

dc_586_12

MTA Doktori értekezés

**AZ IMIDAZOLGYŰRŰ SZEREPE A FÉMIONMEGKÖTÉSBEN:
OLDALLÁNCBAN TÖBB DONORCSOPORTOT TARTALMAZÓ
PEPTIDEK ÉS SZÁRMAZÉKAIK ÁTMENETIFÉM KOMPLEXEINEK
EGYENSÚLYI ÉS REDOXI SAJÁTSÁGAI**

Várnagy Katalin

Debreceni Egyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
Debrecen

2013



dc_586_12

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés	1
2. Célkitűzés	3
2.1. Az imidazolgyűrű hatásának vizsgálata a komplexképződési folyamatokra	3
2.2. Réz(II)-komplexek elektrokémiai és SOD-aktivitás vizsgálata	5
3. Irodalmi áttekintés	7
3.1. Az oldalláncban koordinálódó donorcsoportot nem tartalmazó oligopeptidek koordinációs sajátosságai	8
3.2. Az oldalláncban koordinálódó donorcsoportot tartalmazó oligopeptidek koordinációs sajátosságai	10
3.2.1. A karboxilátcsoport hatása a peptidek komplexképzési folyamataira	10
3.2.2. A tioéterkén-atom hatása a peptidek komplexképzési folyamataira	14
3.2.3. A diszulfid-híd hatása a peptidek komplexképzési folyamataira	16
3.2.4. A tiolátcsoport hatása a peptidek komplexképzési folyamataira	18
3.2.5. Az imidazolgyűrű hatása a peptidek komplexképzési folyamataira	20
3.2.6. Az oldalláncbeli donorcsoportok hatásának általános tendenciái a peptidek komplexképzési folyamataiban	24
3.3. A szuperoxid-diszmutáz enzimek és azok modellezése	29
4. Alkalmazott vizsgálati módszerek és értékelési eljárások	32
4.1. Felhasznált vegyszerek, vizsgált ligandumok	32
4.2. Szintézis	35
4.3. pH-potenciometria	36
4.4. UV-látható spektrofotometria	38
4.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia	40
4.6. ESR spektroszkópia	42
4.7. Tömegspektrometria (MALDI-TOF-MS)	43
4.8. ^1H NMR spektroszkópia	45
4.9. Ciklikus voltammetria	46
4.10. Szuperoxid-diszmutáz aktivitás vizsgálatok	49
5. Kísérleti eredmények és értékelésük	51
5.1. Kelátképző helyzetben levő imidazolgyűrűk hatása az aminosav- és peptidszármazékok komplexképző sajátosságaira	51
5.1.1. A bisz(imidazol-2-il)-csoportot tartalmazó ligandumok sav-bázis sajátosságai	54
5.1.2. Bisz(imidazol-2-il) koordinációjú komplexek	55
5.1.3. Ligandumhidas és imidazolhidas kétmagvú komplexek	61

5.1.4. Imidazolátohidas többmagvú komplexek	67
5.1.5. A peptidlánc koordinációjának szerepe a bisz(imidazol-2-il) származékok komplexképződési folyamataiban.....	72
5.2. <i>Kelátképző helyzetben levő piridinggyűrűk hatása az aminosavszármazékok komplexképző sajátosságaira</i>	76
5.2.1. Bisz(piridin-2-il)-származékok sav-bázis sajátosságai.....	77
5.2.2. Az egyszerű bisz(piridin-2-il) származékok komplexképző sajátosságai	77
5.2.3. Bisz(piridin-2-il)-csoportot tartalmazó aminosav-származékok komplexképző sajátosságai	79
5.3. <i>A C-terminális hisztidin hatása a peptidek komplexképző sajátosságaira</i>	84
5.3.1. Harmadik helyen hisztidint tartalmazó tripeptid átmenetifém-komplexei	85
5.3.2. Negyedik-, ötödik- és hatodik helyen hisztidint tartalmazó oligopeptidek réz(II)- és nikkel(II)-komplexei	86
5.4. <i>Hisztidin analóg aminosavak hatása a peptidek komplexképző sajátosságaira</i>	90
5.4.1. A különböző heteroaromás gyűrűt tartalmazó aminosavak sav-bázis és komplexképző sajátosságai.....	92
5.4.2. A C-terminális hisztidin analóg aminosav hatása a tripeptidek komplexképző sajátosságaira	93
5.5. <i>Több hisztidin hatása a terminálisan védett peptidek komplexképző sajátosságaira</i>	97
5.5.1. Két, három vagy négy hisztidint tartalmazó védett peptidek sav-bázis és komplexképző sajátosságai.....	99
5.5.2. Az oldalláncon keresztül koordinálódó komplexek stabilitását befolyásoló tényezők	105
5.6. <i>Az imidazol koordinációjú réz(II)-komplexek elektrokémiai vizsgálata</i>	108
5.7. <i>Szuperoxid-diszmutáz aktivitás vizsgálatok</i>	115
6. Összefoglalás	121
7. Az eredmények hasznosítási lehetőségei	126
Köszönetnyilvánítás	127
Mellékletek	129
Az értekezés alapját képező közlemények	143
Az irodalmi áttekintéshez felhasznált közlemények	146
Az értekezéshez kapcsolódó előadások	148
Az értekezéshez kapcsolódó posztterek	150
Hivatkozások	152

1. Bevezetés

A biológiai rendszerekben szerepet játszó fémionok nagyon gyakran a fehérjék, oldalláncbéli donorcsoportjaihoz kötődnek. A leggyakoribb fémionkötőhely a hisztidin oldalláncának imidazolgyűrűje, de gyakran emellett szerepet játszik a fémion megkötésében a cisztein tiol-, a metionin tioéter- vagy egy diszulfidhíd kéndonoratomja, illetve az aszparaginsav, glutaminsav karboxilátcsoportja. Jól ismert tény, hogy pl. a szénsavanhidrázban három imidazolgyűrűhöz cink(II)ion kötődik, a karboxipeptidázban, termolizinben szintén cink(II) kötődik két imidazolgyűrűhöz és egy karboxilátcsoporthoz, míg a plasztocianinban réz(II)ion kapcsolódik két imidazolgyűrűhöz és két kénatomhoz.¹⁻³

Külön kiemelem a Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz (CuZnSOD) enzimet, amelynek aktív centrumában a rézion hisztidin imidazolnitrogénekhez és egy vízmolekulához koordinálódik, míg a cinkion egy aszparaginsav karboxilátcsoportjához és három hisztidin imidazolgyűrűjéhez kötődik, a két fémiont egy imidazolátcsoport kapcsolja össze kétmagvú centrumot létrehozva. Ebben a metalloenzimben a cinknek elsősorban szerkezetalakító szerepe van, míg a rézion redoxi folyamatot katalizál, amelynek során reverzibilis Cu(II)-Cu(I) átalakulás játszódik le.

A fémionok részvételével lejátszódó folyamatok vizsgálatakor a fő kérdés az, hogy hogyan kötődik a fémion az egyes proteinekhez, enzimekhez, és hogyan befolyásolja azok működését. A különböző fémtartalmú enzimek, proteinek és egyéb peptidláncot tartalmazó vegyületek legegyszerűbb modelljei azok a rendszerek, amelyek központi ionként valamilyen átmenetifémiont, ligandumként aminosavat, peptidet vagy azok származékát tartalmazzák. Ezért a biológiai kutatásokkal párhuzamosan fokozott érdeklődés kíséri ezen rendszerek tanulmányozását. A nagy oligopeptid- vagy fehérje molekulák fémionmegkötő tulajdonságainak vizsgálatához, a kialakuló komplexek szerkezetének a meghatározásához azonban ismernünk kell a különböző oldalláncbéli donorcsoportokat tartalmazó kismolekulák fémionokkal szembeni viselkedését, komplexképző tulajdonságait.

A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában az ilyen jellegű kutatások több évtizedes múltra tekintenek vissza. A kutatások a legegyszerűbb dipeptidektől kezdve az egyre nagyobb tagszámú és változatos aminosavszekvenciájú peptidek irányába folytatódtak.

Az egyszerű peptidek fémionokkal alkotott komplexeinek eredményei mindenekelőtt azt tükrözték, hogy a peptidek, mint fémionmegkötők, leginkább a réz(II)-, nikkel(II)- és

cink(II)ionok számára szolgálnak fontos kötőhelyként. Ha a peptidek terminális aminos csoportot tartalmaznak, általánosan jellemző rájuk, hogy a réz(II)- és nikkel(II)ionokat széles pH tartományban képesek stabilisan megkötni. Ennek oka többek között az, hogy e két fémion képes a peptidkötés deprotonálódásának indukálására és így a peptidvázhoz való stabilis koordinálódásra. Az egyre nagyobb számú és változatos oldalláncbeli csoportok azonban képesek jelentős mértékben befolyásolni ezeket a folyamatokat, és előtérbe kerülhetnek az oldallánc koordinálódásával kialakuló komplexek. Míg az említett fémionok szempontjából gyengén koordinálódó donorcsoportnak számító tioéter- és diszulfidkén-donoratomok, illetve karboxilátcsoporthoz számának növelése a peptidben csak csekély hatással van a komplexképződési folyamatokra, addig az erősen kötődő imidazols csoport jelenléte alapvetően megváltoztathatja a molekula koordinációs sajátosságait. Ennek megfelelően a hisztidintartalmú peptidek fémkomplexeit már nagyon széles körben és igen részletesen vizsgálták. A kutatások azonban általában nem szisztematikus vizsgálatok voltak, elsősorban a keletkező komplexek szerkezetének meghatározására irányultak, és csak néhány esetben közöltek a komplexekre vonatkozó elektrokémiai adatokat.

Így ahhoz, hogy az imidazolgyűrű szerepéről a komplexképződési folyamatokban további információkat nyerjünk egyre nagyobb tagszámú és egyre több oldalláncbeli donorcsoportot vagy funkcionizált donorcsoportot tartalmazó peptid szintézisét és vizsgálatát végeztük el. A vizsgált ligandumok egyik csoportját olyan kistszámú peptidek alkották, amelyekben a természetben nem előforduló, a hisztidinnel analóg más heteroaromás gyűrűt tartalmazó aminosav van jelen. A ligandumok igen széles körét felölelő másik csoport az aminosav- és peptidszármazékokat jelenti, amelyekben két imidazolgyűrű kelátképző helyzetben van jelen. Végül a harmadik csoportba tartoznak azok a terminálisan védett peptidek, amelyek különböző számban és helyen tartalmaznak hisztidint.

