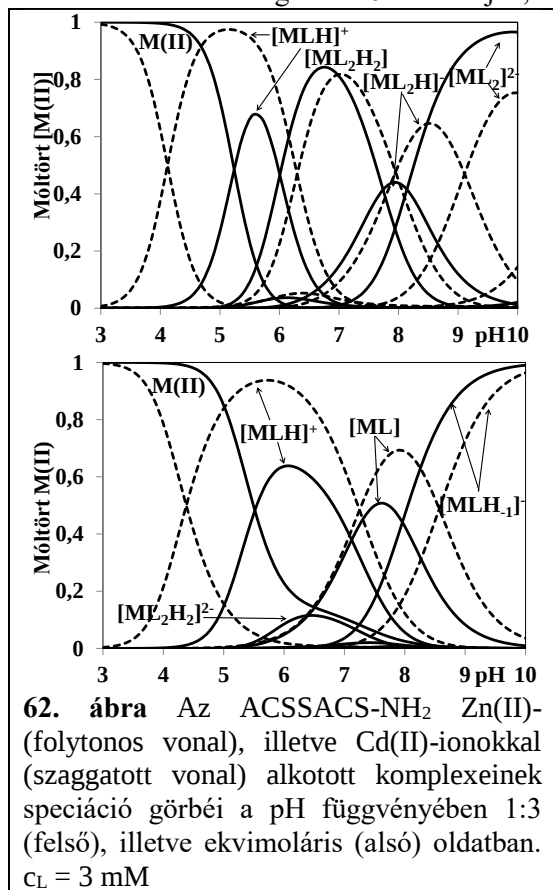
$\text{Cd(II):CSSACS-NH}_2$ rendszerben csak egyetlen részecske van jelen széles pH tartományban, detektálható jelet csak DMSO oldatban 1:2,5 fémion ligandum arány esetén kaptunk. Ennek oka lehet, hogy a háromfogú koordináció által a kadmium(II) koordinációs szférája telítetlen és a koordinált vízmolekula és külső szférás vízmolekula közötti csere jelvesztést okoz. A komplex DMSO oldata megakadályozza ezt a cserét, hiszen a külső szférában DMSO található, amely éles rezonanciajel megjelenését teszi lehetővé. A 458 ppm-nél detektált szingulett jól megfelel az $(\text{NH}_2, \text{S}^-, \text{S}^-)$ koordinációs módra közölt irodalmi adatnak¹⁹⁴.



ESI-MS segítségével szintén sikerült alátámasztani a cink(II)- és kadmium(II)-rendszerekben a monokomplex jelenlétét, reprezentatív példaként a kadmium(II):CSSACS- NH_2 rendszer tömegspektruma látható a 61. ábrán.

4.3.2. Az ACSSACS-NH₂ komplexképző sajátossága cink(II)- és kadmium(II)ionokkal

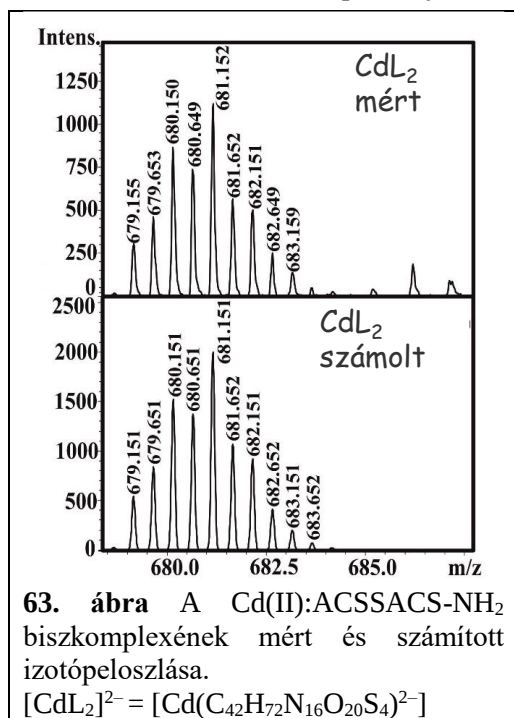
A ligandum cink(II)- és kadmium(II)ionokkal alkotott komplexeinek stabilitási állandóit a 17. táblázat tartalmazza. A táblázat adatiból jól látható, hogy a két fémion jelenlétében a komplexképződési folyamatok nagyon hasonlóak. A ligandumfeleslegben és ekvimoláris oldatban számolt speciációs görbe a 62. ábrán látható. Az eloszlási görbék azt mutatják, hogy a komplexképződés a protonált



részecskék (ML_2H_2 , illetve MLH) megjelenésével kezdődik, cink(II) esetén $pH \sim 4,5$ -től, míg kadmium(II)ionoknál $pH \sim 3,5$ -től. Ezekben a komplexekben a ligandum kétfogú koordinációja valósul meg. Mivel a CSSACS-NH₂ peptidtől eltérően itt nincs lehetőség 5-tagú kelát kialakulására (NH_2, S^-) koordinációval, az N-terminális aminocsoport vagy a tiolcsoport egyike protonált. A protonált komplexek deprotonálódási állandói szintén megtalálhatóak a 17. táblázatban. A lépcsőzetes stabilitási állandók aránya ($\log K_1/K_2$ és $\log K_1/K_2(H)$) további információt szolgáltat a mono- és biszkomplexek szerkezetéről. A 17. táblázat ezen értékei alapján a kadmium(II)-komplexek lépcsőzetes stabilitási állandóinak arányai szokatlanul nagyok, amelyből arra

következtethetünk, hogy a koordinációs mód a két fémion esetén különbözik. Ez a különbség eredhet a koordinációs szám különbségéből. Ezen túlmenően adott fémion esetén a két értéket összehasonlítva egyértelmű, hogy a $\log K_1/K_2$ értékének növekedése a ligandum háromfogú koordinációjára utal. NMR spektroszkópia segítségével további információ nyerhető a koordinációs módról. A protonált komplexek szerkezetét tekintve az ¹H NMR spektrumok alapján a közbelső helyen lévő alanin metil protonok széles pH tartományban, pH 6-10 között, semmilyen változást nem mutatnak, míg az N-terminális alanin metil csoportjának kémiai eltolódásában változás ott következik be, ahol a szabad liganduméban is. Ezek alapján

a protonált komplexekben a ligandum kétfogúan, a tiolát donorcsoportokon keresztül koordinálódik a fémionhoz és az N-terminális aminos csoportnak nincs jelentős hozzájárulása a fémion megkötéséhez. Ezen kétfogú koordináció következménye az is – szemben a hexapeptiddel –, hogy heptapeptid esetén megjelennek a biszkomplexek is. ESI-MS segítségével ligandumfelesleget tartalmazó mintában mindkét fémion esetén kimutattuk a biszkomplexek jelenlétét (63. ábra).



Általánosan tehát az ML összetételű komplexekben a ligandum háromfogú koordinációja valósul meg, míg az ML_2 összetételű komplexekben szintén háromfogú a két ligandum koordinációja, de az N-terminális aminos csoport csak gyengén koordinált. Ekvimoláris oldatban egy extra lúgfogyasztó folyamat MLH_{-1} összetételű komplex megjelenését eredményezi. Ez a részecske cink(II)ionok esetén pH 7,5 felett, míg kadmium(II)ionoknál pH 8 felett domináns. Megegyező sztöchiometriájú komplex képződik a hexapeptidet tartalmazó rendszerben is, amely vegyes hidroxidokomplex megjelenésével magyarázható, de csak pH 10,2 felett. A

telítetlen koordinációs szféra magyarázná a heptapeptid jelenlétében is ennek a vegyes hidroxidokomplexnek a megjelenését, de az egyensúlyi adatok összehasonlítása más rendszerekkel, illetve a spektroszkópia módszerek kombinált alkalmazása más folyamatra enged következtetni.

Egyensúlyi tekintetben az $\text{ML} \rightarrow \text{MLH}_{-1}$ folyamatot jellemző pK érték különbözik a hexa- és heptapeptid esetén és eltér más, N- és C-terminálisan szabad, vagy védett Ac-Xaa-Cys-...- típusú peptidektől. Ezen deprotonálódást jellemző pK értékeket foglalja össze a 18. táblázat.

18. táblázat Az $ML \rightarrow MLH_{-1}$ folyamatot jellemző pK értékek egyes cink(II)- és kadmium(II)-komplexekben.

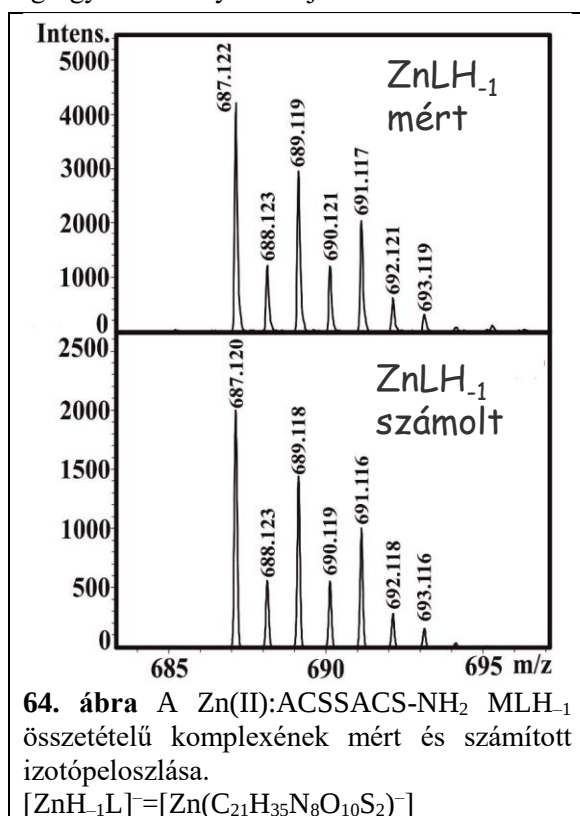
Ligandum	Zn(II)	Cd(II)
ACSSACS	7,96	8,57
CSSACS-NH ₂	9,03	11,18
Ac-SCHGDQGSDCSI-NH ₂ ⁴⁸	7,37	-
AlaCys	10,18 ^a	10,83
AlaAlaCys	9,16 ^a	10,61

^apK(ZnL₂/ZnL₂H₋₁)

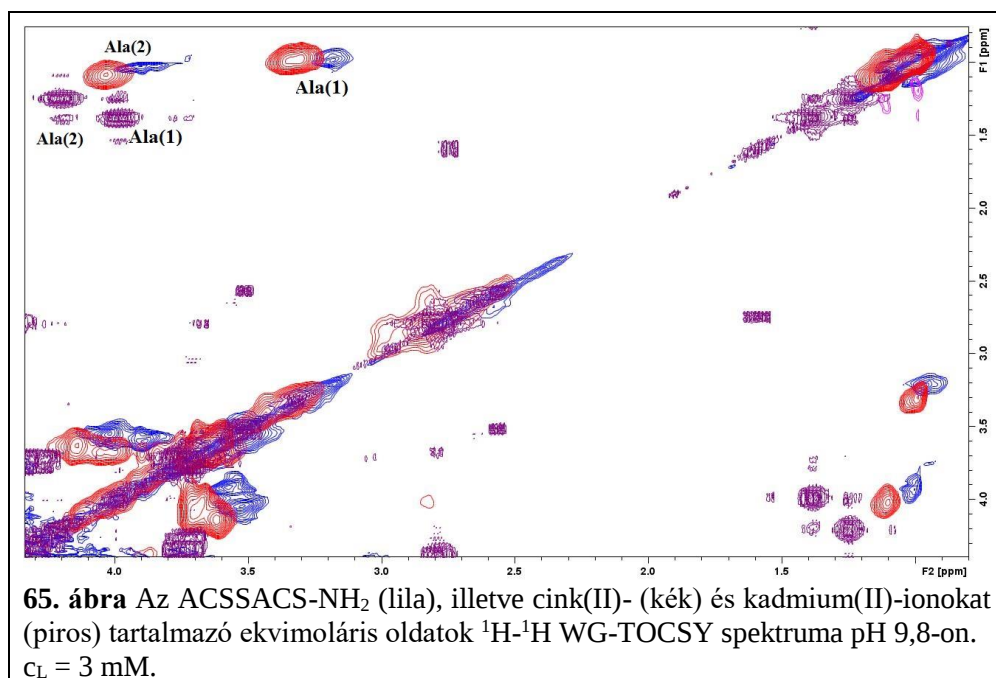
A táblázat adatai alapján egyértelmű, hogy a heptapeptid MLH_{-1} komplexének képződése kisebb pH tartományba tolódik más, ciszteint is tartalmazó ligandumok cink(II)- és kadmium(II)-komplexeihez képest, ahol az MLH_{-1} összetételű komplexek vegyes hidroxidokomplexek. Így tehát az MLH_{-1} sztöchiometriájú komplexben az egyensúlyi adatok összevetése két dologra enged következtetni: a komplexben a koordinált vízmolekula deprotonálódása kedvezményezett vagy olyan légfogyasztó folyamat játszódik le a fémion jelenlétében, amely a szabad

ligandumban nem. Ez pedig lehet a peptidváz egy amidnitrogénjének fémion indukált deprotonálódása és koordinációja.