Ez utóbbi két csoport fémkomplexeinek vizsgálata során megállapítható volt, hogy nagy stabilitású, csak az imidazolgyűrűn keresztül koordinálódó komplexek keletkeznek és mennyiségük jelentős a gyengén savas pH tartományban. Ezeknek a komplexeknek abból a szempontból van jelentőségük, hogy hasonló a fémion körüli koordinációs környezet és a fémkomplekre jellemző redoxipotenciál érték több metalloenzim, így például a CuZnSOD enzim aktív centrumának fémkötő helyéhez.

2. Cékitűzés

2.1. Az imidazolgyűrű hatásának vizsgálata a komplexképződési folyamatokra

Munkánk során nagyszámú, általában több oldalláncbeli donorcsoportot tartalmazó peptid, aminosav- és peptidszármazék elsősorban réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)-komplexét vizsgáltuk, néhány esetben egyéb fémionokkal kiegészítve. A fő kérdés annak tisztázása volt, hogy a különböző – az adott fémion szempontjából – gyengén, illetve erősen koordinálódó donorcsoportok hogyan befolyásolják a vizsgált molekula koordinációs sajátságait. Így céljaink az alábbiak voltak:

- *Kelátképző helyzetben két imidazolgyűrűt (bisz(imidazol-2-il)-csoportot) tartalmazó aminosav-, valamint di- és tripeptidszármazékok átmenetifém komplexeinek vizsgálata.*

A bisz(imidazol-2-il)-csoportot tartalmazó ligandumok fémkötő képességének, komplexképző sajátságainak vizsgálata során arra kerestük a választ, hogy a metilencsoporton keresztül kapcsolódó két imidazolgyűrű milyen stabilitással képes kötni a különböző átmenetifém-ionokat, illetve ez a kötődés a bisz(imidazol-2-il)-csoportot tartalmazó aminosav- és peptidszármazékok esetén képes-e horgonycsoportként elősegíteni a peptidlánc amidcsoportjainak deprotonálódását és koordinálódását.

A bisz(imidazol-2-il)-csoporthoz kapcsolódó szabad terminális aminocsoportot tartalmazó peptidlánc hosszának és aminosav-szekvenciájának szisztematikus változtatásával a ligandumok olyan sorozatának szintézisére került sor, amelyek fémkomplexeinek vizsgálata alapján következtetést vonhattunk le arra vonatkozóan, hogy a terminális aminocsoport, illetve oldalláncbeli koordinálódásra képes donorcsoportok kompetícióba lépnek-e a bisz(imidazol-2-il)-csoporttal a fémionok megkötésében, illetve a molekulában megjelenő egyre nagyobb számú potenciális fémkötőhely milyen koordinációjú komplexek képződéséhez vezet a különböző pH tartományokban.

- *Kelátképző helyzetben két piridingyűrűt (bisz(piridin-2-il)-csoportot) tartalmazó aminosav-származékok átmenetifém-komplexeinek vizsgálata.*

Az átmeneti és soft (lágy) jellegű fémionok és a piridingyűrű N-donoratomja között hasonló típusú kölcsönhatás alakulhat ki, mint az imidazol N-donoratomjával. Így azon vegyületek vizsgálata, amelyekben az imidazolgyűrűt piridingyűrűvel helyettesítjük, egyúttal információt adhat az imidazolgyűrű komplexképződésben betöltött szerepéről is. Így a vizsgált bisz(pirid-2-il)-csoportot tartalmazó aminosav származékok tanulmányozása

egyrészt a ligandumban jelenlevő két piridingyűrű, a terminális aminos csoport és az oldalláncbeli imidazolgyűrű koordinációban betöltött szerepének, a kialakuló komplexek szerkezetének megismerésére, másrészt az analóg imidazolgyűrűt tartalmazó származékokkal való összehasonlításra adott lehetőséget.

- *Heteroaromás gyűrűt tartalmazó hisztidin analóg aminosavak, peptidek- és peptidszármazékok réz(II)- és nikkel(II)komplexeinek vizsgálata.*

Az imidazolgyűrűről, mint a fémionok fontos kötőhelyéről további információkat nyerhetünk, ha az imidazolgyűrűt tartalmazó ligandumok más heteroaromás gyűrűt tartalmazó analóg vegyületeit állítjuk elő és vizsgáljuk komplexképző sajátosságait. Ezek a heteroatomot tartalmazó aromás szerkezetek a piridin mellett a három nitrogénatomot tartalmazó triazol-, a kénatomot tartalmazó tienil-, valamint a kén- és nitrogénatomot tartalmazó tiazolcsoport voltak. Ezen hisztidinanalóg aminosavak fémkomplexeinek vizsgálatával a különböző aromás gyűrűk fémmegekötő képességének összehasonlítására volt lehetőség. Ugyanakkor a hisztidinnel analóg piridin-, illetve tienilgyűrűt tartalmazó aminosavak peptidláncba való beépítésével két – a GlyGlyHis peptiddel analóg – peptidszármazék szintézise is megvalósítható volt. A peptidszármazékok fémkomplexeinek tanulmányozása a kialakuló részecskék szerkezetének meghatározását és a két hisztidinanalóg peptid koordinációs sajátosságaival való összevetést, a szerkezetekben mutatkozó azonosságok és különbségek megállapítását tette lehetővé.

- *Terminálisan védett két-, három vagy négy hisztidint tartalmazó peptidek réz(II)- és nikkel(II)-komplexeinek vizsgálata.*

A hisztidin imidazolgyűrű szerepének vizsgálatában igen fontos területet képvisel az olyan több hisztidint tartalmazó peptidek tanulmányozása, amelyek szekvenciája valamely enzim aktív centrumának fémionkötőhelyével egyezik meg vagy azt modellezi. Ezen belül egy kutatási irányt jelent a CuZnSOD enzim cink(II)- és réz(II)-kötőhelyét modellező peptidek vizsgálata. Az enzimben a réz(II) megkötésében hisztidin oldalláncok, míg a cink(II) megkötésében a hisztidin oldalláncok mellett egy aszparaginsav karboxilát-csoportja is részt vesz. Így 14 két-, három vagy négy hisztidint tartalmazó, ezen kötőhelyek szekvenciáját modellező peptid réz(II)- és nikkel(II)-komplexeinek vizsgálatára került sor. A szisztematikusan tervezett peptidek szintézisével és fémkomplexeik vizsgálatával egyrészt választ kaphattunk arra a kérdésre, hogy a szabad terminális aminos csoport

hiányában az imidazolgyűrű horgonycsoportként való viselkedése hogyan hat a komplexképződési folyamatokra. Másrészt következtetést vonhatunk le arról, hogy hogyan befolyásolja a peptid hossza, szekvenciája, a molekulában jelenlevő hisztidin aminosavak száma, helyzete a csak az imidazolgyűrűn keresztül való kötődéssel kialakuló, makrokelátot tartalmazó komplexek stabilitását és mennyiségét a fiziológiás pH tartományban.

2.2. Réz(II)-komplexek elektrokémiai és SOD-aktivitás vizsgálata

A fenti vizsgálatokat követően azok a molekulák kerültek előtérbe, melyek esetén nagy stabilitású, az imidazol oldalláncon keresztül kötődő fémion-komplexek keletkeztek, hiszen ezen ligandumok fémkomplexei valós modelljei lehetnek a metalloproteinek fémkötőhelyeinek. Annak megismeréséhez, hogy vajon ezek a komplexek a szerkezetük mellett egyéb kémiai tulajdonságaikban is mutatnak-e hasonlóságot az enzimekben kötött fémionokhoz, a komplexképződési vizsgálatokat elektrokémiai és enzimaktivitás vizsgálatokkal egészítettük ki. Céljaink voltak:

- *Két-, három- és négy hisztidint tartalmazó terminálisan védett peptidek réz(II)-komplexei redoxi paramétereinek meghatározása.*

Az elektrokémiai vizsgálatok során a vizes oldatban keletkező komplexekre jellemző formálpotenciál értékek meghatározása volt a célunk, amely a kistérfogató mintában elvégezhető ciklikus voltammetriás mérések technikai megvalósítását és ilyen körülmények között a mérési paraméterek megállapítását tette szükségessé. A számos Cu(II)-peptid rendszer elektrokémiai vizsgálataiból az imidazolgyűrű koordinációjával kialakuló makrokelátot tartalmazó réz-komplexek formálpotenciál értékeit határoztuk meg, amely lehetőséget adott a formálpotenciál és a komplexek stabilitása, illetve a kötődő imidazolnitrogének száma közötti tendenciák megállapítására, valamint annak eldöntésére, hogy a jellemző elektrokémiai paraméterek beleesnek-e a CuZnSOD enzimre jellemző potenciáltartományba.

- *Bisz(imidazol-2-il)-csoportot tartalmazó ligandumok réz(II)-komplexei redoxi paramétereinek meghatározása.*

A számos bisz(imidazol-2-il)-csoportot tartalmazó vegyület réz(II)-komplexeinek vizes oldatban különböző aránynál és pH-n végzett elektrokémiai vizsgálatából megállapíthattuk, hogy mely szerkezetű komplexek esetén határozhatóak meg a jellemző

formálpotenciál értékek. Emellett következtetéseket vonhattunk le arra vonatkozóan, hogy milyen tendencia figyelhető meg a négy imidazol koordinációjú bisz-ligandumú komplexek jellemző redoxi paraméterei, a komplexek stabilitása és a kapcsolódó molekula mérete között. Továbbá a komplexekre és a CuZnSOD enzimre jellemző potenciál értékek összevetéséből becsléseket tehettünk a komplexek várható SOD aktivitására vonatkozóan is.

- *Három és négy imidazol koordinációjú, valamint imidazoláto-hidat tartalmazó komplexek SOD-aktivitásának vizsgálata.*

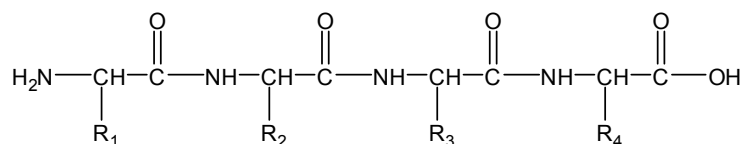
Az imidazolgyűrű komplexképződési folyamatokra gyakorolt hatásának tanulmányozására nagyszámú réz(II)-ligandum rendszer vizsgálatát végeztük el, és a számos, különböző koordinációs módú komplex közül néhány esetben a CuZnSOD enzim ígéretes szerkezeti modelljeként szóba jöhető komplexet mutattunk ki. Ezek a bisz(imidazol-2-il)-származékok négy imidazol-koordinációjú bisz-komplexei, néhány aminosav- és dipeptidszármazék esetén keletkező hárommagvú, imidazolátohidat tartalmazó komplexei, valamint a védett multihisztidin peptidek imidazol-koordinációjú makrokelátot tartalmazó komplexei voltak. Az elektrokémiai vizsgálatok alapján is érdemesnek véltük ezen komplexek SOD aktivitásának meghatározását. A mérési adatok lehetőséget adtak a legnagyobb aktivitású komplexek kiválasztására és annak az iránynak a meghatározására, amely lehetővé teszi olyan további ligandumok tervezését, ami sokkal nagyobb aktivitású komplexek képződéséhez vezethet.

3. Irodalmi áttekintés

A peptidek fémkomplexeinek több évtizedre visszanyúló vizsgálatai során a kistagszámú, oldalláncban különböző donorcsoportot tartalmazó peptidek fémkomplexeit mind termodinamikai, mind szerkezeti szempontból igen széleskörűen jellemezték, az eredményeket több mint ezer közleményben és számos összefoglaló munkában,^{4,5,D1} könyvfejezetben^{6-9,D2}, illetve két évente megjelenő könyvsorozat fejezeteiben¹⁰ foglalták össze.

Az irodalmi áttekintésben a hangsúlyt a peptidek fémkomplexeiben kialakuló koordinációs módok bemutatására helyezem, kitérve az oldalláncbeli donorcsoportok hatásának rövid elemzésére is. Az irodalom bemutatását azokra az eredményekre terjesztem ki, ami a dolgozat tárgyát képező munkámat megelőzi. Az értekezés “Kísérleti eredmények és értékelésük” fejezetéhez kapcsolódó közvetlen irodalmi háttér az adott résznél ismertetem. Az irodalmi előzményekben összefoglalt eredmények egy része szintén a kutatócsoportunkban született, és a hivatkozott közlemények közül azokat, amelyekben társszerző vagyok, külön listában **K1-K15** számmal jelölöm. Azon publikációim, amelyek az értekezés alapját képezik, **D1-D26** számozással szerepelnek a felsorolásban.

Az 1. ábra egy peptid általános szerkezetét mutatja be szabad terminális amino- és karboxilcsoporttal.



1. ábra Egy tetrapeptid általános szerkezeti képlete

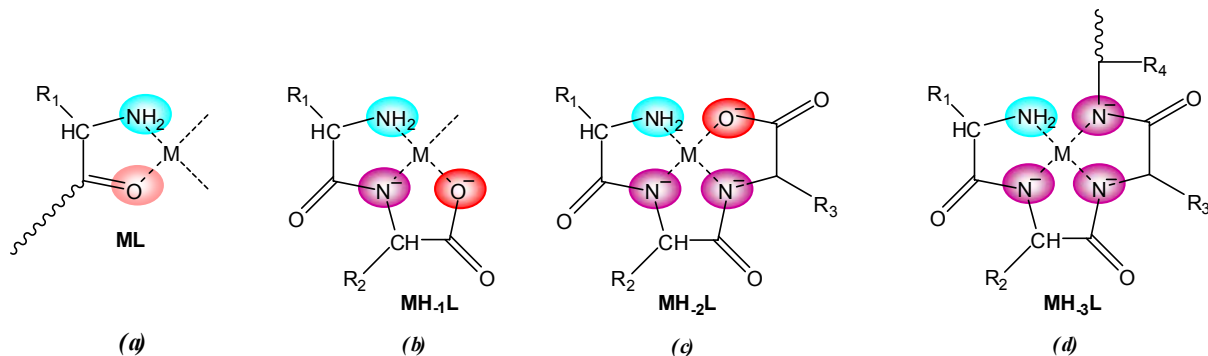
Mindkét terminális csoport képes fémion megkötésére és emellett potenciális donorcsoportot jelentenek a peptidcsoport N-donoratomjai. A peptidek oldalláncában előforduló különböző donorcsoportok – amire a 20-féle természetben előforduló aminosav módot ad – a lehetséges kötőhelyek számát tovább növelik és számtalan variációban megvalósulhat a peptidek kötődése a fémionokhoz.

3.1. Az oldalláncban koordinálódó donorcsoportot nem tartalmazó oligopeptidek koordinációs sajátosságai

A terminális amino- és karboxilátcsoport önmagában általában nem jelent erős kötési helyet, a terminális aminocsoport leginkább soft (lágy) jellegű fémionokkal (Ag(I), Hg(II)) képes erős kölcsönhatást kialakítani.¹¹ A karboxilátcsoport koordinációját több, elsősorban hard (kemény) jellegű fémion esetén (Ca(II), Ln(III)) mutatták ki, bár szilárd komplexekben egyéb fémionokkal, pl. Pb(II), Cd(II), Zn(II) is tapasztaltak kölcsönhatást. Ez a koordináció azonban vizes oldatban nem képes stabilizálni a kialakuló komplexeket és nem akadályozza meg a fémionok hidrolízisét, a csapadék kiválását lúgos pH tartományban.^{12,13}

A peptid-fémion kölcsönhatás szempontjából legfontosabb fémionok (Cu(II), Zn(II), Ni(II)) mindkét terminális csoporthoz képesek kötődni és a két csoport együttes koordinációja stabilizálja a komplexeket pl. az aminosavak esetén. A peptidekben azonban a két csoport távol kerül egymástól, így erre nincs lehetőség.

A terminális aminocsoport és a szomszédos karbonilcsoport ugyanakkor kelátképző helyzetben van, így a peptidek kétfogú koordinációja megvalósul számos fémion, így a fent említett három fémion esetén is (2.a ábra) ML összetételű komplexet eredményezve. (A komplexek jelölésénél egyszerűsítve csak a sztöchiometriát adom meg, a töltést nem tüntetem fel, mivel annak értéke a ligandumban jelenlevő egyéb oldalláncbeli csoportoktól is függ.)



2. ábra Nem koordinálódó oldalláncot tartalmazó peptidek lehetséges kötési módjai

A kialakuló (NH₂,CO) koordináció gyengébb kölcsönhatást jelent, mint az aminosavak esetén létrejövő (NH₂,COO⁻) koordináció, így önmagában többnyire nem képes megakadályozni a hidrolízist.

Az aminocsoporttal ugyancsak kelátképző helyzetben van a peptidkötés NH-csoportja, aminek kötődése azonban csak a csoport deprotonálódását követően valósulhat meg. A peptidek sav-bázis sajátosságainak vizsgálatából azonban ismert, hogy a peptidnitrogén(ek) a

pH 2-12 tartományban sem protonfelvételt, sem protonleadásra nem képesek vizes oldatban.^{4,6} Néhány fémion azonban képes elősegíteni az amidnitrogén deprotonálódását, így Cu(II) jelenlétében pH ~ 4, Ni(II) jelenlétében pH ~ 8 körül játszódik le ez a folyamat, míg Pd(II) jelenlétében már erősen savas, pH < 2 tartományban deprotonálódik a peptidkötés NH-csoportja. A folyamathoz azonban horgonycsoport jelenléte szükséges, ezt a szerepet a szabad terminális aminos csoport tölti be ezekben a peptidekben. Így a létrejövő MH_1L összetételű komplexben az (NH_2, N^-) koordináció valósul meg, amely dipeptidek esetén kedvezővé teszi a láncvégi karboxilátcsoporthoz kötődését is egy kettős kelát kialakulása révén (2.b ábra).

A nagyobb tagszámú peptidek esetén a következő amidnitrogén(ek) deprotonálódásával és koordinálódásával telítődik a fémion koordinációs szférája, tripeptidek esetén (NH_2, N^-, N^-, COO^-) koordinációval MH_2L (2.c ábra), míg tetra- és hosszabb oligopeptidek esetén (NH_2, N^-, N^-, N^-) koordinációval MH_3L (2.d ábra) komplexek képződnek.

A Cu(II)-peptid rendszerekben képződő komplexek geometriája a Cu(II)-komplexekre általánosan jellemző torzult oktaéder, és a fémion kötődése a peptidnitrogén donortomokhoz jól elkülöníthető, lépcsőzetes reakcióban játszódik le. A keletkező komplexek kinetikailag labilisak, így a komplexképződésre a gyors egyensúly kialakulása jellemző.

A Ni(II)-peptidkomplexek geometriája függ a peptid tagszámától.⁹ Dipptidek esetén a ligandum háromfogú koordinációja oktaédes geometriát eredményez, amely szerkezet a bisz-ligandumú MH_2L_2 komplexek képződését kedvezményezteté teszi. Ugyanakkor a nagyobb tagszámú peptidek esetén a két, illetve három amid-N donortom kötődése síknégyzetes szerkezetű diamágneses komplexek képződését eredményezi. A geometria megváltozása is hozzájárul ahhoz, hogy a komplexképződés során az amidcsoportok deprotonálódása és koordinálódása kooperatív módon, gyakran egy lépésben zajlik le. A komplexképződési folyamatok – különösen a nagyobb tagszámú peptidek esetén – meglehetősen lassan játszódhatnak le, ami az egyensúlyi vizsgálatokat megnehezíti.

A fent említett komplexek uralkodóak a fémion-peptid rendszerekben, de a fémion-ligandum aránytól függően számos egyéb összetételű komplex, elsősorban bisz-ligandumú, illetve vegyes hidroxo komplexek képződése is kimutatható.^{K2,14}

A Pd(II) szintén négyes koordinációs számú, síknégyzetes komplexeket alkot a peptidekkel, az amino- és az amid-N donortomok koordinálódásával és a komplexképződési folyamatokat a Ni(II)-nél is lassabb kinetika jellemzi.

A Zn(II)-ion viszont nem képes indukálni az amidcsoportok deprotonálódását és koordinálódását, ezekben a peptidekben viszonylag kis stabilitású (NH_2CO) koordinációs komplexek képződnek és fiziológiás és lúgos pH tartományban a fémion hidrolízise a jellemző.