A komplexről további információt az ESI-MS szolgáltatott. A 64. ábrán látható tömegspektrumot pH 9,84 rögzítettük mind a cink(II), mind pedig a kadmium(II)ionokat és ligandumot 1:1 arányban tartalmazó rendszerekben. A mért és számított izotópeloszlás alapján elmondható, hogy a detektált komplex MLH_{-1} sztöchiometriája nem feleltethető meg a vegyes hidroxidokomplex sztöchiometriájának, amely újabb bizonyítékkul szolgálhat az amidnitrogén koordinációjára.



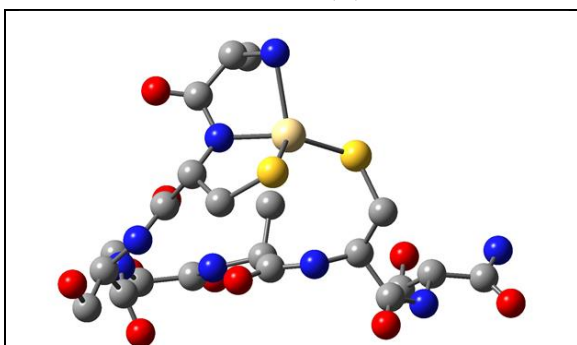
Figyelembe véve a peptid szekvenciáját az $\text{NH}_2\text{-Ala-Cys-}$ motívum kiegészítve egy távoli tiolát koordinációjával teremthet olyan töltésviszonyokat, amelyek megnövelik a peptidváz első amidnitrogénjének savasságát, így elősegítve annak deprotonálódását és koordinációját. Ezen feltételezés alapján a deprotonálódás miatt megjelenő negatív töltés jelentős változást kell hogy okozzon az N-terminális pozícióban lévő alanin kémiai eltolódásában. A 65. ábrán a szabad ligandum, illetve a cink(II) és kadmiumot(II) tartalmazó minták vízelnyomásos TOCSY spektrumait tartalmazza.



Az ábrán egyértelműen látható a negatív töltés hatására az N-terminális alanin metil csoportjának drasztikus kémiai eltolódása a szabad ligandumhoz képest. A spektrumok kiértékelését jelentősen megnehezíti a fémiont tartalmazó rendszerekben a jelek szélesedése. Mivel a vizsgált fémionok diamágneses sajátságúak, a jelek szélesedése a transzverzális, vagy spin-spin relaxáció gyorsulását jelzik.

Ennek egyik oka lehet a koordinációs izomerek jelenléte és az azok közötti csere. Ugyanakkor a hőmérséklet változtatása nem okoz jelentős változást a $0^\circ\text{C} - 25^\circ\text{C}$ hőmérséklet tartományban, amely arra enged következtetni, hogy nem a koordinációs izomerek közötti csere okozza a jelek szélesedését, hanem a rotációs korrelációs idő növekedése. A szabad ligandum esetén ez a rotációs korrelációs idő gyors, a jelek élesek, ugyanakkor a cink(II)- és kadmium(II)ionok koordinációjával kialakuló csatolt kelátrendszer kiegészítve a távoli cisztein kötődésével csökkenti a lokális rotációs mozgást és egy hosszú, totális rotációs korrelációs idő határozza meg a protonok relaxációját.

A komplexek lassú mozgása miatt diffúzió NMR segítségével meghatároztuk a translációs diffúziós állandót és a részecskék látszólagos hidrodinamikai sugarát. Ennek megfelelően lúgos pH tartományban a szabad ligandum diffúziós állandója $D = 4,5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, amelyből a látszólagos hidrodinamikai sugár $R_H = 0,6 \text{ nm}$. Ez a kis méret azt mutatja, hogy a szabad ligandum intramolekuláris hidrogénhidak által stabilizált, feltekeredett szerkezetű, amely hidrogénkötések feltehetően a szerin aminosavak oldalláncbeli hidroxilcsoportja miatt alakulhatnak ki. Cink(II) vagy kadmium(II) hozzáadásával a részecske diffúziós állandója csökken, $D_{Zn} = 3,2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, illetve $D_{Cd} = 2,8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Ezen értékekből a látszólagos hidrodinamikai sugár $R_{Zn} = 0,8 \text{ nm}$, illetve $R_{Cd} = 0,9 \text{ nm}$. A látszólagos hidrodinamikai sugár növekedése arra enged következtetni, hogy a fémion koordinációja megtöri a ligandum intramolekuláris hidrogénhid hálózatát, amely a méret növekedését okozza. Általánosan tehát elmondható, hogy a ^1H NMR segítségével igazolható, hogy a cink(II)- és kadmium(II)-komplexek hasonló oldatszerkezettel, így hasonló termodinamikai tulajdonságokkal is rendelkeznek. A kadmium(II):ACSSACS-NH₂ MLH₋₁ összetételű komplexének vizes közegben számolt DFT optimált szerkezete a 66. ábrán látható. Az ábrán egyértelműen látszik, hogy a fémion egy torzult tetraédres geometriával jellemezhető, amely a tiolátdonorcsoportok koordinációjával magyarázható.



66. ábra A Cd(II):ACSSACS-NH₂ MLH₋₁ összetételű komplexének DFT optimált szerkezete. B3LYP/GEN

A cink(II)ionok esetén eddig a fémion indukált deprotonálódást szabad N-terminális NH₂-Xaa-His.. szekvenciájú peptidekben, illetve egyéb, multihisztidint és aszparaginsavat tartalmazó peptidek esetén mutatták ki. Terminálisan védett ciszteint tartalmazó peptidekben hasonló koordinációs kémiai környezetben ezt az effektust még nem mutatták ki, így a folyamat lejátszódása a szabad N-terminális aminos csoport és a két cisztein tiolátcsoportjának együttes jelenlétével magyarázható, amely megteremti a fémion számára kedvező (NH₂,N⁻,S⁻) + S⁻ koordinációs módot. Kadmium(II) esetén az irodalomban nem található példa fémion indukált amidnitrogén deprotonálódásra és koordinációra. Egyedül a nikkel(II)ionokkal mutatták ki hasonló amidnitrogén koordinált részecskét AlaCys, vagy GlyCys szekvenciájú peptidekben. Fontos megjegyezni, hogy C-terminuson szabad peptidekben a kadmium(II)ionok stabil 6-tagú kelátot képeznek az (S⁻,COO⁻) koordináció által. Az ACSSACS-NH₂ peptidben a C-terminális rész

védett, ugyanakkor a specifikus szekvencia az $\text{NH}_2\text{-Ala-Cys-}$ motívummal, amely kiegészül egy távoli tiolát makrokelát koordinációjával okozhatja a peptidváz kadmium(II) indukált deprotonálódását és koordinációját.

Összefoglalva a két, szabad N-terminust és két ciszteint tartalmazó peptidek cink(II)- és kadmium(II)ionokkal alkotott komplexeinek eredményeit, elmondhatjuk, hogy ezen ligandumok nagyon hatékony fémmegkötőnek bizonyultak. A CSSACS- NH_2 esetén kialakuló (N,S) 5-tagú kelát kiegészítve a távoli cisztein kötődésével nagy stabilitású komplex megjelenését teszi lehetővé. Ez a háromfogú koordináció teljes mértékben visszaszorítja a kadmium(II)ionok hidrolízisét, attól függetlenül, hogy a tetraéderes elrendeződésű kristálytérben a negyedik koordinációs helyet vízmolekula foglalja el, míg cink(II)ionoknál is jelentősen eltolódik ez a folyamat a lúgos pH tartományba.

Az ACSSACS- NH_2 ligandumban ezen csatolt (N,S) kelát kialakulására már nincs lehetőség, ami miatt mindkét fémion esetén a kéndonoratom preferencia érvényesül és a tiolát csoportok szolgáltatják mind a kadmium(II), mind pedig a cink(II) számára az elsődleges kötőhelyet. Ennek megfelelően ligandumfelesleget tartalmazó oldatban biszligandumú komplexek képződése is tapasztalható. Ekvimoláris oldatban ugyanakkor az N-terminális aminos csoport és a két tiolátcsoport koordinációjának eredményeképpen az elektronsűrűség olyan mértékben megváltozik, hogy az N-terminustól számolt első amidnitrogén savassága megnő és egyedülálló módon következik be a cink(II)-, illetve kadmium(II) indukált amidnitrogén deprotonálódás és koordináció.

4.4. A tiolátcsoport hatása a vizsgált peptidek komplexképző sajátosságaira

Az eredmények összefoglalása előtt indokolt olyan általános következtetések levonása, amelyek a C-terminális tiolátcsoport hatását mutatják be a vizsgált peptidek átmenetifém komplexeiben. Emiatt a következő pontokban fémiononként mutatjuk be ezen effektusokat.

Nikkel(II)ionok:

- (i) Csak N-terminális aminocsoportot tartalmazó peptidben a C-terminális cisztein tiolátcsoportja az elsődleges fémkötőhely és az aminocsoport koordinációja makrokelát szerkezetet eredményez.
- (ii) Az aszparaginsav peptidvázbeli második, vagy harmadik pozíciója már segíti a nikkel(II) kötődését az N-terminális régióhoz, ez a hatás ugyanakkor még összemérhető a C-terminális domén fémionaffinitásával is, így izomer szerkezetek képződése tapasztalható.
- (iii) A hisztidin jelenléte a peptid N-terminális régiójában már azt eredményezi, hogy a fémion elsődleges kötőhelye az a domén lesz, ami miatt a tiolátcsoport kötődése csak akkor valósulhat meg, ha a fémion feleslegben van, vagy ha a koordinációs szférája telítetlen.
- (iv) A fentiek alapján egyértelmű, hogy az N-terminális aminosavak minőségének változtatásával egy szelektív szabályzásra nyílik lehetőség.

Réz(II)ionok:

- (i) A réz(II)ionok és tiolátcsoportot tartalmazó ligandumok között ismert a redoxi reakció, amelynek során a fémcentrum redukálódik. Ugyanakkor az albumin-szerű szekvenciát tartalmazó ligandumok, mint a vizsgált AAHAAC-NH₂ peptid, képesek védeni a fémiont a redukciótól.
- (ii) A réz(II)-tiolát koordinatív kölcsönhatás ugyanakkor megvalósítható, ha a fémion koordinációs szférája telítetlen. A vizsgált AHAAAC-NH₂ peptidben a kialakuló (NH₂,N⁻,N_{im}) koordináció kellő mértékben megváltoztatja a réz(II)/réz(I) redukciós potenciált, aminek eredményeképpen a tiolátcsoport redoxi tulajdonsága háttérbe szorul és a réz(II) szabad koordinációs helyét koordinatív telíteni tudja.
- (iii) A fenti effektusok az N-terminuson aszparaginsavat tartalmazó peptidek esetén nem tudnak megvalósulni, aminek eredményeképpen a fémion redukciója következik be.

Palládium(II)ionok:

- (i) Palládium(II)ionok számára az elsődleges kötőhelyet a tiolátcsoporthoz jelenti.
- (ii) A tiolátcsoporthoz koordinációjának eredményeképpen, illetve a terminális aminosocsoport és hisztidin imidazol koordinációjával kialakuló háromfogú koordinációval az amidnitrogén deprotonálódás és koordináció a semlegeshez közeli pH tartományba tolható.