3.2. Az oldalláncban koordinálódó donorcsoportot tartalmazó oligopeptidek koordinációs sajátosságai

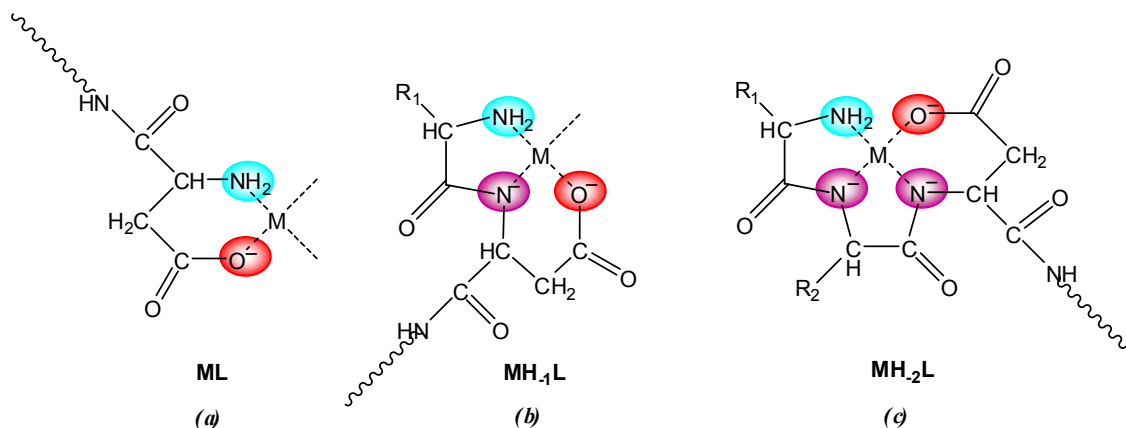
A különböző oldalláncbeli donorcsoportot tartalmazó peptidek komplexképző sajátosságaival kapcsolatosan általánosan megállapítható, hogy ha a molekulában szabad terminális aminos csoport van jelen, akkor a jelentős stabilitással kötődő fémionok számára ez a csoport az elsődleges horgonycsoport, és a legnagyobb mennyiségben keletkező komplexekben a fémion a peptidvázhoz koordinálódik. Ugyanakkor az oldalláncban jelenlevő donorcsoportok azok minőségétől, helyzetétől és számától függően jelentős mértékben módosíthatják a kialakuló komplexek szerkezetét és a keletkező komplexek mennyiségének arányát az egyszerű peptidekhez képest. A különböző oldalláncbeli donorcsoportok révén azonban a molekulaszervezet is jelentősen módosulhat vagy a donorcsoport jellege miatt (pl. diszulfidhidat tartalmazó peptidek) vagy a peptidkötés oldalláncban történő kialakítása révén (pl. az aszparaginsav, glutaminsav, lizin aminosavak $\beta\text{-COO}^-$, $\gamma\text{-COO}^-$, illetve $\varepsilon\text{-NH}_2$ csoportjának részvételével), amely még változatosabb összetételű részecskék képződését eredményezi.

A továbbiakban a biológiai rendszerekben legfontosabb fémionkötőhelyként megjelenő oldalláncbeli donorcsoportok, a karboxilát-, a tioéter- és diszulfidkén, valamint a ciszteincsoportok, és az imidazolgyűrű hatását foglalom össze.

3.2.1. A karboxilátcsoport hatása a peptidek komplexképzési folyamataira

Két aminosav, az aszparaginsav és a glutaminsav tartalmaz az oldalláncában karboxilcsoportot, β -, illetve γ -helyzetben. Általánosan igaz, hogy a szabad terminális aminos csoportot tartalmazó peptidek esetén az oldalláncbeli donorcsoport akkor fejt ki jelentős hatást a komplexképződési folyamatokra, ha az aminos csoport közel, tehát első, második vagy harmadik helyen található a megfelelő aminosav, és a koordinálódásra képes donoratom az amino- és/vagy amidnitrogénekhez képest kelátképző helyzetben van. Az oldalláncbeli karboxilátcsoport kötődése a fémionhoz aszparaginsav esetén hattagú, míg glutaminsav esetén héttagú kelátgyűrű kialakulásához vezet. Miután jól ismert, hogy a héttagú kelát stabilizáló

hatása jóval kisebb, mint az öt- vagy hattagú gyűrűé, ennek megfelelően az első, második, illetve harmadik helyen aszparaginsavat tartalmazó peptidek koordinációs módjait érdemes áttekinteni.^{15,16} Az első helyen aszparaginsavat tartalmazó peptidek esetén (NH_2COO^-) koordinációval hattagú kelátgyűrű jön létre, az ún. β -alanin-szerű koordináció, ami az aminosavszerű koordinációnál gyengébb, de az (NH_2CO) koordinációnál erősebb kölcsönhatást, így nagyobb stabilitású ML komplexek (3.a ábra) képződését eredményezi.



3. ábra Aszparaginsavat tartalmazó peptidek lehetséges koordinációs módjai

Az XaaAsp szekvenciát tartalmazó peptidek esetén az amidnitrogén kötődését követően kerül kedvező helyzetbe a karboxilátcsoport, ami elősegíti az első peptidcsoport deprotonálódását és koordinálódását és stabilis, kettős kelátot tartalmazó komplex képződik (MH_1L) (3.b ábra).

A harmadik helyen aszparaginsavat tartalmazó peptideknél legjelentősebb a karboxilátcsoport hatása, a két amidnitrogén deprotonálódásával és koordinálódásával a karboxilátcsoport is kötődni képes a fémionhoz, ezzel telítve a fémion koordinációs szféráját (3.c ábra). Ez a szerkezet olymértékben kedvező, hogy kialakulása során a két amidnitrogén deprotonálódása és kötődése kooperatív módon zajlik le. A karboxilátcsoport koordinációja a fémionhoz mindhárom esetben növeli az adott komplex stabilitását és akadályozza a rákövetkező amidnitrogén deprotonálódását és koordinációját. Ez a stabilitásnövekedés az XaaYaaAsp szekvenciát tartalmazó peptidek MH_2L komplexe esetén kiugró, ami a következő amidnitrogén deprotonálódását gyakorlatilag teljes mértékben megakadályozza, erre csak pH 11 feletti tartományban kerülhet sor.

A több aszparaginsavat tartalmazó peptidek (AspAsp, AspAspAsp, AspAspAspAsp)^{K3,K4} esetén az oldalláncbeli donorcsoportok hatása fokozottan érvényesül. A fent említett koordinációs módok jönnek létre, de a szabadon maradt karboxilátcsoportok a

ligandum tridentát koordinációját eredményezik a NiL komplexekben, míg azok gyenge axiális kölcsönhatása feltételezhető a CuL komplexekben, ami hozzájárul a komplex stabilitásának növekedéséhez. Ez a koordináció a növekvő aszparaginsav szám esetén válik egyre kedvezményezettebbé. A ligandum negatív töltése ugyanakkor egyre növekszik az aszparaginsavak számának növekedésével, ami szintén hatással van a komplexképződési folyamatokra. Így az aszparaginsavat követő amidnitrogének deprotonálódását nemcsak a koordinálódó karboxilátcsoport, hanem a kialakuló komplex növekvő negatív töltése is akadályozza. Ennek megfelelően az AspAspAspAsp esetén a tetraglicin-szerű koordináció kialakulása nagyobb mértékben akadályozott, mint az XaaYaaAsp szekvenciát tartalmazó tetra- és hosszabb tagszámú peptidek esetén.

Az első, második vagy harmadik helyen glutaminsavat tartalmazó peptidekben a karboxilátcsoport csekély mértékben növeli a képződő komplexek stabilitását, hatása sokkal kevésbé jelentős, mint a megfelelő aszparaginsav tartalmú peptidek esetén. Ugyanakkor a növekvő számban glutaminsavat tartalmazó peptidek szisztematikus vizsgálata azt tükrözte, hogy a nagy negatív töltésű komplexek kialakulása jelentős mértékben akadályozza az amidnitrogének deprotonálódását.^{K3,K4}

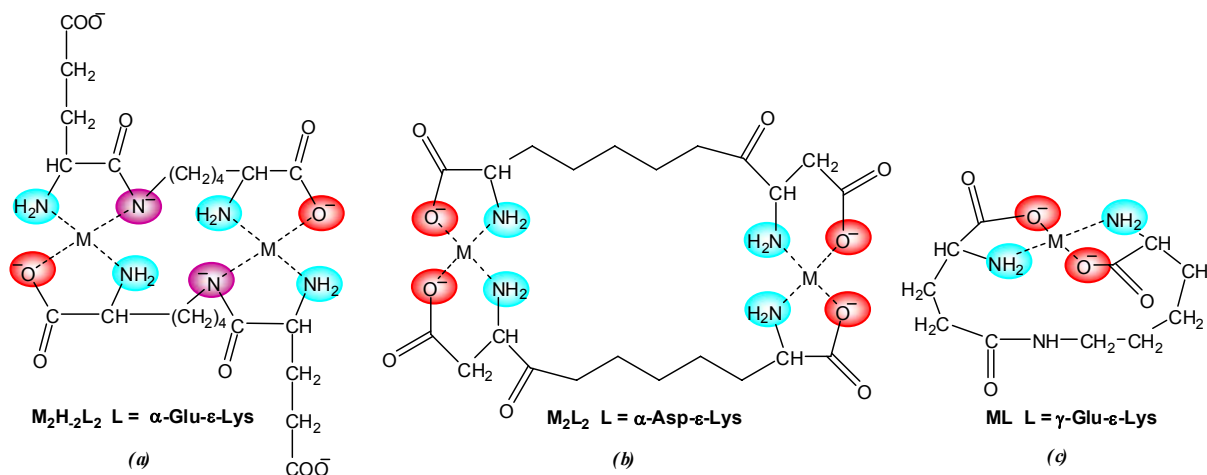
Az oldalláncbeli karboxilátcsoport hatása még kevésbé érvényesül cink(II)ionok jelenlétében,^{17,18} ugyanakkor meglepő módon a soft (lágyszárú) palládium komplexeiben is kimutatható a kölcsönhatásuk.¹⁹ Az N-terminális aszparaginsavat tartalmazó di- és tripeptidek cink(II)-komplexeiben ($\text{NH}_2, \beta\text{-COO}^-$) koordináció jön létre, ami megnöveli a képződő ZnL komplexek stabilitását az egyszerű peptidekéhez képest, és ez a stabilitásnövekedés valamivel nagyobb mértékű több aszparaginsav jelenlétében. Ez a koordináció azonban nem tartja oldatban a fémiont a lúgos pH-tartományban. A második helyen levő aszparaginsav pedig nem képes elősegíteni az amidnitrogén deprotonálódását, a komplexképződési folyamatok az egyszerű di- és tripeptidekhez hasonlóan játszódnak le.

Az oldalláncbeli karboxilátcsoport vagy aminocsoport jelenléte peptidvázban módosított ligandumok szintézisét teszi lehetővé. Ha a peptidkötés az aszparaginsav, illetve glutaminsav oldalláncbeli karboxilcsoportján keresztül jön létre, az α -aminosavakhoz hasonlóan ($\text{NH}_2, \alpha\text{-COO}^-$) koordinációval öttagú kelátgyűrű alakulhat ki. Így $\beta\text{-AspXaa...}$ és $\gamma\text{-GluXaa...}$ szekvenciájú peptidek esetén¹⁶ az aminosavszerű koordinációval stabilis ML és ML_2 összetételű komplexek képződnek. Ez a koordináció $\beta\text{-AspXaa...}$ szekvencia esetén gátolja az amidnitrogén deprotonálódását, a $\beta\text{-AlaGly}$ -hez képest a folyamat nagyobb pH-n játszódik le,²⁰ és ezt követően az amino- és amidnitrogén koordinációjával egy hattagú kelátot

tartalmazó komplex alakul ki. γ -GluXaa... szekvencia jelenlétében a peptidnitrogén deprotonálódását és koordinációját nem is mutatták ki a mérhető pH-tartományban, amit magyaráz, hogy az így kialakuló komplexben a jóval kevésbé kedvezményezett héttagú kelát jönne létre.