Cink(II)ionok:

- (i) A cink(II)ionok számára a fémion elsődleges kötőhelye a tiolátcsoporthoz.
- (ii) Emiatt az N-terminális régióban található donorcsoportok a képződő makrokelát szerkezetű komplexek stabilitását az alábbi donoratom sorrendben növelik: $\beta\text{-COO}^- < \text{N}_{\text{im}} < \text{S}^-$.
- (iii) Önmagában a C-terminális pozícióban lévő cisztein tiolátcsoporthoz és a terminális aminosocsoport nem képes biszligandumú komplexek képzésére és ez a megállapítás tehető az aszparaginsavat tartalmazó peptidek esetén is. A hisztidin jelenléte ugyanakkor már lehetővé teszi a biszkomplexek képződését. Ennek oka lehet, hogy mivel a cink(II)ionok esetén nincs kitüntetett geometria -hiszen a d^{10} elektronszerkezetnek köszönhetően nincs ebből adódó CFSE (kritstálytér stabilizációs energia) energianyereség-, az aszparaginsavat tartalmazó peptidekben tetraédes geometria alakul ki. Ez az elrendezés akadályozza egy másik ligandum belépését a koordinációs szférába. Ezzel szemben a hisztidint tartalmazó peptideknél már oktaédes geometria valósul meg, aminek eredményeképpen lehetőség van biszkomplexek képződésére.
- (iv) A specifikus AlaHisXaa szekvencia lehetővé teszi az amidnitrogén deprotonálódást, ami miatt a fémion az N-terminushoz kötődik, amelyet a tiolátcsoporthoz makrokelátja egészít ki.
- (v) Hasonló hatás érhető el az AlaCysXaa...YaaCys szekvenciával is.

Kadmium(II)ionok:

- (i) Hasonlóan a cink(II)ionokhoz, a tiolátcsoporthoz az elsődleges fémkötőhely, ugyanakkor a cink(II), kadmium(II) viszonylatban utóbbi komplexek stabilitási állandója 1-2 log egységgel nagyobb, amely a kadmium(II) nagyobb S-donoratom preferenciájával magyarázható.
- (ii) Újabb donoratomok jelenléte a koordinációs szférában a képződő komplexek stabilitását, hasonlóan a cink(II)-komplexekhez, az $\beta\text{-COO}^- < \text{N}_{\text{im}} < \text{S}^-$ sorrendben növeli.

A tiolátcsoporthatása oldalláncban egyéb donorcsoportot tartalmazó peptidek komplexképző sajátosságaira

- (iii) Ellentétben a cink(II)ionoktól, biszkomplexek képződése már az aszpraginsavat tartalmazó peptidek esetén is megvalósul, habár itt sincs a CFSE-ből származó energianyereség.
- (iv) A terminális aminos csoport, illetve a két tiolátcsoporth jelenléte nagy stabilitású komplexek megjelenését eredményezi.
- (v) A specifikus AlaCysXaa szekvencia, kiegészítve a távoli tiolát makrokelátjával lehetőséget ad az N-terminustól számított első amidnitrogén deprotonálódására és koordinációjára.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A biológiai rendszerekben előforduló fehérjék legfontosabb fémionkötő helyei a hisztidin imidazol nitrogénje, az aszparaginsav vagy glutaminsav karboxilátcsoportja, illetve a cisztein tiolátcsoportja. A fémionok ezen oldalláncokhoz kötődve tudják betölteni enzimatis vagy szerkezetalakító funkcióikat vagy éppen szerepet játszhatnak bizonyos neurodegeneratív betegségekben. Ezen funkciók pontos megértéséhez ugyanakkor elengedhetetlen olyan kistagszámú peptidek vizsgálata, amelyek elkülönülten tartalmazzák a fémionok legfontosabb kötőhelyeit. A modern szervetlen kémiában emellett egyre nagyobb teret hódítanak az elméleti kémiai számítások is, azonban a fémion – kistagszámú peptid rendszerekre még nem sok esetben alkalmazták.

Így munkánk első felében célul tűztük ki nikkel(II)-komplexek elméleti kémiai vizsgálatát sűrűségfukcionál-elmélet alkalmazásával, annak érdekében, hogy választ adjunk arra, hogy egy adott rendszer mennyire jól vizsgálható ezen módszerrel, illetve TD-DFT segítségével kívántuk egyes komplexek UV-látható spektrumát számolni. Ennek érdekében egyensúlyi és spektroszkópiai módszerekkel már széles körben jellemzett rendszerek vizsgálatát végeztük el, nevezetesen a nikkel(II)ionok négy egyszerű oligopeptiddel (glicil-glicil-glicin, glicil-glicil-glicil-glicin, glicil-glicil-hisztidin és glicil-glicil-cisztein) alkotott síknégyzetes, diamágnese karakterű komplexeit vizsgáltuk.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a DFT módszer alkalmas ilyen kistagszámú peptid fémion kölcsönhatások vizsgálatára. Összesen hét különböző funkcionállal def2-TZVP báziskészlet alkalmazása mellett végeztük el a lúgos pH tartományban képződő, maximálisan koordinált nikkel(II)-komplexek geometriaoptimalását gáz, illetve PCM oldószermodell alkalmazása mellett, ahol az oldószer víz volt. Megállapítottuk, hogy az egyes funkcionálok alkalmazása nincs jelentős hatással a különböző módon számított nikkel(II) donatorom távolságokra, illetve kötésszög értékekre. Egy esetben rendelkezésünkre álltak egykristály diffrakcióból származó távolságadatok és kötésszög értékek is, amelyek jó egyezésben voltak a számításokból nyert paraméterekkel.

TD-DFT segítségével számítottuk az optimált komplexek UV-látható spektrumát. Összesen kilenc funkcionált teszteltünk két báziskészlettel. A kapott spektrumokat összevetettük a kísérletileg kapott spektrumokkal és megállapítottuk, hogy a HSE06, PBE0 funkcionál, illetve az ahhoz nagyon hasonló mPW1PW91 funkcionál rendkívül jó relatív hibával adja vissza a kísérleti spektrumot, de a gradienssel korrigált B3LYP és B3P86, valamint a távolság szeparált CAM-B3LYP is jól alkalmazható ilyen rendszerekben spektrumszimulációra. Megállapítottuk, hogy bár a LANL2DZ báziskészlet jelentősen lerövidíti a számítási időt, amely gyakorlati szempontból

fontos lehet, az abszorpciós maximumok relatív hibái ezen báziskészlet alkalmazása mellett több esetben nagyobbak, mint a def2-TZVP esetén. Ezek alapján általánosan elmondható, hogy a DFT módszer alkalmas kistagszámú peptid fémion kölcsönhatások vizsgálatára, illetve spektrumszimulációkra, így a továbbiakban jól alkalmazható új rendszerek spektrális tulajdonságainak értelmezésében is.

Munkánk második felében különböző, C-terminuson ciszteint tartalmazó peptidek komplexképző sajátosságait vizsgáltuk átmenetifémionokkal. Ennek során arra kerestük a választ, hogy hogyan szabályozható a peptid C-terminális régiójához való kötődés abban az esetben, ha a peptid N-terminális régiója is erős fémkötő domént tartalmaz. Ennek legegyszerűbb ligandumát a csak N-terminális aminocsoportot tartalmazó AAASSC-NH₂ jelentette. Megállapítottuk, hogy a C-terminális cisztein horgonycsoportként köti a nikkel(II)iont, elősegítve a megelőző amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját. Ezzel szemben a cink(II)- és kadmium(II)ionoknál csak kétfogú (S,N) koordináció valósul meg és a savas pH tartományban megjelenő protonált komplexben a tiolátcsoport a fémionok elsődleges kötőhelye.

A két, aszparaginsavat is tartalmazó peptid esetén a karboxilátcsoport kötődésének eredményeképpen az N-terminális régió is preferált kötőhelyként szolgál nikkel(II)ionok számára és az enyhén savas pH tartományban, illetve semleges és ahhoz közeli pH-n fő kötőhelye a fémionnak. Lúgos pH tartományban a tiolátcsoport deprotonálódásának hatására koordinációs izomerek megjelenése tapasztalható, amelyben mind az N-terminális, mind pedig a C-terminális doménhez kötődik a fémion. CD spektroszkópia segítségével az egyes izomerek százalékos aránya is megadható volt. A cink(II)- és kadmium(II)ionokat tartalmazó rendszerekben a ligandum háromfogú koordinációjával képződő komplexek nagyobb stabilitásúak, mint a csak (NH₂,S⁻) koordinációjú AAASSC-NH₂ peptid esetén. Ezen komplexekben a tiolátcsoport és a karboxilátcsoport a fémionok elsődleges kötőhelye, amelyet az aminocsoport deprotonálódása és koordinációja követ. Ez a háromfogú koordináció a cink(II) tetraéderes elrendeződésű koordinációs szférájában nem teszi lehetővé biszligandumú komplexek megjelenését, ugyanakkor a kadmium(II)ionokat tartalmazó rendszerben a fémion oktaéderes geometriájának köszönhetően már biszkomplexek képződését is kimutattuk.

A hisztidint és ciszteint is tartalmazó peptidek nikkel(II)-komplexeiben az N-terminális régió preferenciája egyértelmű a létrejövő (NH₂,N⁻,N_{im}) vagy (NH₂,N⁻,N⁻,N_{im}) koordinált részecske megjelenése miatt. Az utóbbi albumin-szerű kötőmód eredményeképpen a peptid C-terminusának cisztein tiolátcsoportja egy másik fémion független kötőhelyéül szolgál, míg előbbiben a koordinációs szféra telítetlen, amelynek eredményeképpen a távoli tiolátcsoport koordinációja valósul meg makrokelát szerkezetű komplexet létrehozva.

A cink(II)ionok AHAAAC-NH₂ peptiddel alkotott komplexekben a komplexképződés hasonló a nikkel(II)ionoknál megfigyelt tapasztalatokhoz, a specifikus NH₂-Ala-His-Xaa.. szekvencia lehetővé teszi az N-terminus felőli első amidnitrogén deprotonálódását és koordinációját, amelyet a tiolát kötődése egészít ki makrokelát szerkezetű komplexet létrehozva. Hasonló hatást a kadmium(II)ionok esetén nem figyeltünk meg. Ugyanakkor az imidazol koordinációja növeli a képződő CdL komplexek stabilitását, valamint biszkomplexek képződését is tapasztaltuk mind az AHAAAC-NH₂, mind pedig az AAHAAC-NH₂ rendszerben.

A fent említett két ligandum komplexképző sajátosságait palládium(II)- és réz(II)ionokkal is vizsgáltuk. A réz(II)ionok a vizsgált pH tartományban nem mutattak redoxi reakciót a tiolátcsoporttal, holott hajlamuk igen nagy rá. Ez azzal magyarázható, hogy az AAHAAC-NH₂ ligandummal enyhén savas pH tartományban kialakuló albumin-szerű koordináció képes védeni a réz(II)ionokat a tiolátcsoport redukciójától a réz(II)/réz(I) redukciós potenciál megváltoztatása által. Ezzel szemben az AHAAAC-NH₂ peptidben kialakuló (NH₂,N⁻,N_{im}) koordinációt a tiolát kötődésével létrejövő makrokelát egészíti ki, amelyet egy vegyes rendszer vizsgálatával is igazolni tudtunk. Palládium(II)ionoknál az albumin-szerű (5,5,6) csatolt kelátrendszer kialakulására nem volt lehetőség a tiolátcsoport koordinációja miatt. Ennek megfelelően csak egy amidnitrogén koordinációja valósult meg, amelyet a számított és mért ECD spektrumok jó egyezésével is bizonyítani tudtunk. Az AHAAAC-NH₂ peptid palládium(II)-komplexeiben a komplexképződési folyamatok hasonlóak a cink(II)- és nikkel(II)ionoknál tapasztaltakhoz, habár a képződő komplexek stabilitása számottevően nagyobb. Érdekes tény mindkét ligandum palládium(II)-komplexeit illetően, hogy az amidnitrogén deprotonálódás és koordináció a háromfogú (NH₂,N_{im},S⁻) koordináció miatt eltolódott pH ~ 6 tartományba, amely igen szokatlan a korábban vizsgált palládium(II)-peptid rendszerekben tapasztaltakhoz képest. Egyszerűbb peptidekben az amidnitrogén koordinált részecskék már erősen savas pH 2-3 közötti tartományban kialakultak.

A két, két ciszteint tartalmazó peptid (CSSACS-NH₂ és ACSSACS-NH₂) esetén vizsgálataink csak a cink(II)-, illetve kadmium(II)ionokat tartalmazó rendszerekkel történtek. Az N-terminális ciszteint tartalmazó peptidben (CSSACS-NH₂) az amino- és tiolátcsoport koordinációjával lehetőség van öttagú kelátgyűrű kialakulására, amelyet a távoli cisztein koordinációja egészít ki. Ez nagy stabilitású komplexek megjelenését eredményezi, mely széles pH tartományban gátolja a fémionok hidrolízisét, illetve megakadályozza biszkomplexek képződését is. Ezzel szemben a második helyen ciszteint tartalmazó peptid kadmium(II)- és cink(II)ionokkal alkotott komplexekben nincs lehetőség ezen kelátrendszer kialakulására, ami miatt a cink(II)- és kadmium(II) S-donoratom preferenciája érvényesül. Ezért a komplexképződés során a fémionok elsődleges kötőhelyei a tiolátcsoportok, amelyet az N-terminális

aminocsoport koordinációja követ. Ez ligandumfelesleget tartalmazó oldatokban lehetővé teszi biszkomplexek képződését is, ekvimoláris oldatban ugyanakkor speciális komplexkémiail viselkedést eredményez, nevezetesen a kadmium(II)-, illetve cink(II) indukált amidnitrogén deprotonálódást és koordinációt.