A peptidváz további jelentős mértékű módosulásához vezet, ha a molekulában egy lizin ϵ -aminocsoportján keresztül valósul meg az aminosavak kapcsolódása. Ilyen peptidvázban módosított dipeptidek az α -Asp- ϵ -Lys, α -Glu- ϵ -Lys és γ -Glu- ϵ -Lys, amelyek vizsgálatát az is indukálta, hogy az ϵ -Lys aminocsoportján keresztül kapcsolódó aminosavak a természetben is előfordulnak, pl. a polipeptidláncok közötti keresztkötéssel a fehérjék harmadlagos szerkezetének kialakításában játszanak szerepet, illetve a baktériumok sejtfalában az így kialakuló oligopeptidek hídként kapcsolják össze a poliszacharid-láncokat.²¹⁻²³

A C-terminális részen levő ϵ -lizin α -aminosav-szerű koordinációval stabilisan köti a fémiont. A molekula N-terminális részén jelenlevő α -Glu a peptidekhez hasonlóan dipeptid-szerű koordináció, az α -Asp β -alanin-szerű koordináció, míg a γ -Glu α -aminosav-szerű koordináció létrejöttét eredményezi. Ez igen változatos összetételű egy- és kétmagvú komplexek megjelenéséhez vezet a pH-tól függően. Ezek közül a Cu(II)- α -Glu- ϵ -Lys rendszerben pH 10 felett kimutatott $\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2$ összetételű komplexet mutatja be a 4.a ábra.²⁴



4. ábra Peptidvázban módosított peptidek lehetséges koordinációs módjai

Ugyanakkor az α -Asp- ϵ -Lys ligandum szinte a teljes pH-tartományban két fémionhoz képes kötődni stabilis kétmagvú $[\text{M}_2\text{L}_2]$ komplexeket létrehozva (4.b ábra). Ez a komplex, amelyben a fémionok az oldalláncon keresztül kötődnek, uralkodó a fiziológiai pH-tartományban, akadályozva az amidnitrogének deprotonálódását. Így ez folyamat csak réz(II) jelenlétében és

csak lúgos tartományban játszódik le, és ezt követően is megmarad a kétmagvú szerkezet.^{K5} Az γ -Glu- ϵ -Lys peptid esetén szintén képes a ligandum mindkét végén kötődni a fémionhoz, a molekula hossza azonban itt ekvimoláris oldatban ugyanahhoz a fémionhoz történő kötődést és egymagvú makrokelátot tartalmazó komplex képződését eredményezi (4.c ábra), és csak fémionfeleslegnél mutatható ki kétmagvú komplex képződése.²⁴

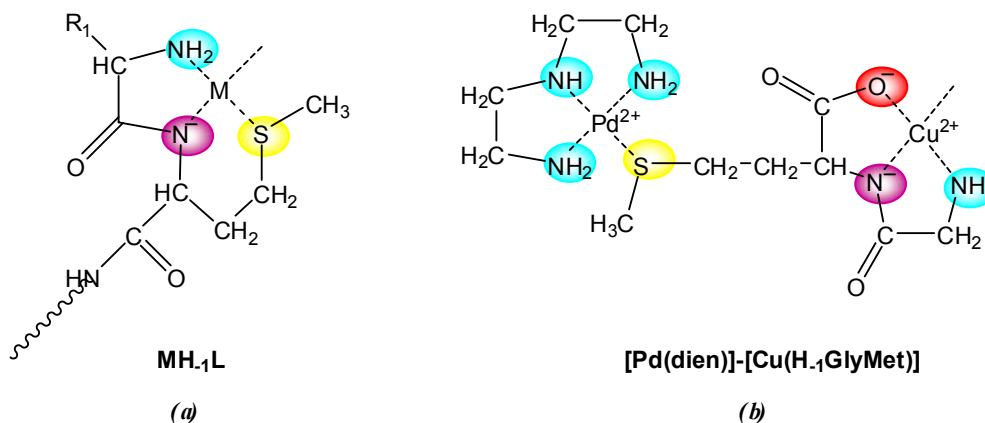
3.2.2. A tioéterkén-atom hatása a peptidek komplexképzési folyamataira

A tioéterkén számos enzimen szolgál a fémionok számára kötési helyként, így például a kék-réz-proteinekben is kimutatható ez a kölcsönhatás. Ugyanakkor hangsúlyozni kell, hogy a metalloenzimek aktív centrumában levő tioéterkén-atomok csak más donoratomokkal együtt biztosítják a fémionok (réz, nikkel, cink) megkötését. Annak megállapítására, hogy hogyan befolyásolja az oldalláncbeli kén donoratom a fémionok kötődését a peptidben számos metionin-, illetve S-metil-ciszteint tartalmazó peptidet tanulmányoztak. Ezek alapján általánosan megállapítható, hogy a peptidek komplexképződési folyamataiban réz(II)- és nikkel(II)ionok jelenlétében a peptidváz koordinációja a meghatározó, a kénatomnak csak gyenge koordinációja mutatható ki, és a donorcsoportok számának növelése sem eredményez számottevő változást a kialakuló komplexek összetételében és stabilitásában.

A metionint, illetve S-metil-ciszteint tartalmazó dipeptidekben a réz(II)-kén kölcsönhatás nagyon gyenge és csak savas tartományban mutatható ki.^{6,25,26,K6} Ugyanakkor a vizsgálatok azt is megállapították, hogy egyrészt a kelátképzés szempontjából kedvezőbb helyzetben tioéterkén-atomot tartalmazó S-metil-cisztein jelenlétében az oldallánc axiális kötődésének hatása jelentősebb mértékű. Másrészt az N-terminális részen jelenlevő oldalláncbeli tioéterkén-atom kötődése térbelileg kedvezményezettebb, az amino- és karbonilcsoporttal együtt a ligandum tridentát koordinációja feltételezhető.²⁷

A metionint különböző számban és helyzetben tartalmazó tripeptidek szisztematikus vizsgálatából^{K7,K8} hasonló következtetéseket vontunk le, a keletkező komplexek stabilitása gyakorlatilag nem változik az egyszerű peptidekhez képest. Ugyanakkor az UV-látható és CD spektroszkópiás vizsgálatok bebizonyították, hogyha a ligandum egyéb donorcsoportokon keresztül koordinálódik és a kialakuló komplexben a tioéterkén megfelelő helyzetbe kerül a fémionnal való kölcsönhatás kialakításához, akkor ez ki is alakul. Ez összhangban van azzal a tapasztalattal, hogy a metalloenzimek aktív centrumában levő kénatomok is csak más donoratomokkal együtt kötik meg a fémionokat. Így az N-terminális metionint tartalmazó

peptid esetén a CuL , a közbelső metionint tartalmazó peptid esetén a CuH_1L (5.a ábra), míg a C-terminális metionint tartalmazó peptid esetén a CuH_2L komplexben mutatható ki a $\text{S} \rightarrow \text{Cu(II)}$ kölcsönhatás, és ennek megfelelően a két és három metionint tartalmazó peptidek esetén ez a kölcsönhatás két, illetve mindhárom keletkező komplexben megjelenik.



5. ábra Tioéterkén-atomot tartalmazó peptidek lehetséges koordinációs módjai

A nikkel(II)-komplexek esetén csak az N-terminális metionint tartalmazó peptideknél mutatható ki $\text{S} \rightarrow \text{Ni(II)}$ kölcsönhatás, vagyis csak az oktaéderes geometria teremti meg a tioéter-kénatom koordinációjának a lehetőségét.

A CD spektroszkópiás vizsgálatok^{K8} egyúttal arra is rávilágítottak, hogy ez a vizsgálati módszer sokkal érzékenyebb a $\text{S} \rightarrow \text{M(II)}$ kölcsönhatás kimutatására, miután a töltésátviteli sáv az $\text{N}^- \rightarrow \text{M(II)}$ töltésátviteli sávtól elkülönülten jelenik meg, és az intenzitás függ az optikailag aktív aminosav helyzetétől, számától, valamint a koordináció ekvatoriális, illetve axiális jellegétől. Ez alapján azt is megállapítottuk, hogy a több metionint tartalmazó peptidek NiL komplexében több kéndonoratom koordinációja is megvalósul.

Cink(II)- és kadmium(II)ionok jelenlétében az egyszerű peptidekhez hasonló komplexképződési folyamatok figyelhetők meg, így kis stabilitású (NH_2, CO) koordinációjú komplexek képződése tapasztalható a savas tartományban, és a pH emelése a fémion hidrolíziséhez vezet.^{D2}

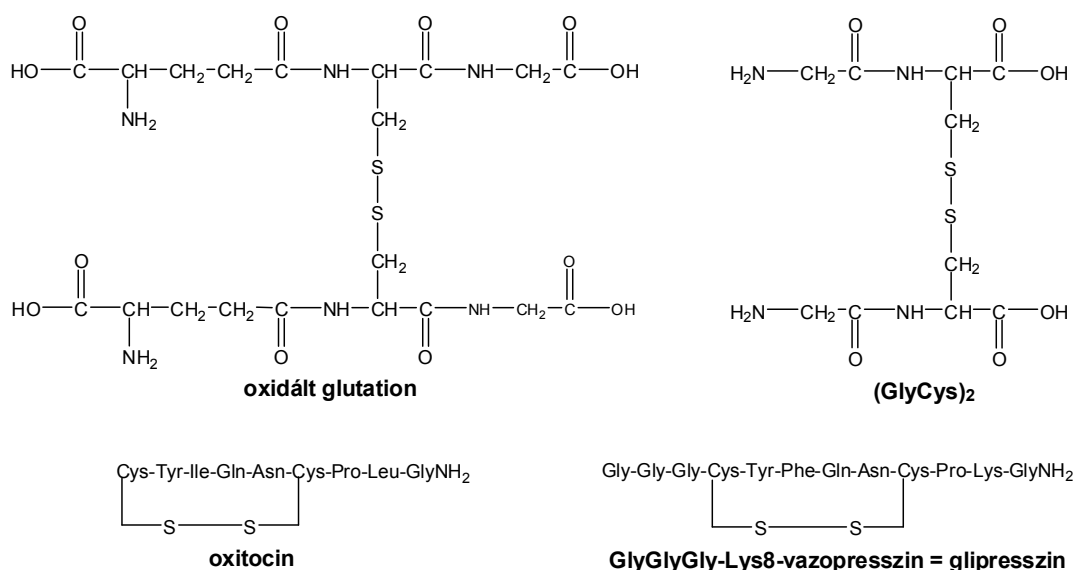
Ezzel szemben a palládium(II)ion számára elsődleges fémkötőhely a kén-donoratom.^{26,28-33,K9} a palládium erős kötődése a kéndonoratomokhoz magyarázza ezen fém mérgező szerepét is. N-terminális helyzetben metionint tartalmazó peptidek esetén erősen savas oldatban (NH_2, S) koordinációjú komplexek képződése mutatható ki, míg a második, illetve harmadik helyzetű metionin esetén az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S})$, illetve $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S})$ donoratomokon keresztül kötődő csatolt kelátrendszert tartalmazó komplexek képződnek. A

palládium ugyanakkor igen hatékonyan képes elősegíteni a peptidnitrogének deprotonálódását, és míg ez a folyamat a MetXaa... szekvenciánál a fiziológias pH tartományban le is zajlik, addig az XaaMet... szekvencia esetén kialakuló $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S})$ (5.a ábra) koordináció megakadályozza a további amidnitrogén(ek) deprotonálódását és koordinálódását.

Ugyanakkor, ha egy palládium-komplexben a koordinációs szféra nem telített, a tioéterkén donoratomon keresztül egyfogú koordináció is kialakulhat. Így egy réz(II)- vagy nikkel(II)-komplex nem koordinálódó oldalláncában található tioéterkén a koordinatív telítetlen palládium(II)-komplexhez kötődhet.^{K9} Ez megteremti a lehetőséget vegyes fémkomplexek előállítására, amelyben a tioétercsoportot tartalmazó oldallánc a híd szerepét tölti be. Így $[\text{Pd}(\text{dien})]\text{-}[\text{Cu}(\text{H}_1\text{GlyMet})]$ (5.b ábra) és $[\text{Pd}(\text{dien})]\text{-}[\text{Ni}(\text{H}_2\text{GlyMetGly})]$ vegyes komplexek képződését igazoltuk UV-látható, illetve ^1H NMR spektroszkópia segítségével. A tioétercsoport fémionszelektivitása így lehetővé teszi többmagvú vegyes fémkomplexek képződését, melyek elektrontranszfer rendszerek modelljei is lehetnek.

3.2.3. A diszulfid-híd hatása a peptidek komplexképzési folyamataira

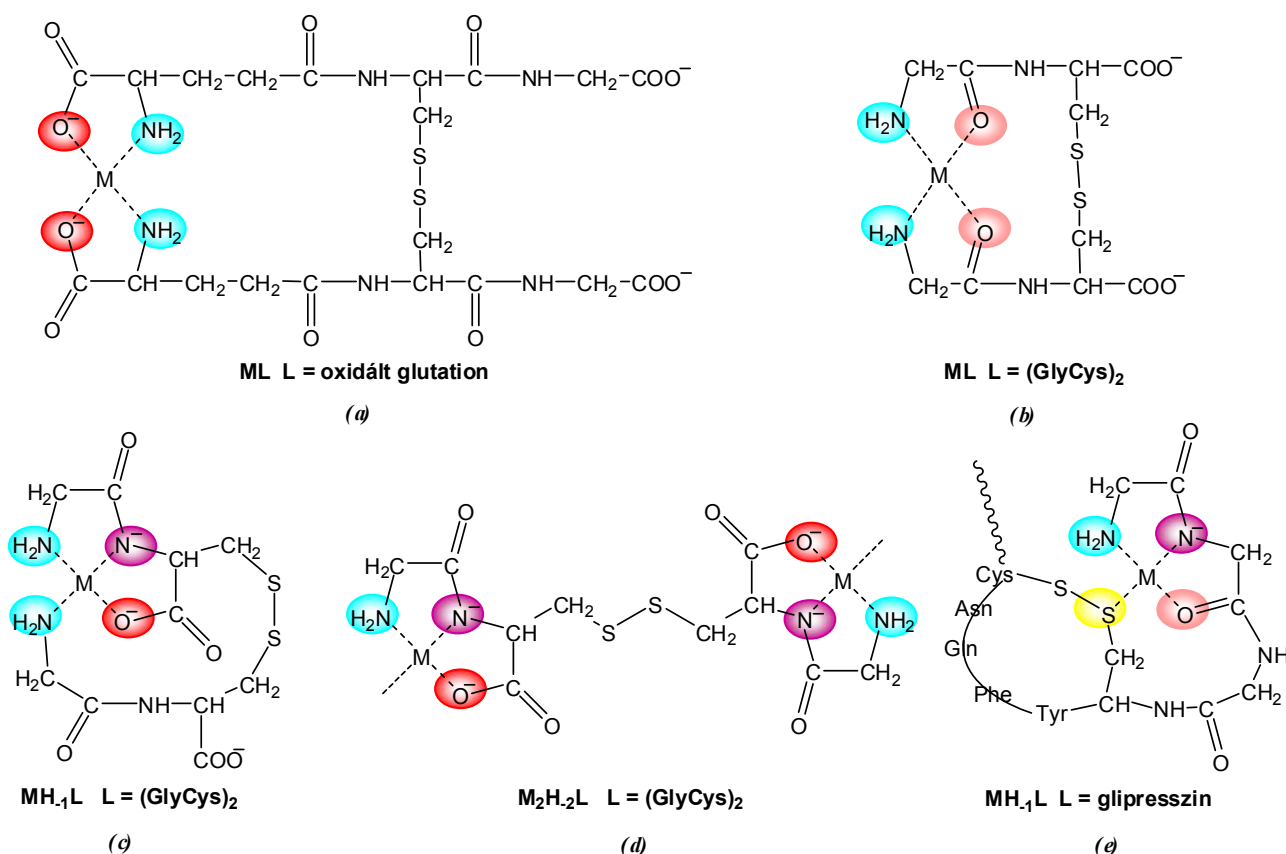
A diszulfidkén-atom és réz(II)-, nikkel(II)-, cink(II)ionok között általában a tioéterkén-atomhoz képest is kisebb mértékű kölcsönhatás alakul ki, ugyanakkor a ciszteincsoportok oxidációjával és összeakapsolódásával kialakuló híd vagy olyan molekulaszervezetet eredményez, amelyben a peptidrészek és így a fémkötő helyek egymástól távol kerülnek, vagy gyűrűs szerkezet kialakulásához vezetnek.



6. ábra Diszulfid-hidat tartalmazó ligandumok

A 6. ábra az oxidált glutation (GSSG) és glicil-ciszteinil-diszulfid (GlyCys)₂, valamint az oxitocin és egy vazopresszin származék (glipresszin) szerkezetét mutatja be, amelyek fémkomplexein keresztül szemléltethető a diszulfidkén hatása a komplexképződési folyamatokra.

Az oxidált glutation – ami az élő szervezetben is jelenlevő vegyület – talán a legszélesebb körben vizsgált molekula,^{K10,34-36} és a lúgos tartományban lezajló komplexképződési, és hidrolitikus folyamatok vizsgálatai még most sem teljesen tisztázottak. A két terminális γ -Glu rész révén aminosavszerűen koordinálódik a ligandum a fémionokhoz (Cu(II), Ni(II), Zn(II)), és a molekula mérete lehetővé teszi ugyanahhoz a fémionhoz való kötődést, a kialakuló 19 tagú makrokelát stabilizálja az ML komplexet (7.a ábra). Ez pH 10-ig megakadályozza az amidnitrogén deprotonálódását.



7. ábra Diszulfid-hidat tartalmazó ligandumok lehetséges koordinációs módjai

A (GlyCys)₂ ligandumban^{K10,K11} a diszulfid-hídon keresztül szimmetrikusan kapcsolódó két dipeptidrész (NH₂,CO) egysége hasonlóan szimmetrikusan kötődik a nikkell(II) és cink(II) ionokhoz, így az ML komplexet (7.b ábra) ebben az esetben is a kialakuló makrokelát stabilizálja, megakadályozva az amidnitrogén deprotonálódást. Ez a

ligandum a réz(II)ionokat dipeptidszerű, $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{COO}^-)$ koordinációval köti. A diszulfidkén-donoratom koordinációja itt sem mutatható ki annak ellenére, hogy térbelileg kedvező lehetőség van erre, azaz a diszulfidkén-atom nem képes a karboxilátcsoportot kiszorítani a koordinációs szférából.

A fémion ugyanakkor a másik láncvégi aminocsoportozhoz is kötődik, így szintén makrokelátot tartalmazó szerkezet jön létre (7.c ábra). A molekula szerkezete emellett kétmagvú komplexek kialakulására is lehetőséget ad fémionfelesleg jelenlétében (7.d ábra).

Ha a diszulfid-híd révén gyűrűs szerkezet alakul ki, ez általában nagyon kedvezményeztette teszi az amidnitrogének deprotonálódását, és 4N koordinációjú komplex képződését mutattuk ki az oxitocin és származékai esetén,^{K12} az amidnitrogének deprotonálódását azonban befolyásolja az aszparagin és a glutamin cseréje aszparaginsavra, illetve glutaminsavra.

A glipresszinben a gyűrűs molekularészt egy triglicin-rész előzi meg, így a terminális aminocsoport távol kerül a diszulfidhídtól. A triglicin-rész koordinációja térbelileg lehetővé teszi a kéndonoratom koordinációját az $(\text{NH}_2, \text{N}^-)$ koordinációjú komplexben (7.e ábra). A komplexben kialakul a $\text{S} \rightarrow \text{Cu(II)}$ kölcsönhatás, amit mind az UV-látható-, mind az ESR spektroszkópia alátámasztott. Ez a koordináció elősegíti az első amidnitrogén deprotonálódását, de nem akadályozza meg az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-)$ és az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-)$ koordinációjú komplexek kialakulását.