Eredményeink alapján bemutattuk, hogy hogyan változtatható a peptid N-, illetve C-terminális régiójához való kötődés. Ez lehetőséget adhat annak megismerésére, hogy metalloproteinekben, metalloenzimekben hogyan alakulnak ki azon szelektív kötésmódok, amelyekkel egy enzim betöltheti aktív funkcióját. Másrészt a modern bioszervetlen kémiában egyre gyakoribb ún. *de novo* tervezett peptidek, illetve olyan ún. *chimera* típusú peptidek tudatos tervezésére nyílik lehetőség, amelyben akár a dolgozatban bemutatott szelektív szabályozáson keresztül irányítható a fémion peptidekhez történő kötődése, affinitása.

6. SUMMARY

The imidazole nitrogen of histidine, the carboxylate group of aspartic or glutamic acids and the thiolate group of cysteine are the most important metal binding sites for proteins in biological systems. The metal ions bounded to these side chains are able to operate their enzymatic or structural functions and may play role in neurodegenerative disorders. For better understanding of these interactions it is indispensable to investigate small modelpeptides containing separately these metal binding domains. In the case of modern inorganic chemistry the interpretation of results based on theoretical chemistry is frequently used, but, the interaction between metal ions and small peptides have been rarely investigated by using this method.

Based on this fact our first goal was to investigate the complex formation processes between nickel(II) and peptides using DFT methods. TD-DFT studies have also been performed to predict the electronic absorption spectra of the complexes formed in the systems. The investigated systems have been characterized earlier using equilibrium and spectroscopic methods. These complexes were square planar, diamagnetic nickel(II) complexes with oligopeptides (glycyl-glycyl-glicine, glycyl-glycyl-glycyl-glycine, glycyl-glycyl-histidine and glycyl-glycyl-cysteine).

Based on our results, DFT method is a suitable technique for investigating metal ion oligopeptide interactions. Seven different functionals have been tested using def2-TZVP basic set to optimize the geometry of the complexes formed both gas phase and in aqueous media using PCM model. The coordination sphere of the nickel(II) complexes was saturated. We have also determined that the use of different functionals has no significant effect on the calculated distances and angles between nickel(II) and donor atoms. In one case these properties could be compared with the experimental data determined by X-ray crystallography. These values were in good agreement with the data calculated by DFT. With the help of TD-DFT the electronic spectra of the complexes formed in the investigated systems have been determined. The calculated spectra were compared with the experimental one and our results indicated that the use of HSE06, PBE0 and mPW1PW91 are able to predict the experimental spectra with a very good relative error. Moreover, the gradient-corrected B3LYP and B3P86 and the range separated CAM-B3LYP functionals are suitable to simulate the electronic spectra. Although, the application of LANL2DZ basic set can decrease the time of the calculations that may be important from practical point of view, the relative errors of absorption maxima are relative higher than those determined using def2-TZVP basic set. In general, we can conclude that the DFT method is suitable for investigating peptide metal ion interactions and to calculate the electronic spectra of the complexes.

In the second part of our work the complex formation processes of different peptides containing cysteine on C-termini have been investigated with several transition metal ions. We were interested in how the metal binding ability can be modified if the N-terminal part of the peptides contains strongly coordinating domain.

The simplest ligand from this work contains only free terminal amino group and thiolate group of cysteine (AAASSC-NH₂). We have determined that the deprotonation and coordination of peptide amide nitrogens starts from the thiolate anchoring group that was completed by macrochelation of N-terminal amino group. In contrary, in the zinc(II) and cadmium(II) containing systems the ligand binds bidentate *via* (S,N) donor groups, nevertheless, the thiolate group is the primary metal binding site in acidic pH range.

For the two peptides containing separate aspartyl and cysteinyl residues, the binding of the β -COO⁻ results in the preference of binding of N-terminal domain for nickel(II) in the acidic and neutral pH range. However, the deprotonation of thiolate group results in the formation of coordination isomers, where the metal ion was bounded on the N- and C-terminal part of the peptide as well. Using CD spectroscopy the percentage distribution between the two domains could also be calculated. The zinc(II)- and cadmium(II)-complexes of these ligand have higher stability *via* tridentate coordination than those of complexes formed in the AAASSC-NH₂ containing system with (N,S) donor set. In these complexes, carboxylate group and thiolate group are the primary metal binding sites and by increasing pH, the amino group also takes place in the coordination. This binding mode is able to hinder the formation of bis(ligand) species in the zinc(II) containing system because of the tetrahedral coordination sphere, however, the formation of bis(ligand) complexes was observed in the cadmium(II) containing system where cadmium(II) has octahedral coordination geometry.

The peptides containing both histidyl and cysteinyl residues easily form (NH₂,N⁻,N_{im}) and (NH₂,N⁻,N⁻,N_{im}) coordinated species with nickel(II) indicating the preference for binding to the N-terminal region of the peptides. The latter albumin-like coordination mode results in independent metal binding site of the C-terminal part of the peptide in the excess of nickel(II). However, in the case of (NH₂,N⁻,N_{im}) donor set, the coordination sphere is unsaturated that can be completed by macrochelation of distant thiolate group. In this case the formation of dinuclear nickel(II) species is hindered.

The complex formation processes of zinc(II) with AHAAAC-NH₂ are similar to those observed in the nickel(II) containing system. Namely, the specific NH₂-Ala-His-Xaa... motif is able to bind zinc(II) *via* (NH₂,N⁻,N_{im}) donor set that was completed by binding of thiolate. Similar effect has not been observed in the case of

cadmium(II)ions. However, the coordination of imidazole N increases the stability of [CdL] complex and the formation of bis(ligand) species was also observed.

The complex formation processes of the above mentioned ligands have been investigated with palladium(II)- and copper(II)ion as well. In the case of copper(II) the redox reaction between the metal ion and thiolate group was not observed, although, thiolate groups usually have a high affinity for reducing copper(II). The lack of this redox effect can be explained by the formation of albumin-like coordination with AAHAAC-NH₂ peptide. This binding mode is able to protect the metal ion from the reduction of thiolate group due to the change of reduction potential of Cu(II)/Cu(I). In contrast, AHAAAC-NH₂ ligand forms (NH₂,N⁻,N_{im}) + S⁻ coordinated species with copper(II). This binding mode was proved by the investigation of ternary system, too. In the presence of palladium(II) the formation of albumin-like (5,5,6)-membered fused chelate system is hindered because of the coordination of thiolate group. Based on this fact, the coordination sphere of palladium(II) contains only one amide nitrogen. The existence of this species was also confirmed by TD-DFT where the calculated and experimental ECD spectra were in good agreement. The complex formation processes of AHAAAC-NH₂ with palladium(II) are similar to those obtained in the nickel(II) and zinc(II)-containing systems, however, the palladium(II) complexes have the highest thermodynamic stability. It is a very interesting coordination behavior that the deprotonation and coordination of peptide nitrogen shifted into the slightly acidic pH range because of the tridentate (NH₂,N_{im},S⁻) coordination mode. This effect is unusual compared with the palladium(II)-peptide systems studied earlier where the formation of species containing peptide nitrogen in the coordination sphere were observed around pH 2-3.

In the case of peptides containing two cysteinyl residues (CSSACS-NH₂, ACSSACS-NH₂) we focused on the complex formation processes with zinc(II)- and cadmium(II)ions. For the peptide containing cysteine on the N-termini there is a possibility to form 5-membered chelate system with the (NH₂,S⁻) donor set. It could be completed by macrochelation of distant thiolate group. This coordination environment results in complexes with outstanding stability and able to hinder the hydrolysis of metal ion and the formation of bis(ligand) species. In contrast, there is no way to form chelate system in the case of zinc(II)- and cadmium(II) complexes of ACSSACS-NH₂. Based on this fact, the primary metal binding sites are the thiolate groups because of the high affinity of cadmium(II) and zinc(II) for binding thiolate and the following step is the binding of amino group. In the case of excess of ligand, bis(ligand) complexes were formed, while in equimolar solution a very exclusive coordination behavior was observed, namely, the cadmium(II)- and zinc(II) induced deprotonation and coordination of peptide nitrogen.

Based on our results it was introduced how the metal binding ability can be modified on the N- or C-terminal domain of the peptide. This gives possibility for deeper understanding of the selective binding modes existing in metalloproteins and metalloenzymes. Moreover, using specific peptide sequences that was demonstrated earlier it is possible to design the so-called *de novo* or *chimera* peptides where the binding and affinity of the metal ion to the peptides may be controlled by selective regulation.

7. HIVATKOZÁSOK

- [1] K. Cherifi, B. Decock-Le Reverend, K. Várnagy, T. Kiss, I. Sóvágó, C. Locheux, H. Kozłowski, *Transition metal complexes of L-cysteine containing di- and tripeptides*, Journal of Inorganic Biochemistry, **38** (1990) 69-80.
- [2] H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, *Specific structure–stability relations in metallopeptides*, Coordination Chemistry Reviews, **184** (1999) 319-346.
- [3] J.G. L. D. Pettit, H. Kozłowski, *Complex formation between metal ions and peptides*. Vol. 1. 1991, Jai Press Ltd., London.
- [4] L.D. Pettit, *Metal-peptide complex formation*. Handbook of metal ligand interaction in biological fluids. Vol. 2,1. 1995, Marcel Dekker Inc., New York. 636-647.
- [5] H. Sigel, R.B. Martin, *Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands*, Chemical Reviews, **82** (1982) 385-426.
- [6] I. Sóvágó, C. Kállay, K. Várnagy, *Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes*, Coordination Chemistry Reviews, **256** (2012) 2225-2233.
- [7] I. Sóvágó, K. Ösz, *Metal ion selectivity of oligopeptides*, Dalton Transactions, (2006) 3841-3854.
- [8] I. Sóvágó, K. Várnagy, N. Lihi, Á. Grenács, *Coordinating properties of peptides containing histidyl residues*, Coordination Chemistry Reviews, **327-328** (2016) 43-54.
- [9] D.W. Appleton, T.P.A. Kruck, B. Sarkar, *A comparative study of Zn(II) and Co(II) binding to glycly-l-tyrosine, a pseudosubstrate for carboxypeptidase A*, Journal of Inorganic Biochemistry, **10** (1979) 1-8.
- [10] E. Farkas, T. Kiss, *Effects of side-chain donor groups on deprotonation of peptide amide in copper(II) complexes at high pH*, Polyhedron, **8** (1989) 2463-2467.
- [11] T. Szabó-Planka, G. Peintler, A. Rockenbauer, M. Győr, M. Varga-Fábián, L. Institoris, L. Balázspiri, *Electron spin resonance study of copper(II) complexes of X-glycine and glycyl-X type dipeptides, and related tripeptides. Variation of coordination modes with ligand excess and pH in fluid and frozen aqueous solutions*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, (1989) 1925-1932.
- [12] J.-F. Galey, B.D.-L. Reverend, A. Lebki, L.D. Pettit, S.I. Pyburn, H. Kozłowski, *Specific interactions of the [small beta]-carboxylate group of the aspartic acid residue in oligopeptides containing one, two or three such residues with copper(II) ions. A potentiometric and spectroscopic study*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, (1991) 2281-2287.
- [13] V. Józai, I. Sóvágó, *Palladium(II) complexes of oligopeptides containing aspartyl and glutamyl residues*, Polyhedron, **30** (2011) 2114-2120.
- [14] C. Kállay, I. Sóvágó, K. Várnagy, *Nickel(II) complexes of oligopeptides containing aspartyl and glutamyl residues. Potentiometric and spectroscopic studies*, Polyhedron, **26** (2007) 811-817.
- [15] C. Kállay, K. Várnagy, G. Micera, D. Sanna, I. Sóvágó, *Copper(II) complexes of oligopeptides containing aspartyl and glutamyl residues. Potentiometric and spectroscopic studies*, Journal of Inorganic Biochemistry, **99** (2005) 1514-1525.
- [16] I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely, *Proton and copper(II) complexes of the pentapeptide thymopoietin(32–36)*, Inorganica Chimica Acta, **93** (1984) L53-L55.