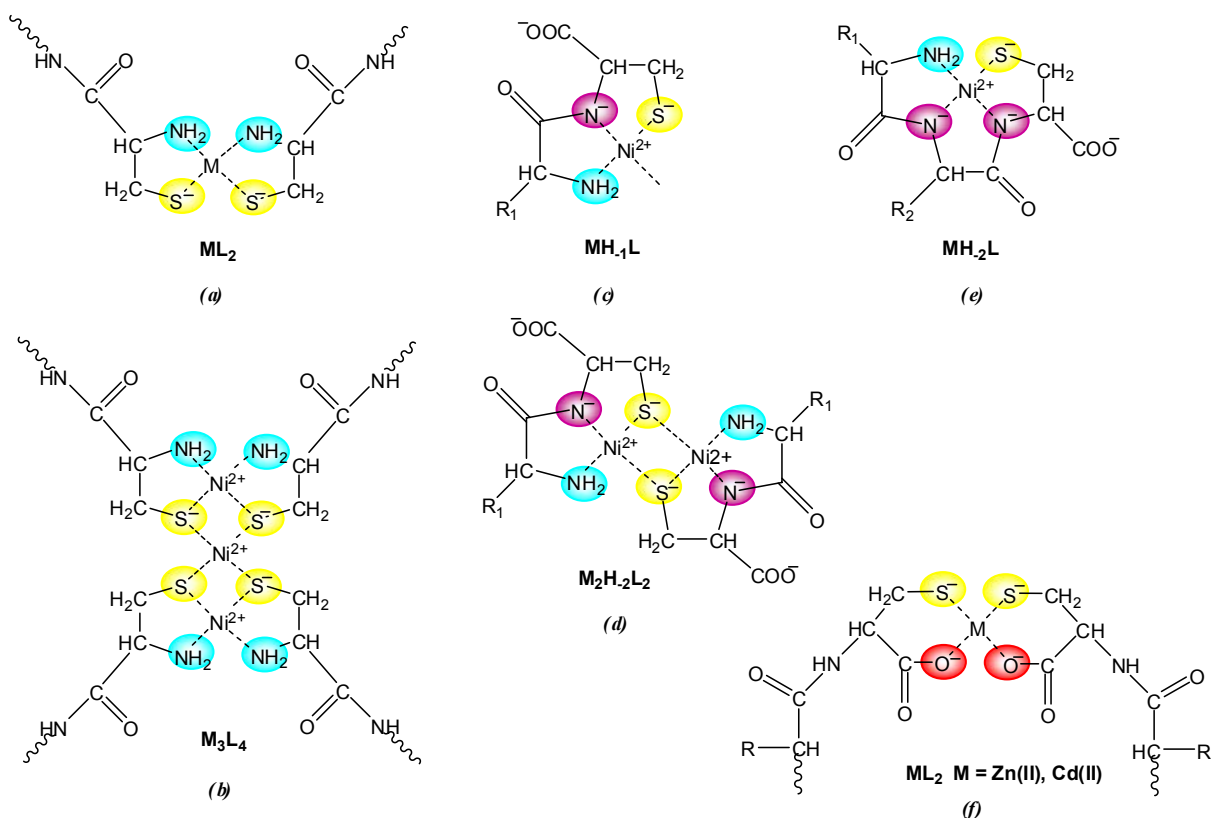
3.2.4. A tiolátcsoport hatása a peptidek komplexképzési folyamataira

A metalloproteinekben a tiolátcsoport az egyik leggyakoribb fémkötőhely, ilyen metalloproteinek többek között a metallotionein, a cink-ujjak, a kék-réz és vas-kén proteinek. Ezen proteinek egyúttal jelentős fémionszelektivitást is mutatnak. A tipikusan soft (lágy) fémionok, mint a Pd(II) , Pt(II) , Cd(II) , Hg(II) , esetén erős kovalens jellegű kötés jön létre. Az átmeneti (borderline) fémionok, mint a Cu(II) , Ni(II) , Zn(II) , Fe(II) , szintén stabilisan kötődnek a tiolátcsoportozhoz, ez különösen akkor jelentős, ha egyúttal N-donoratomhoz való koordinációra is van a lehetőség.

A tiolát-fémion kölcsönhatás különböző aspektusokból való bemutatása már számos közleményben megtörtént,^{4-6,34,37} és a kistagszámú modellpeptidek széleskörű vizsgálata alapján általános tendenciák fogalmazhatók meg a kistagszámú, cisztein-tartalmú peptidek és a fémionok között kialakuló komplexek szerkezetére vonatkozóan is.^{K13-K15,38-40} Cu(II) jelenlétében azonban a komplexképződési folyamatokkal párhuzamosan redoxi folyamatok is

lejátszódnak, amely során Cu(I) és diszulfidszármazékok keletkeznek, így a legfontosabb koordinációs módokat a Ni(II), Zn(II) és Cd(II) esetén mutatom be.

N-terminális ciszteint tartalmazó di- és tripeptidek^{K13-K15,40} esetén a kelátképző helyzetben levő amino- és tiolátcsoport egyidejű koordinációjával öttagú kelát alakul ki, amely mindhárom fémion jelenlétében stabilis ML és ML₂ (8.a ábra) összetételű komplexekhez vezet, megakadályozva ezzel a következő amidnitrogének deprotonálódását. A tiolátkén-atom ugyanakkor hídként is kötődhet a fémionokhoz, így nagyobb fémion-ligandum arány esetén többmagvú komplexek jelenlétét mutatták ki (8.b ábra).



8. ábra Ciszteint tartalmazó di- és tripeptidek lehetséges koordinációs módjai

Ha a peptidben a második vagy harmadik helyen található cisztein, akkor a kialakuló koordinációs mód jelentősen függ a kötődő fémion minőségétől. XaaCys dipeptidek esetén Ni(II)-ion jelenlétében a tiolátcsoport kötődése elősegíti a megelőző peptidnitrogén deprotonálódását és koordinálódását. Az (NH₂,N⁻,S⁻) donorcsoportok kötődésével képződő NiH₁L komplex az egyszerű dipeptidektől eltérően nem oktaéderes, hanem síknégyszetes geometriával jellemezhető, amelyet az UV-látható- és CD spektroszkópiás adatok is egyértelműen alátámasztanak. A tiolátkén híd kialakítására való hajlama ugyanakkor itt is

megmutatkozik, kétmagvú $\text{Ni}_2\text{H}_2\text{L}_2$ komplex is képződik (8.c ábra), amelynek aránya a koncentráció növekedésével növekszik.

A harmadik helyen ciszteint tartalmazó tripeptidek nikkell(II)-komplexei közül kiugró stabilitású az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S}^-)$ koordinációjú NiH_2L komplex (8.e ábra), a tiolátcsoport kötődése a megelőző két amidnitrogén kooperatív deprotonálódását és koordinálódását eredményezi, és a fémion koordinációs szférájának telítődése többmagvú komplexek kialakulását sem teszi lehetővé.

Cink(II)- és kadmium(II)ionok esetén a tiolátkén nem képes horgonycsoportként elősegíteni az amidnitrogén deprotonálódását, de az egyszerű peptidektől eltérően a C-terminális ciszteint tartalmazó di- és tripeptidek a C-terminális részen kötik a fémiont és az $(\text{S}^-, \text{COO}^-)$ koordináció létrejöttével hattagú kelátgyűrű alakul ki, ami stabilis bisz-komplexek képződéséhez vezet (8.f ábra).^{D2}

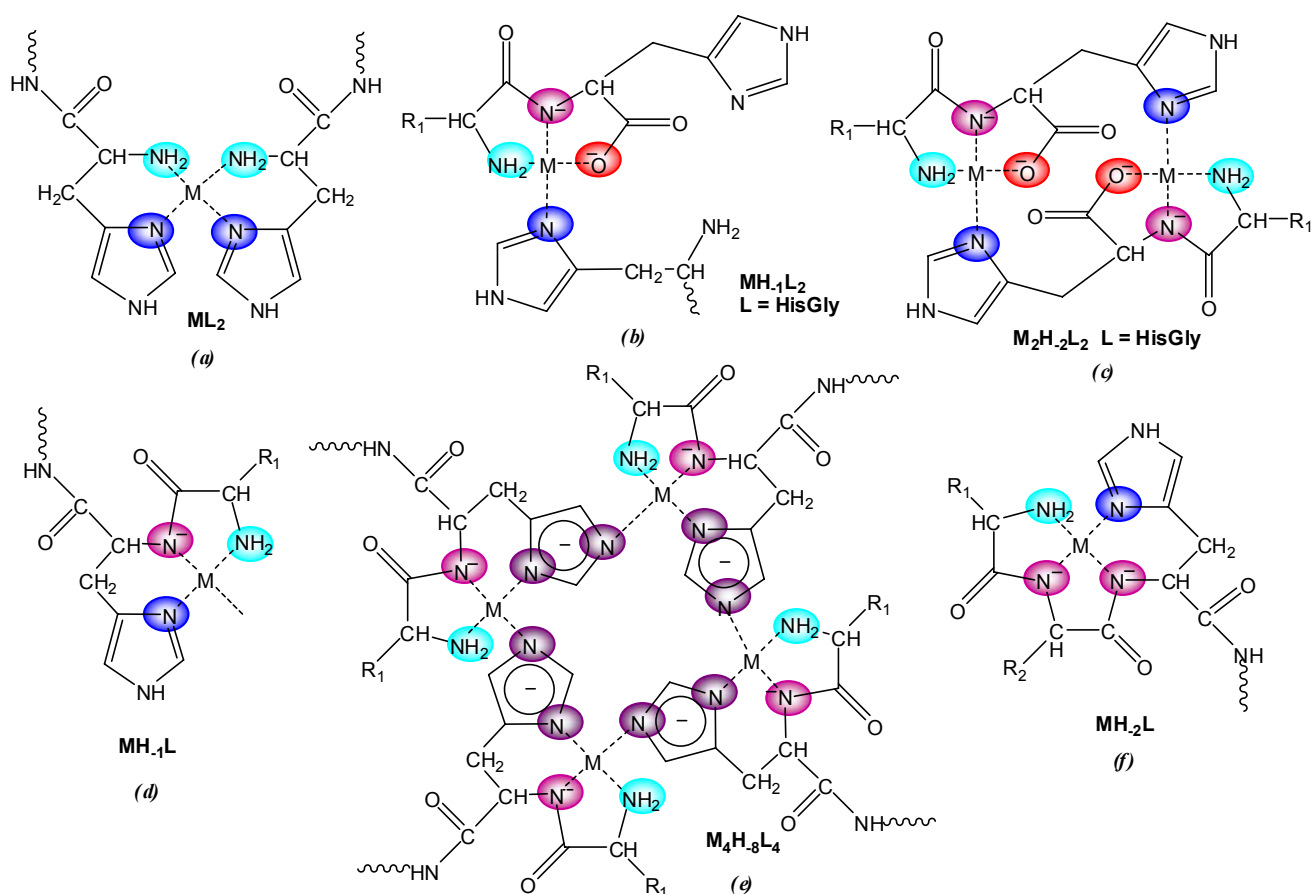
3.2.5. Az imidazolgyűrű hatása a peptidek komplexképzési folyamataira

A biológiai rendszerekben a fehérjék hisztidin imidazol oldalláncai a leggyakoribb kötődési helyek a réz-, cink- és nikkellionok számára. Így a hisztidint tartalmazó peptidek komplexképző sajátosságainak tanulmányozása több évtized óta a koordinációs kémia egyik legintenzívebben kutatott területe, az eredményekből sok száz közlemény és számos összefoglaló munka született.^{4-6,41-43} A terminális aminocsoportot és hisztidint tartalmazó kistagszámú peptideket tekintve az alábbi fő következtetések vonhatók le a kialakuló koordinációs módokra vonatkozóan:

N-terminális hisztidint tartalmazó peptidekben az aminocsoport és a hisztidin imidazol N(3) donoratomja kötődésével hattagú kelátgyűrű kialakulására van lehetőség, és a létrejövő ún. hisztaminszerű koordináció stabilis ML és ML_2 (9.a ábra) összetételű komplexek képződéséhez vezet a réz(II)-, nikkell(II)- és cink(II)ionok esetén egyaránt. Ez a koordináció a peptidnitrogén deprotonálódását gátolja, de a réz(II) és nikkell(II) jelenlétében az egyszerű peptidekhez képest nagyobb pH-n lejátsszódik a folyamat MH_2L komplex képződése közben. Cink(II) jelenlétében más peptidekhez hasonlóan nem figyelhető meg ez a deprotonálódási folyamat, de a képződött komplex szélesebb pH tartományban oldatban tartja a fémiont, mint az egyszerű peptidek.