- [17] B. Bóka, A. Myari, I. Sóvágó, N. Hadjiliadis, *Copper(II) and zinc(II) complexes of the peptides Ac-HisValHis-NH₂ and Ac-HisValGlyAsp-NH₂ related to the active site of the enzyme CuZnSOD*, Journal of Inorganic Biochemistry, **98** (2004) 113-122.
- [18] T.K. B. Radomska, I. Sóvágó, *Transition-metal complexes of histidylphenylalanine and histidyltyrosine*, Journal of Chemical Research-Synopses, **5** (1987)
- [19] G. Brookes, L.D. Pettit, *Thermodynamics of formation of complexes of copper(II) and nickel(II) ions with glycylhistidine, β -alanylhistidine, and histidylglycine*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, (1975) 2112-2117.
- [20] G. Facchin, M.H. Torre, E. Kremer, E.J. Baran, A. Mombrú, H. Pardo, M.P. Araujo, A.A. Batista, A.J. Costa-Filho, *Cu(II) complexation with His-Gly and His-Ala. X-ray structure of [Cu(his-gly)₂(H₂O)₂]·6H₂O*, Inorganica Chimica Acta, **355** (2003) 408-413.
- [21] I. Sóvágó, E. Farkas, A. Gergely, *Studies on transition-metal-peptide complexes. Part 7. Copper(II) complexes of dipeptides containing L-histidine*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, (1982) 2159-2163.
- [22] T. Szabó-Plánka, N.V. Nagy, A. Rockenbauer, L. Korecz, *Microspeciation in the Copper(II)-L-Histidylglycine System. An ESR Study by the Two-Dimensional Computer Simulation Method*, Inorganic Chemistry, **41** (2002) 3483-3490.
- [23] T. Gajda, B. Henry, J.-J. Delpuech, *Complexes of copper(II) ion with histamine-containing dipeptides: formation constants and structure*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, (1993) 1301-1306.
- [24] P.M. May, J. Whittaker, D.R. Williams, *Copper complexing by growth stimulating tripeptide, glycylhistidyllysine*, Inorganica Chimica Acta, **80** (1983) L5-L7.
- [25] P.J. Morris, R. Bruce Martin, *Tetramer formation in tetragonal transition metal ion complexes of glycyl-L-histidine*, Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, **33** (1971) 2913-2918.
- [26] R. Osterberg, B. Sjöberg, R. Soderquist, *Models of copper-protein interaction: copper(II) complexes of glycyl-L-histidylglycine in solution and in the crystalline state*, Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, (1972) 983-985.
- [27] C.M. Perkins, N.J. Rose, B. Weinstein, R.E. Stenkamp, L.H. Jensen, L. Pickart, *The structure of a copper complex of the growth factor glycyl-L-histidyl-L-lysine at 1.1 Å resolution*, Inorganica Chimica Acta, **82** (1984) 93-99.
- [28] M.J.A. Rainer, B.M. Rode, *The complex formation of copper(II) with GHL and related peptides*, Inorganica Chimica Acta, **107** (1985) 127-132.
- [29] M. Wienken, B. Lippert, E. Zangrando, L. Randaccio, *Gold(III) glycyl-L-histidine dipeptide complexes. Preparation and x-ray structures of monomeric and cyclic tetrameric species*, Inorganic Chemistry, **31** (1992) 1983-1985.
- [30] E. Farkas, I. Sóvágó, A. Gergely, *Studies on transition-metal-peptide complexes. Part 8. Parent and mixed-ligand complexes of histidine-containing dipeptides*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, (1983) 1545-1551.
- [31] D.L. Rabenstein, S.A. Daignault, A.A. Isab, A.P. Arnold, M.M. Shoukry, *Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. 21. The complexation of zinc by glycylhistidine and alanylhistidine peptides*, Journal of the American Chemical Society, **107** (1985) 6435-6439.
- [32] W. Bal, M.I. Djuran, D.W. Margerum, E.T. Gray, M.A. Mazid, R.T. Tom, E. Nieboer, P.J. Sadler, *Dioxygen-induced decarboxylation and hydroxylation of [Ni(glycyl-glycyl-L-histidine)] occurs via Ni: X-ray crystal structure of [Ni(glycyl-glycyl-[small alpha]-hydroxy-D,L-histamine)]·3H₂O*, Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, (1994) 1889-1890.

- [33] N. Camerman, A. Camerman, B. Sarkar, *Molecular design to mimic the copper(II) transport site of human albumin. The crystal and molecular structure of copper(II) – glycyglycyl-L-histidine-N-methyl amide monoquo complex*, Canadian Journal of Chemistry, **54** (1976) 1309-1316.
- [34] E. Farkas, I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely, *Studies on transition-metal-peptide complexes. Part 9. Copper(II) complexes of tripeptides containing histidine*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, (1984) 611-614.
- [35] T.P.A. Kruck, S.-J. Lau, B. Sarkar, *Molecular design to mimic the copper(II) transport site of human albumin: studies of equilibria between copper(II) and glycyglycyl-L-histidine-N-methyl amide and comparison with human albumin*, Canadian Journal of Chemistry, **54** (1976) 1300-1308.
- [36] S. L. Best, T. K. Chattopadhyay, M. I. Djuran, R. A. Palmer, P. J. Sadler, I. Sóvágó, K. Várnagy, *Gold(III) and palladium(II) complexes of glycyglycyl-L-histidine: crystal structures of [AuIII(Gly-Gly-L-His-H-2)]Cl · H₂O and [PdII(Gly-Gly-L-His-H-2)] · 1.5H₂O and His?NH deprotonation*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, (1997) 2587-2596.
- [37] I. Turi, D. Sanna, E. Garribba, G. Pappalardo, I. Sóvágó, *The effect of non-coordinating side chains on the metal binding affinities of peptides of histidine*, Polyhedron, **62** (2013) 7-17.
- [38] L.D. Pettit, S. Pyburn, W. Bal, H. Kozłowski, M. Bataille, *A study of the comparative donor properties to Cu of the terminal amino and imidazole nitrogens in peptides*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, (1990) 3565-3570.
- [39] 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*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, (2000) 467-472.
- [40] C.A. Damante, K. Ősz, Z. Nagy, G. Pappalardo, G. Grasso, G. Impellizzeri, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, *The Metal Loading Ability of β-Amyloid N-Terminus: A Combined Potentiometric and Spectroscopic Study of Copper(II) Complexes with β-Amyloid(1–16), Its Short or Mutated Peptide Fragments, and Its Polyethylene Glycol (PEG)-ylated Analogue*, Inorganic Chemistry, **47** (2008) 9669-9683.
- [41] V. Józai, Z. Nagy, K. Ősz, D. Sanna, G. Di Natale, D. La Mendola, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, *Transition metal complexes of terminally protected peptides containing histidyl residues*, Journal of Inorganic Biochemistry, **100** (2006) 1399-1409.
- [42] V. Józai, I. Turi, C. Kállay, G. Pappalardo, G. Di Natale, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, *Mixed metal copper(II)-nickel(II) and copper(II)-zinc(II) complexes of multihistidine peptide fragments of human prion protein*, Journal of Inorganic Biochemistry, **112** (2012) 17-24.
- [43] H. Kozłowski, J. Urbńska, I. Sóvágó, K. Várnagy, A. Kiss, J. Sychała, K. Cherifi, *Cadmium ion interaction with sulphur containing amino acid and peptide ligands*, Polyhedron, **9** (1990) 831-837.
- [44] H. Kozłowski, B.D.-L. Révérénd, D. Ficheux, C. Loucheux, I. Sóvágó, *Nickel(II) complexes with sulphhydryl containing peptides. potentiometric and spectroscopic studies*, Journal of Inorganic Biochemistry, **29** (1987) 187-197.
- [45] H. Adachi, N. Ueyama, A. Nakamura, *¹⁹⁹Hg NMR investigation on the solution structure of Hg(II) complexes of oligopeptides containing cysteine and histidine residues*, Inorganica Chimica Acta, **198** (1992) 805-811.

- [46] P. Gockel, R. Vogler, M. Gelinsky, A. Meißner, H. Albrich, H. Vahrenkamp, *Zinc complexation of cyclic dipeptides containing cysteine and/or histidine*, *Inorganica Chimica Acta*, **323** (2001) 16-22.
- [47] P. Gockel, M. Gelinsky, R. Vogler, H. Vahrenkamp, *Solution behaviour and zinc complexation of tripeptides with cysteine and/or histidine at both termini*, *Inorganica Chimica Acta*, **272** (1998) 115-124.
- [48] D. Szunyogh, B. Gyurcsik, F.H. Larsen, M. Stachura, P.W. Thulstrup, L. Hemmingsen, A. Jancsó, *ZnII and HgII binding to a designed peptide that accommodates different coordination geometries*, *Dalton Transactions*, **44** (2015) 12576-12588.
- [49] D. Árus, Á. Dancs, N.V. Nagy, T. Gajda, *A comparative study on the possible zinc binding sites of the human ZnT3 zinc transporter protein*, *Dalton Transactions*, **42** (2013) 12031-12040.
- [50] R.J.P. C.J. Burrows, J.G. Muller and S.E. Rokita, *Oxidative DNA damage mediated by metalpeptide complexes*, *Pure and Applied Chemistry*, **70** (1998) 275.
- [51] K.C. Brown, S.H. Yang, T. Kodadek, *Highly specific oxidative cross-linking of proteins mediated by a nickel-peptide complex*, *Biochemistry*, **34** (1995) 4733-4739.
- [52] S.A. Ross, C.J. Burrows, *Nickel Complexes of Cysteine- and Cystine-Containing Peptides: Spontaneous Formation of Disulfide-Bridged Dimers at Neutral pH*, *Inorganic Chemistry*, **37** (1998) 5358-5363.
- [53] J.D. Van Horn, G. Bulaj, D. Goldenberg, C. Burrows, *The Cys-Xaa-His metal-binding motif: {N} versus {S} coordination and nickel-mediated formation of cysteinyl sulfinic acid*, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **8** (2003) 601-610.
- [54] M. Rowinska-Zyrek, D. Witkowska, D. Valensin, W. Kamysz, H. Kozlowski, *The C terminus of HspA-a potential target for native Ni(ii) and Bi(iii) anti-ulcer drugs*, *Dalton Transactions*, **39** (2010) 5814-5826.
- [55] J.G. Kusters, A.H. van Vliet, E.J. Kuipers, *Pathogenesis of Helicobacter pylori infection*, *Clin Microbiol Rev*, **19** (2006) 449-490.
- [56] D. Witkowska, M. Rowinska-Zyrek, G. Valensin, H. Kozlowski, *Specific poly-histidyl and poly-cysteil protein sites involved in Ni²⁺ homeostasis in Helicobacter pylori. Impact of Bi³⁺ ions on Ni²⁺ binding to proteins. Structural and thermodynamic aspects*, *Coordination Chemistry Reviews*, **256** (2012) 133-148.
- [57] T.G. Brayman, R.P. Hausinger, *Purification, characterization, and functional analysis of a truncated Klebsiella aerogenes UreE urease accessory protein lacking the histidine-rich carboxyl terminus*, *J Bacteriol*, **178** (1996) 5410-5416.
- [58] N.E. Grosseohme, S.B. Mulrooney, R.P. Hausinger, D.E. Wilcox, *Thermodynamics of Ni²⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺ binding to the urease metallochaperone UreE*, *Biochemistry*, **46** (2007) 10506-10516.
- [59] M. Rowinska-Zyrek, D. Valensin, L. Szyrwił, Z. Grzonka, H. Kozlowski, *Specific interactions of Bi(III) with the Cys-Xaa-Cys unit of a peptide sequence*, *Dalton Transactions*, (2009) 9131-9140.
- [60] Y.-Y. Chang, Y.-T. Lai, T. Cheng, H. Wang, Y. Yang, H. Sun, *Selective interaction of Hpn-like protein with nickel, zinc and bismuth in vitro and in cells by FRET*, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **142** (2015) 8-14.
- [61] W. Xia, H. Li, K.-H. Sze, H. Sun, *Structure of a Nickel Chaperone, HypA, from Helicobacter pylori Reveals Two Distinct Metal Binding Sites*, *Journal of the American Chemical Society*, **131** (2009) 10031-10040.

- [62] D.F. Hansen, J.J. Led, *Mapping the Electronic Structure of the Blue Copper Site in Plastocyanin by NMR Relaxation*, Journal of the American Chemical Society, **126** (2004) 1247-1252.
- [63] E.I. Solomon, P.J. Clendening, H.B. Gray, F.J. Grunthaner, *Direct observation of sulfur coordination in bean plastocyanin by x-ray photoelectron spectroscopy*, Journal of the American Chemical Society, **97** (1975) 3878-3879.
- [64] R.G. Daugherty, T. Wasowicz, B.R. Gibney, V.J. DeRose, *Design and Spectroscopic Characterization of Peptide Models for the Plastocyanin Copper-Binding Loop*, Inorganic Chemistry, **41** (2002) 2623-2632.
- [65] S. Potocki, D. Valensin, H. Kozłowski, *The specificity of interaction of Zn^{2+} , Ni^{2+} and Cu^{2+} ions with the histidine-rich domain of the TjZNT1 ZIP family transporter*, Dalton Transactions, **43** (2014) 10215-10223.
- [66] K.D.T. Karlin, Zoltan, *Bioinorganic Chemistry of Copper*, Journal of Chemical Education, **71** (1994) A54.
- [67] G.H. Rawji, *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life. An Introduction and Guide* (Kaim, Wolfgang; Schwerderski, Brigitte), Journal of Chemical Education, **74** (1997) 382.
- [68] A.F. Kolodziej, *The Chemistry of Nickel-Containing Enzymes*, in *Progress in Inorganic Chemistry*. 2007, John Wiley & Sons, Inc. p. 493-597.
- [69] T. Kowalik-Jankowska, H. Kozłowski, E. Farkas, I. Sóvágó, *Nickel Ion Complexes of Amino Acids and Peptides*, in *Nickel and Its Surprising Impact in Nature*. 2007, John Wiley & Sons, Ltd. p. 63-107.
- [70] L.M. Venzani, *140. Tetrahedral nickel(II) complexes and the factors determining their formation. Part I. Bistriphenylphosphine nickel(II) compounds*, Journal of the Chemical Society (Resumed), (1958) 719-724.
- [71] J.F. Riordan, *Biochemistry of Zinc*, Medical Clinics of North America, **60** (1976) 661-674.
- [72] O. Andersen, *Chelation of Cadmium*, Environmental Health Perspectives, **54** (1984) 249-266.
- [73] W. Maret, J.-M. Moulis, *The Bioinorganic Chemistry of Cadmium in the Context of Its Toxicity, in Cadmium: From Toxicity to Essentiality*, Sigel, A., Sigel, H., and Sigel, R.K.O., Editors. 2013, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 1-29.
- [74] I. Sóvágó, K. Várnagy, *Cadmium(II) Complexes of Amino Acids and Peptides*, in *Cadmium: From Toxicity to Essentiality*, Sigel, A., Sigel, H., and Sigel, R.K.O., Editors. 2013, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 275-302.
- [75] C. G. Ágoston, T. Kowalik Jankowska, I. Sóvágó, *Potentiometric and NMR studies on palladium(II) complexes of oligoglycines and related ligands with non-coordinating side chains*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, (1999) 3295-3302.
- [76] H. Kozłowski, G. Formicka-Kozłowska, B. Jeżowska-Trzebiatowska, *1H n.m.r. conformational studies of glycyl-L-phenylalanine and L-phenylalanyl-glycine dipeptides and their complexes with palladium (II)*, Organic Magnetic Resonance, **10** (1977) 146-150.
- [77] H. Kozłowski, M. Jeżowska, H. Szyszuk, *PMR conformational studies of Pd(II) complexes with Ala-Tyr and d-Leu-Tyr depeptides*, Journal of Molecular Structure, **50** (1978) 73-80.
- [78] H. Kozowski, B. Jeżowska-Trzebiatowska, *PMR studies of palladium(II)-glycyl-L-aspartic acid complexes in aqueous solution*, Chemical Physics Letters, **42** (1976) 246-249.

- [79] B. Bóka, Z. Nagy, K. Várnagy, I. Sóvágó, *Solution equilibria and structural characterisation of the palladium(II) and mixed metal complexes of peptides containing methionyl residues*, Journal of Inorganic Biochemistry, **83** (2001) 77-89.
- [80] N. Nagao, T. Kobayashi, T. Takayama, Y. Koike, Y. Ono, T. Watanabe, T. Mikami, M. Suzuki, T. Matumoto, M. Watabe, *Platinum(II) Complexes with Diglycine: X-ray Crystal Structure, ¹⁵N NMR Spectra, and Growth-Inhibitory Activity against Mouse Meth A Solid Tumor in Vivo*, Inorganic Chemistry, **36** (1997) 4195-4201.
- [81] J. Reedijk, *Improved understanding in platinum antitumour chemistry*, Chemical Communications, (1996) 801-806.
- [82] Y. Christen, *Oxidative stress and Alzheimer disease*, American Journal of Clinical Nutrition, **71** (2000) 621S-629S.
- [83] R.W. Robert Crichton, *Metal-based Neurodegeneration: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Strategies*. 2005: WILEY. 238.
- [84] K.J. Thompson, S. Shoham, J.R. Connor, *Iron and neurodegenerative disorders*, Brain Research Bulletin, **55** (2001) 155-164.
- [85] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, L.I. Binder, *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology*, Proc Natl Acad Sci U S A, **83** (1986) 4913-4917.
- [86] S.B. Prusiner *Neurodegenerative Diseases and Prions*, New England Journal of Medicine, **344** (2001) 1516-1526.
- [87] C.D. Syme, J.H. Viles, *Solution ¹H NMR investigation of Zn²⁺ and Cd²⁺ binding to amyloid-beta peptide (Aβ) of Alzheimer's disease*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, **1764** (2006) 246-256.
- [88] C.J. Sarell, S.R. Wilkinson, J.H. Viles, *Substoichiometric levels of Cu²⁺ ions accelerate the kinetics of fiber formation and promote cell toxicity of amyloid-β from Alzheimer disease*, J Biol Chem, **285** (2010) 41533-41540.
- [89] B. Liu, A. Moloney, S. Meehan, K. Morris, S.E. Thomas, L.C. Serpell, R. Hider, S.J. Marciniak, D.A. Lomas, D.C. Crowther, *Iron promotes the toxicity of amyloid beta peptide by impeding its ordered aggregation*, J Biol Chem, **286** (2011) 4248-4256.
- [90] S.S. Leal, H.M. Botelho, C.M. Gomes, *Metal ions as modulators of protein conformation and misfolding in neurodegeneration*, Coordination Chemistry Reviews, **256** (2012) 2253-2270.
- [91] N.D. Younan, M. Klewpatinond, P. Davies, A.V. Ruban, D.R. Brown, J.H. Viles, *Copper(II)-Induced Secondary Structure Changes and Reduced Folding Stability of the Prion Protein*, Journal of Molecular Biology, **410** (2011) 369-382.
- [92] J. Gerber, U. Muhlenhoff, R. Lill, *An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1*, Embo Reports, **4** (2003) 906-911.
- [93] C. Ingre, P.M. Roos, F. Piehl, F. Kamel, F. Fang, *Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis*, Clinical Epidemiology, **7** (2015) 181-193.
- [94] M. Remelli, M. Peana, S. Medici, L.G. Delogu, M.A. Zoroddu, *Interaction of divalent cations with peptide fragments from Parkinson's disease genes*, Dalton Transactions, **42** (2013) 5964-5974.
- [95] C. Hureau, *Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid-β peptides involved in Alzheimer disease. Part I: An overview*, Coordination Chemistry Reviews, **256** (2012) 2164-2174.
- [96] G. Arena, G. Pappalardo, I. Sóvágó, E. Rizzarelli, *Copper(II) interaction with amyloid-β: Affinity and speciation*, Coordination Chemistry Reviews, **256** (2012) 3-12.

- [97] D.R. Brown, H. Kozłowski, *Biological inorganic and bioinorganic chemistry of neurodegeneration based on prion and Alzheimer diseases*, Dalton Transactions, (2004) 1907-1917.
- [98] E.R.E. D. Milardi, *Neurodegeneration, Metallostasis and Proteostasis*, RSC Publishing, (2011)
- [99] J.A. Duce, A.I. Bush, *Biological metals and Alzheimer's disease: Implications for therapeutics and diagnostics*, Progress in Neurobiology, **92** (2010) 1-18.
- [100] C. Hureau, P. Dorlet, *Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid- β peptides involved in Alzheimer disease. Part 2: Dependence of Cu(II) binding sites with A β sequences*, Coordination Chemistry Reviews, **256** (2012) 2175-2187.
- [101] H. Kozłowski, A. Janicka-Kłos, P. Stanczak, D. Valensin, G. Valensin, K. Kulon, *Specificity in the Cu²⁺ interactions with prion protein fragments and related His-rich peptides from mammals to fishes*, Coordination Chemistry Reviews, **252** (2008) 1069-1078.
- [102] H. Kozłowski, M. Luczkowski, M. Remelli, D. Valensin, *Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases)*, Coordination Chemistry Reviews, **256** (2012) 2129-2141.
- [103] C.-J. Lin, H.-C. Huang, Z.-F. Jiang, *Cu(II) interaction with amyloid- β peptide: A review of neuroactive mechanisms in AD brains*, Brain Research Bulletin, **82** (2010) 235-242.
- [104] C. Miglioni, E. Porciatti, M. Luczkowski, D. Valensin, *Structural characterization of Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ binding sites of model peptides associated with neurodegenerative diseases*, Coordination Chemistry Reviews, **256** (2012) 352-368.
- [105] T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta-Dolejsz, K. Wiśniewska, L. Łankiewicz, *Coordination of copper(II) ions by the 11–20 and 11–28 fragments of human and mouse β -amyloid peptide*, Journal of Inorganic Biochemistry, **92** (2002) 1-10.
- [106] T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta-Dolejsz, K. Wiśniewska, L. Łankiewicz, *Cu(II) interaction with N-terminal fragments of human and mouse β -amyloid peptide*, Journal of Inorganic Biochemistry, **86** (2001) 535-545.
- [107] T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta-Dolejsz, K. Wisniewska, L. Lankiewicz, H. Kozłowski, *Copper(II) complexation by human and mouse fragments (11-16) of β -amyloid peptide*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, (2000) 4511-4519.
- [108] T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta, K. Wiśniewska, L. Łankiewicz, *Coordination abilities of the 1–16 and 1–28 fragments of β -amyloid peptide towards copper(II) ions: a combined potentiometric and spectroscopic study*, Journal of Inorganic Biochemistry, **95** (2003) 270-282.
- [109] C.A. Damante, K. Ősz, Z. Nagy, G. Pappalardo, G. Grasso, G. Impellizzeri, E. Rizzarelli, I. Sívágó, *Metal Loading Capacity of A β N-Terminus: a Combined Potentiometric and Spectroscopic Study of Zinc(II) Complexes with A β (1–16), Its Short or Mutated Peptide Fragments and Its Polyethylene Glycol-ylated Analogue*, Inorganic Chemistry, **48** (2009) 10405-10415.
- [110] Á. Grenács, D. Sanna, I. Sívágó, *Copper(II) and nickel(II) binding sites of peptide containing adjacent histidyl residues*, Journal of Inorganic Biochemistry, **151** (2015) 87-93.
- [111] Á. Grenács, I. Sívágó, *Copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of the N-terminal nonapeptide fragment of amyloid- β and its derivatives*, Journal of Inorganic Biochemistry, **139** (2014) 49-56.

- [112] É. Józsa, K. Ősz, C. Kállay, P. de Bona, C.A. Damante, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, *Nickel(ii) and mixed metal complexes of amyloid- β N-terminus*, Dalton Transactions, **39** (2010) 7046-7053.
- [113] B. Alies, C. Bijani, S. Sayen, E. Guillon, P. Faller, C. Hureau, *Copper Coordination to Native N-Terminally Modified versus Full-Length Amyloid- β : Second-Sphere Effects Determine the Species Present at Physiological pH*, Inorganic Chemistry, **51** (2012) 12988-13000.
- [114] L. Guilloreau, L. Damian, Y. Coppel, H. Mazarguil, M. Winterhalter, P. Faller, *Structural and thermodynamical properties of CuII amyloid- β 16/28 complexes associated with Alzheimer's disease*, JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, **11** (2006) 1024-1038.
- [115] S. Bolognin, L. Messori, D. Drago, C. Gabbiani, L. Cendron, P. Zatta, *Aluminum, copper, iron and zinc differentially alter amyloid-A β 1-42 aggregation and toxicity*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, **43** (2011) 877-885.
- [116] G. Arena, D. La Mendola, G. Pappalardo, I. Sóvágó, E. Rizzarelli, *Interactions of Cu²⁺ with prion family peptide fragments: Considerations on affinity, speciation and coordination*, Coordination Chemistry Reviews, **256** (2012) 2202-2218.
- [117] G.L. Millhauser, *Copper Binding in the Prion Protein[†]*, Accounts of Chemical Research, **37** (2004) 79-85.
- [118] M. Luczkowski, H. Kozłowski, M. Stawikowski, K. Rolka, E. Gaggelli, D. Valensin, G. Valensin, *Is the monomeric prion octapeptide repeat PHGGGWGQ a specific ligand for Cu²⁺ ions?*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, (2002) 2269-2274.
- [119] R.P. Bonomo, V. Cucinotta, A. Giuffrida, G. Impellizzeri, A. Magri, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, A.M. Santoro, G. Tabbi, L.I. Vagliasindi, *A re-investigation of copper coordination in the octa-repeats region of the prion protein*, Dalton Transactions, (2005) 150-158.
- [120] 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** (2002) 3991-4001.
- [121] A.P. Garnett, J.H. Viles, *Copper Binding to the Octarepeats of the Prion Protein: Affinity, specificity, folding and cooperativity: Insights from circular dichroism*, Journal of Biological Chemistry, **278** (2003) 6795-6802.
- [122] D. Valensin, M. Luczkowski, F.M. Mancini, A. Legowska, E. Gaggelli, G. Valensin, K. Rolka, H. Kozłowski, *The dimeric and tetrameric octarepeat fragments of prion protein behave differently to its monomeric unit*, Dalton Transactions, (2004) 1284-1293.
- [123] J.H. Viles, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, D.B. Goodin, P.E. Wright, H.J. Dyson, *Copper binding to the prion protein: Structural implications of four identical cooperative binding sites*, Proceedings of the National Academy of Sciences, **96** (1999) 2042-2047.
- [124] G. Di Natale, K. Ősz, C. Kállay, G. Pappalardo, D. Sanna, G. Impellizzeri, I. Sóvágó, E. Rizzarelli, *Affinity, Speciation, and Molecular Features of Copper(II) Complexes with a Prion Tetraoctarepeat Domain in Aqueous Solution: Insights into Old and New Results*, Chemistry – A European Journal, **19** (2013) 3751-3761.
- [125] B. Belosi, E. Gaggelli, R. Guerrini, H. Kozłowski, M. Łuczkowski, F.M. Mancini, M. Remelli, D. Valensin, G. Valensin, *Copper Binding to the Neurotoxic Peptide*

- PrP106–126: Thermodynamic and Structural Studies*, ChemBioChem, **5** (2004) 349-359.
- [126] F. Berti, E. Gaggelli, R. Guerrini, A. Janicka, H. Kozlowski, A. Legowska, H. Miecznikowska, C. Migliorini, R. Pogni, M. Remelli, K. Rolka, D. Valensin, G. Valensin, *Structural and Dynamic Characterization of Copper(II) Binding of the Human Prion Protein Outside the Octarepeat Region*, Chemistry – A European Journal, **13** (2007) 1991-2001.
- [127] G. Di Natale, G. Grasso, G. Impellizzeri, D. La Mendola, G. Micera, N. Mihala, Z. Nagy, K. Ősz, G. Pappalardo, V. Rigó, E. Rizzarelli, D. Sanna, I. Sóvágó, *Copper(II) Interaction with Unstructured Prion Domain Outside the Octarepeat Region: Speciation, Stability, and Binding Details of Copper(II) Complexes with PrP106–126 Peptides*, Inorganic Chemistry, **44** (2005) 7214-7225.
- [128] D. Grasso, G. Grasso, V. Guantieri, G. Impellizzeri, C. La Rosa, D. Milardi, G. Micera, K. Ősz, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, D. Sanna, I. Sóvágó, *Environmental Effects on a Prion's Helix II Domain: Copper(II) and Membrane Interactions with PrP180–193 and Its Analogues*, Chemistry – A European Journal, **12** (2006) 537-547.
- [129] C.E. Jones, S.R. Abdelraheim, D.R. Brown, J.H. Viles, *Preferential Cu²⁺ Coordination by His96 and His111 Induces β -Sheet Formation in the Unstructured Amyloidogenic Region of the Prion Protein*, Journal of Biological Chemistry, **279** (2004) 32018-32027.
- [130] G. Di Natale, K. Ősz, Z. Nagy, D. Sanna, G. Micera, G. Pappalardo, I. Sóvágó, E. Rizzarelli, *Interaction of Copper(II) with the Prion Peptide Fragment HuPrP(76–114) Encompassing Four Histidyl Residues within and outside the Octarepeat Domain*, Inorganic Chemistry, **48** (2009) 4239-4250.
- [131] K. Ősz, Z. Nagy, G. Pappalardo, G. Di Natale, D. Sanna, G. Micera, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, *Copper(II) Interaction with Prion Peptide Fragments Encompassing Histidine Residues Within and Outside the Octarepeat Domain: Speciation, Stability Constants and Binding Details*, Chemistry – A European Journal, **13** (2007) 7129-7143.
- [132] S. Timári, I. Turi, K. Várnagy, I. Sóvágó, *Studies on the formation of coordination isomers in the copper(II) and nickel(II) complexes of peptides containing histidyl residues*, Polyhedron, **79** (2014) 72-79.
- [133] I. Turi, C. Kállay, D. Szikszai, G. Pappalardo, G. Di Natale, P. De Bona, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, *Nickel(II) complexes of the multihistidine peptide fragments of human prion protein*, Journal of Inorganic Biochemistry, **104** (2010) 885-891.
- [134] C.E. Jones, M. Klewpatinond, S.R. Abdelraheim, D.R. Brown, J.H. Viles, *Probing Copper²⁺ Binding to the Prion Protein Using Diamagnetic Nickel²⁺ and ¹H NMR: The Unstructured N terminus Facilitates the Coordination of Six Copper²⁺ Ions at Physiological Concentrations*, Journal of Molecular Biology, **346** (2005) 1393-1407.
- [135] M. Klewpatinond, J.H. Viles, *Empirical rules for rationalising visible circular dichroism of Cu²⁺ and Ni²⁺ histidine complexes: Applications to the prion protein*, FEBS Letters, **581** (2007) 1430-1434.
- [136] D. Valensin, K. Gajda, E. Gralka, G. Valensin, W. Kamysz, H. Kozlowski, *Copper binding to chicken and human prion protein amyloidogenic regions: Differences and similarities revealed by Ni²⁺ as a diamagnetic probe*, Journal of Inorganic Biochemistry, **104** (2010) 71-78.

- [137] A.P. Garnett, C.E. Jones, J.H. Viles, A survey of diamagnetic probes for copper²⁺ binding to the prion protein. ¹H NMR solution structure of the palladium²⁺ bound single octarepeat, Dalton Transactions, (2006) 509-518.
- [138] E. Gaggelli, F. Bernardi, E. Molteni, R. Pogni, D. Valensin, G. Valensin, M. Remelli, M. Luczkowski, H. Kozłowski, Interaction Of The Human Prion PrP(106–126) Sequence With Copper(II), Manganese(II), And Zinc(II): NMR and EPR Studies, Journal of the American Chemical Society, **127** (2005) 996-1006.
- [139] F. Camponeschi, E. Gaggelli, H. Kozłowski, D. Valensin, G. Valensin, Structural features of the Zn²⁺ complex with the single repeat region of "prion related protein" (PrP-rel-2) of zebrafish zPrP63-70 fragment, Dalton Transactions, (2009) 4643-4645.
- [140] L. Szyrwił, E. Jankowska, A. Janicka-Kłos, Z. Szewczuk, D. Valensin, H. Kozłowski, Zn(ii) ions bind very efficiently to tandem repeat region of "prion related protein" (PrP-rel-2) of zebra-fish. MS and potentiometric evidence, Dalton Transactions, (2008) 6117-6120.
- [141] F. Stellato, A. Spevacek, O. Proux, V. Minicozzi, G. Millhauser, S. Morante, Zinc modulates copper coordination mode in prion protein octa-repeat subdomains, European Biophysics Journal, **40** (2011) 1259-1270.
- [142] D. Valensin, Ł. Szyrwił, F. Camponeschi, M. Rowińska-Żyrek, E. Molteni, E. Jankowska, A. Szymanska, E. Gaggelli, G. Valensin, H. Kozłowski, Heteronuclear and Homonuclear Cu²⁺ and Zn²⁺ Complexes with Multihistidine Peptides Based on Zebrafish Prion-like Protein, Inorganic Chemistry, **48** (2009) 7330-7340.
- [143] E.D. Walter, D.J. Stevens, M.P. Visconte, G.L. Millhauser, The Prion Protein is a Combined Zinc and Copper Binding Protein: Zn²⁺ Alters the Distribution of Cu²⁺ Coordination Modes, Journal of the American Chemical Society, **129** (2007) 15440-15441.
- [144] V. Guantieri, A. Venzo, V.D. Marco, M. Acampora, B. Biondi, Potentiometric and NMR studies on Cd²⁺ coordination with the histidine-containing Ac184–188NH₂ prion protein fragment, Inorganica Chimica Acta, **360** (2007) 4051-4057.
- [145] D.R. Brown, F. Hafiz, L.L. Glasssmith, B.-S. Wong, I.M. Jones, C. Clive, S.J. Haswell, Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance, The EMBO Journal, **19** (2000) 1180-1186.
- [146] R.B. Merrifield, Solid-phase peptide-synthesis - Some problems and improvements, Abstracts of Papers of the American Chemical Society, **170** (1975) 30-30.
- [147] G. Barany, N. Kneibcordonier, D.G. Mullen, Solid-phase peptide-synthesis - A silver anniversary report, International Journal of Peptide and Protein Research, **30** (1987) 705-739.
- [148] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, SUPERQUAD: an improved general program for computation of formation constants from potentiometric data, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, (1985) 1195-1200.
- [149] L. Zékány, I. Nagypál, "Computational Methods for the Determination of Formation Constants," in Computational Methods for the Determination of Stability Constants, D. Leggett, Ed., pp. 291–299, Plenum Press, New York, NY, USA, (1985)
- [150] K.R.I.o.T. Hydra/Medusa Chemical Equilibrium Database and Plotting Software, 2004 <http://www.kemi.kth.se/medusa/> freely downloadable software at. I. Puigdomenech.,
- [151] H.M. Irving, M.G. Miles, L.D. Pettit, A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode, Analytica Chimica Acta, **38** (1967) 475-488.

- [152] E. Prenesti, P.G. Daniele, M. Prencipe, G. Ostacoli, *Spectrum–structure correlation for visible absorption spectra of copper(II) complexes in aqueous solution*, Polyhedron, **18** (1999) 3233-3241.
- [153] J.W. Chang, R.B. Martin, *Visible circular dichroism of planar nickel ion complexes of peptides and cysteine and derivatives*, The Journal of Physical Chemistry, **73** (1969) 4277-4283.
- [154] R.B. Martin, J.M. Tsangaris, J.W. Chang, *Double octant rule for planar transition metal ion complexes*, Journal of the American Chemical Society, **90** (1968) 821-823.
- [155] J.M. Tsangaris, J.W. Chang, R.B. Martin, *Ultraviolet circular dichroism of cupric and nickel ion complexes of amino acids and peptides*, Journal of the American Chemical Society, **91** (1969) 726-731.
- [156] J.M. Tsangaris, R.B. Martin, *Visible circular dichroism of copper(II) complexes of amino acids and peptides*, J Am Chem Soc, **92** (1970) 4255-4260.
- [157] E.W. Wilson, R.B. Martin, *Circular dichroism of palladium(II) complexes of amino acids and peptides*, Inorganic Chemistry, **9** (1970) 528-532.
- [158] W.A. Thomas, *Unravelling molecular structure and conformation—the modern role of coupling constants*, Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, **30** (1997) 183-207.
- [159] E.O. Stejskal, J.E. Tanner, *Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient*, The Journal of Chemical Physics, **42** (1965) 288-292.
- [160] C.S. Johnson Jr, *Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications*, Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, **34** (1999) 203-256.
- [161] P.K. Glasoe, F.A. Long, *Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide 1,2*, The Journal of Physical Chemistry, **64** (1960) 188-190.
- [162] K. Mikkelsen, S.O. Nielsen, *Acidity measurements with the glass electrode in H₂O-D₂O mixtures*, The Journal of Physical Chemistry, **64** (1960) 632-637.
- [163] E.L. Purllee, *On the Solvent Isotope Effect of Deuterium in Aqueous Acid Solutions*, Journal of the American Chemical Society, **81** (1959) 263-272.
- [164] P. Hohenberg, W. Kohn, *Inhomogeneous Electron Gas*, Physical Review, **136** (1964) B864-B871.
- [165] W. Kohn, L.J. Sham, *Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects*, Physical Review, **140** (1965) A1133-A1138.
- [166] M.E. Casida, *Time-dependent density-functional theory for molecules and molecular solids*, Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, **914** (2009) 3-18.
- [167] A.D. Becke, *Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange*, The Journal of Chemical Physics, **98** (1993) 5648-5652.
- [168] P.J. Hay, W.R. Wadt, *Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg*, The Journal of Chemical Physics, **82** (1985) 270-283.
- [169] A.D. McLean, G.S. Chandler, *Contracted Gaussian basis sets for molecular calculations. I. Second row atoms, Z=11–18*, The Journal of Chemical Physics, **72** (1980) 5639-5648.
- [170] J. Tomasi, M. Persico, *Molecular Interactions in Solution: An Overview of Methods Based on Continuous Distributions of the Solvent*, Chemical Reviews, **94** (1994) 2027-2094.

- [171] V. Barone, M. Cossi, J. Tomasi, *A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model*, The Journal of Chemical Physics, **107** (1997) 3210-3221.
- [172] E. Runge, E.K.U. Gross, *Density-Functional Theory for Time-Dependent Systems*, Physical Review Letters, **52** (1984) 997-1000.
- [173] T. Yanai, D.P. Tew, N.C. Handy, *A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP)*, Chemical Physics Letters, **393** (2004) 51-57.
- [174] A.D. Becke, *A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories*, The Journal of Chemical Physics, **98** (1993) 1372-1377.
- [175] T. Lu, F. Chen, *Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer*, Journal of Computational Chemistry, **33** (2012) 580-592.
- [176] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M.J. Bearpark, J. Heyd, E.N. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A.P. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N.J. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, *Gaussian 09*. 2009, Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA.
- [177] C. G. 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** (2003) 2607-2615.
- [178] R.B. Martin, M. Chamberlin, J.T. Edsall, *The Association of Nickel(II) Ion with Peptides1*, Journal of the American Chemical Society, **82** (1960) 495-498.
- [179] 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*, Journal of Inorganic Biochemistry, **52** (1993) 17-25.
- [180] M. Bühl, C. Reimann, D.A. Pantazis, T. Bredow, F. Neese, *Geometries of Third-Row Transition-Metal Complexes from Density-Functional Theory*, Journal of Chemical Theory and Computation, **4** (2008) 1449-1459.
- [181] M. Ernzerhof, G.E. Scuseria, *Assessment of the Perdew–Burke–Ernzerhof exchange–correlation functional*, The Journal of Chemical Physics, **110** (1999) 5029-5036.
- [182] Y. Zhao, D.G. Truhlar, *The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals*, Theoretical Chemistry Accounts, **120** (2008) 215-241.
- [183] J. Heyd, G.E. Scuseria, *Efficient hybrid density functional calculations in solids: Assessment of the Heyd–Scuseria–Ernzerhof screened Coulomb hybrid functional*, The Journal of Chemical Physics, **121** (2004) 1187-1192.
- [184] F. Weigend, R. Ahlrichs, *Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy*, Physical Chemistry Chemical Physics, **7** (2005) 3297-3305.

- [185] H.C. Freeman, J.M. Guss, R.L. Sinclair, *Crystal structures of four nickel complexes of glycine and glycine peptides*, Chemical Communications (London), (1968) 485-487.
- [186] J.P. Perdew, K. Burke, Y. Wang, *Generalized gradient approximation for the exchange-correlation hole of a many-electron system*, Physical Review B, **54** (1996) 16533-16539.
- [187] K. Ősz, G. Lente, C. Kállay, *New Protonation Microequilibrium Treatment in the Case of Some Amino Acid and Peptide Derivatives Containing a Bis(imidazolyl)methyl Group*, The Journal of Physical Chemistry B, **109** (2005) 1039-1047.
- [188] I. Sóvágó, T. Kiss, K. Várnagy, B.D.-L. Révériend, *Cobalt(II) and zinc(II) complexes of cysteine containing dipeptides*, Polyhedron, **7** (1988) 1089-1093.
- [189] M. Raics, D. Sanna, I. Sóvágó, C. Kállay, *Copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of hexapeptides containing separate aspartyl and histidyl residues*, Inorganica Chimica Acta, **426** (2015) 99-106.
- [190] Á. Grenács, A. Kaluha, C. Kállay, V. Józai, D. Sanna, I. Sóvágó, *Binary and ternary mixed metal complexes of terminally free peptides containing two different histidyl binding sites*, Journal of Inorganic Biochemistry, **128** (2013) 17-25.
- [191] P.P. Corbi, F. Cagnin, A.C. Massabni, *Synthesis and characterization of a platinum(II) complex with N-acetyl-L-cysteine*, Journal of Coordination Chemistry, **62** (2009) 2764-2771.
- [192] A. Yokoi, N. Yoshinari, T. Konno, *Structural conversion of a cyclic d-Penicillaminato tripalladium(II) complex by pyridine or 2-pyridinethiol*, Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, **82** (2015) 123-133.
- [193] I. Sóvágó, A. Gergely, B. Harman, T. Kiss, *Complexes of sulphur-containing ligands—II*, Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, **41** (1979) 1629-1633.
- [194] I.M. Armitage, T. Drakenberg, B. Reilly, *Use of (113)Cd NMR to probe the native metal binding sites in metalloproteins: an overview*, Metal ions in life sciences, **11** (2013) 117-144.

8. FÜGGELÉK

Az értekezés alapját képező közlemények

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények

1. N. Lihi, Á. Grenács, S. Timári, I. Turi, I. Bányai, I. Sóvágó, K. Várnagy, **Zinc(II) and cadmium(II) complexes of N-terminally free peptides containing two separate cysteinyl binding sites**, *New Journal of Chemistry*, 39 (2015) 8364-8372.
Hatástényező: 3,277 (2015)
2. M. Raics, N. Lihi, A. Laskai, Cs. Kállay, K. Várnagy, I. Sóvágó, **Nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes of peptides containing separate histidyl and cysteinyl binding sites**, *New Journal of Chemistry*, 40 (2016) 5420-5427.
Hatástényező: 3,277 (2015)
3. I. Sóvágó, K. Várnagy, N. Lihi, Á. Grenács, **Coordinating properties of peptides containing histidyl residues**, *Coordination Chemistry Reviews*, 327-328 (2016) 43-54.
Hatástényező: 12,944 (2015)
4. N. Lihi, D. Sanna, I. Bányai, K. Várnagy, I. Sóvágó, **Unusual binding modes in the copper(II) and palladium(II) complexes of peptides containing both histidyl and cysteinyl residues**, *New Journal of Chemistry*, 41 (2017) 1372-1379.
Hatástényező: 3,277 (2015)
5. N. Lihi, M. Lukács, D. Szűcs, K. Várnagy, I. Sóvágó, **Nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes of peptides containing separate aspartyl and cysteinyl residues**. *Polyhedron*, 133 (2017), 364-373.
Hatástényező: 2,107 (2015)

Tudományos folyóiratban még meg nem jelent közlemények

1. N. Lihi, T. Czine, G. Sciortino, E. Garribba, **DFT and TD-DFT studies on nickel(II) complexes containing peptides and Schiff base ligands**. (közlésre előkészítve)

Az értekezés anyagához szorosan nem kapcsolódó közlemények

1. D. Sanna, K. Várnagy, N. Lihi, G. Micera, E. Garribba, **Formation of new non-oxido vanadium(IV) species in aqueous solution and in the solid state by tridentate (O, N, O) ligands and rationalization of their EPR behavior.** *Inorganic Chemistry*, 52(14) (2013) 8202-8213.
Hatástényező: 4,820
2. Á. Dávid, Cs. Kállay, D. Sanna, N. Lihi, I. Sóvágó, K. Várnagy, **Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) complexes of rat amylin fragments. The anchoring ability of specific non-coordinating side chains.** *Dalton Transactions*, 44(39) (2015) 17091-17099.
Hatástényező: 4,177
3. Zs. Bihari, V. Ugone, E. Garribba, N. Lihi, P. Buglyó, **Complex formation between $[(\eta^6\text{-p-cym})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ and oligopeptides containing three histidyl moieties.** *Journal of Organometallic Chemistry*, 823 (2016) 116-125.
Hatástényező: 2,336
4. N. Lihi, A. J. Godó, G. Sciortino, E. Garribba, K. Várnagy, **Tridentate (O, N, O) ligands as potential chelator compounds for iron overload.** *Polyhedron*, 123 (2017) 192-205.
Hatástényező: 2,107
5. N. Lihi, M. Lukács, M. Raics, Gy. Szunyog, K. Várnagy, Cs. Kállay, **The effect of carboxylate groups on the complexation of metal ion with oligopeptides.** *Inorganica Chimica Acta*, (2017) kézirat beküldve.

Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások (lectures)

1. Várnagy Katalin, Lihi Norbert, Raics Mária, Grenács Ágnes, Szunyog Györgyi, Timári Sarolta, Turi Ildikó: **A cisztein tartalmú peptidok fémionmegkötő képességének szelektivitása.** 49. *Komplexxémiai Kollokvium*, Siófok, 2015. május 26-28.
2. Várnagy Katalin, Lihi Norbert, Raics Mária, Grenács Ágnes, Szunyog Györgyi, Timári Sarolta, Turi Ildikó: **Az oldalláncok hatása a cisztein tartalmú peptidok fémionmegkötő képességének szabályozására.** *MKE 2. Nemzetközi Konferencia*, Hajdúszoboszló, 2015. augusztus 31-szeptember 2.
3. Lihi Norbert, Raics Mária, Daniele Sanna, Várnagy Katalin, Sóvágó Imre: **A cisztein hatása hisztidint is tartalmazó peptidok átmenetifém-komplexeiben.** 50. *Komplexxémiai Kollokvium*, Balatonvilágos, 2016. május 30-június 1.

A tiolátcsoport hatása oldalláncban egyéb donorcsoportot tartalmazó peptidek komplexképző sajátságaira

4. Norbert Lihi, Mária Raics, Daniele Sanna, Katalin Várnagy, Imre Sóvágó: **Transition metal complexes of peptides with cysteine and histidine binding sites: a thermodynamic and structural study.** *13th European Biological Inorganic Chemistry Conference*, Budapest, 2016. augusztus 28-szeptember 1.
5. Lihi Norbert: **A tiolátcsoport hatása peptidek fémionmegkötő sajátságaira.** *MTA Fizikai-Kémiai Bizottság kihelyezett ülése*, Debrecen, 2016. november 25.

Az értekezés anyagához kapcsolódó poszterek (posters)

1. Norbert Lihi, Ágnes Grenács, Sarolta Timári, Ildikó Turi, Györgyi Szunyog, Katalin Várnagy and Imre Sóvágó: **Metal ion selectivity of cysteine containing peptides**, *13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC13)*, Galway, Írország, 2015. június 12-15.
2. Katalin Várnagy, Mária Raics, Norbert Lihi, Daniele Sanna, Csilla Kállay and Imre Sóvágó: **The effect of side chain donor groups on the metal binding selectivity of cysteine containing peptide**, *13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC13)*, Galway, Írország, 2015. június 12-15.
3. Ágnes Grenács, Norbert Lihi, Sarolta Timári, Ildikó Turi, Katalin Várnagy and Imre Sóvágó: **Transition metal complexes of peptides containing thiolate functions**, *13th International Symposium on Inorganic Biochemistry*, Karpacz, Lengyelország, 2015. szeptember 1-7.
4. Györgyi Szunyog, Márton Lukács, Norbert Lihi, Ágnes Grenács and Katalin Várnagy: **Metal complexes of cysteine containing peptides**, *International Symposium on Metal Complexes 2016 (ISMEC 2016)*, Barcelona, Spanyolország, 2016. június 7-10.
5. Norbert Lihi, Mária Raics, Csilla Kállay, Katalin Várnagy and Imre Sóvágó: **Thermodynamic and structural characterization of transition metal complexes of peptides with thiolate and other binding sites**, *International Symposium on Metal Complexes 2016 (ISMEC 2016)*, Barcelona, Spanyolország, 2016. június 7-10.
6. Norbert Lihi, Ágnes Grenács, Katalin Várnagy, Imre Sóvágó: **The effect of distant cysteinyl residues on the complex formation processes of peptides containing other binding sites**, *14th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC 14)*, Toulouse, Franciaország, 2017. június 7-10.