Ugyanakkor a hisztidin imidazolcsoportja egyfogú módon is képes kötődni a CuH_2L komplexhez telítve a fémion koordinációs szféráját, ami a HisXaa... szekvenciájú peptidet feleslegben tartalmazó oldatokban CuH_2L_2 komplexek (9.b ábra) kialakulásához vezet, míg

ekvimoláris oldatban kétmagvú, imidazolhidas $\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2$ szerkezetek (9.c ábra) keletkezését mutatták ki.⁴⁴⁻⁴⁶



9. ábra Hisztidint tartalmazó peptidek lehetséges koordinációs módjai

A második helyen hisztidint tartalmazó peptidek amino-N, amid-N és imidazol-N(3) donoratomok révén csatolt kelátgyűrűk kialakítására képesek. Ennek a koordinációnak a kedvezményezettsége miatt nemcsak a réz(II)- és nikkel(II)ion, hanem a cink(II)ion is képes indukálni az amidnitrogén deprotonálódását és koordinálódását. Az így kialakuló MH_1L összetételű, ún. „GlyHis”-szerű koordinációjú komplexek uralkodóak a fiziológiás pH-tartományban (9.d ábra). Ez azt is jelenti, hogy a következő amidnitrogén deprotonálódási folyamatok gátoltak, további amidnitrogén koordinálódását nem mutatták ki. Ugyanakkor nagy pH-n réz(II) jelenlétében újabb lúgfogyasztó folyamatot figyeltek meg, amely $(\text{CuH}_2\text{L})_n$ összetételű komplexek képződésével értelmezhető. A spektroszkópiás (UV-látható, CD és ESR) vizsgálatok egyértelműen alátámasztották, hogy az $n \text{ CuH}_1\text{L} \rightleftharpoons (\text{CuH}_2\text{L})_n + n \text{ H}^+$ folyamatban a koordinálódott imidazol N(1)H, ún. „pirrol-típusú” nitrogénje deprotonálódik és koordinálódik egy tetramer $\text{Cu}_4\text{H}_8\text{L}_4$ összetételű négymagvú szerkezet kialakulását eredményezve (9.e ábra).⁴⁵⁻⁴⁸ Ez a komplex azért jelentős, mert a réz(II)ionokat összekötő

imidazoláto-híd hasonló koordinációs környezetet eredményez a CuZnSOD enzim aktív centrumának fémkötő helyéhez, ahol a réz- és cinkionokat egy hisztidin oldalláncbeli imidazoláto-hídja köti össze. Az XaaHis.. szekvenciát tartalmazó di- és tripeptidekben az imidazol N(1)H csoportjának deprotonálódása és koordinálódása a mérhető pH tartományban lejátszódik, így ezek a CuZnSOD enzim egyik legegyszerűbb szerkezeti modelljeinek tekinthetők.

A harmadik helyen hisztidint tartalmazó peptidek fémionkötő képessége kiugró. Ezek az XaaYaaHis, illetve XaaYaaHisZaa... szekvenciájú peptidek „albumin modellek”. Az albumin a vérplazmában a legnagyobb mennyiségben előforduló protein, egyik legfontosabb feladata a kismolekulák és ionok, így a szervezetben előforduló réz(II)- és nikkel(II)ionok szállítása is. Emellett a nikkel(II)ion koordinálódása ugyanezen szekvenciához aktiválja a nikkel allergiáért felelős antigént is. Ennek a szekvenciának számos más élettani vonatkozása is van (HP2₁₋₁₅ – humán protamin amino terminális része,⁴⁹ SPARC – Secreted Protein, Acidic and Rich in Cystein peptidfragmense⁵⁰), így ezeknek a modellezésére igen nagyszámú vizsgálat történt. A réz(II) és nikkel(II)ionok esetén nagystabilitású MH₂L komplex képződését írták le, amelyben a terminális amino- és imidazol-N donortom ugyanahhoz a fémionhoz tud kötődni a koordinatív telített komplexben. Az (NH₂,N⁻,N⁻,Im(N)) csoportokon keresztűli, ún. „GlyGlyHis-szerű” koordináció alakul ki a réz(II)-, nikkel(II)- és palládium(II)-komplexeiben is. Az amidnitrogén deprotonálódása kooperatív módon megy végbe, így egyidejűleg egy (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer alakul ki (9.f ábra), és ez eredményezi a kiugróan nagy stabilitást.^{46,51-57} A cink(II)ionok jelenlétében ebben az esetben is más peptidekhez hasonló komplexek képződnek, az amidnitrogén deprotonálódási folyamatait nem figyelték meg.

Ha a peptidek több hisztidint is tartalmaznak, alapvetően az első, második, illetve harmadik helyen hisztidint tartalmazó peptideknél kimutatott koordinációs módok jelennek meg. Így például a legegyszerűbb két hisztidint tartalmazó peptid a HisHis, amelynél az (NH₂,Im(N)) koordinációjú ML, míg a pH emelésével az XaaHis.. szekvenciánál megfigyelt (NH₂,N⁻,Im(N)) koordináció alakul ki. Ugyanakkor a molekulában jelen levő másik imidazolgyűrű hídként képes kapcsolódni egy másik GlyHis-koordinációjú egységhez és kétmagvú M₂H₂L₂ komplex képződik a fiziológiás pH tartományban.^{58,59} Hasonló megfigyeléseket tettek a több hisztidint különböző helyzetben tartalmazó peptidek esetén, a hisztidin helyzetétől függően hisztamin, GlyHis-szerű, illetve GlyGlyHis-szerű koordinációs módok jönnek létre, de a szabadon maradó imidazolgyűrű kötődését is számos esetben

kimutatták. Így például a GlyHisGlyHis⁶⁰ esetén a képződő CuH₁L komplexben az (NH₂,N⁻,Im(N)) ekvatoriális koordinációja mellett a másik imidazolgyűrű axiális kötődését írták le, míg a CuH₂L komplexben (NH₂,N⁻,N⁻)_{ekv} és (Im(N),Im(N))_{ax} donorcsoportok vannak jelen a fémion koordinációs szférájában. Hasonlóan a szabadon maradt imidazol kötődését tapasztalták a HisValHis komplexeiben,⁶¹ a hisztaminszerű koordinációt tartalmazó ML komplexben a láncvégi imidazolgyűrű makrokelátot képezve kötődik, míg a GlyGlyHis-szerű koordinációt tartalmazó MH₂L komplexben az imidazol nitrogén donoratoma axiálisan kapcsolódik. Ezek a kölcsönhatások a szabályos geometria torzulását és így a jellemző spektroszkópiás paraméterek módosulását eredményezik.

A hisztidinek számának növelése a peptidben további igen változatos összetételű és szerkezetű komplexek képződéséhez vezet.⁶²⁻⁶⁴ Ezek részletezése nélkül általánosan az a következtetés fogalmazható meg, hogy ha a hisztidint tartalmazó peptidekben szabad N-terminális aminocsoport van jelen, akkor ez jelenti az elsődleges horgonycsoportot a fémion indukálta peptidnitrogén deprotonálódáshoz, a jelenlevő oldalláncbeli imidazolgyűrűk a helyzetüktől függően gátolhatják (N-terminális hisztidin), illetve elősegíthetik (második és harmadik helyen levő hisztidin) az amidnitrogén deprotonálódását, és a fémion alapvetően a peptidvázhoz koordinálódik. Az oldalláncbeli imidazolgyűrű ezekben a peptidekben általában nem jelent elsődleges horgonycsoportot, a terminális kötőhelytől távolabb levő hisztidin azonban egy második fémion megkötését is lehetővé teszi, horgonycsoportként elősegítve a megelőző amidnitrogének deprotonálódását.

A prion proteinek és a β -amiloid peptidek, illetve fragmenseik fémkomplexeinek tanulmányozása az imidazolgyűrű horgonycsoportként való viselkedésről átfogó képet ad. Ezek között részletesen vizsgálták azokat a peptideket, amelyek szekvenciájukban egymástól távol tartalmazzák a hisztidin aminosavakat.⁶⁵⁻⁶⁸ A védett peptidek gyengén savas tartományban kizárólag az imidazol-N donoratomon való kötődéssel hoznak létre 2N-4N koordinációjú komplexeket. Ezek a szerkezetek nem akadályozzák meg a peptidnitrogének deprotonálódását a pH 6-7 tartományban, és az imidazol, mint horgonycsoport vesz részt ezekben a folyamatokban. Az egymástól távol elhelyezkedő hisztidinek egy-egy kötőhelyet jelentenek a fémionok számára, így a ligandum általában annyi fémiont képes koordinálni (N⁻,N⁻,Im(N)), illetve a lúgosabb tartományban (N⁻,N⁻,N⁻,Im(N)) koordinációval, ahány hisztidin található a molekulában.

Így az imidazolgyűrűről, mint elsődleges fémionkötőhelyről és horgonycsoportról további információkat olyan peptid- és peptidszármazékok vizsgálatával nyerhetünk, amelyek

terminális aminocsoportja védett vagy más egyéb funkcionális csoport formájában tartalmazzák az imidazolgyűrűt.

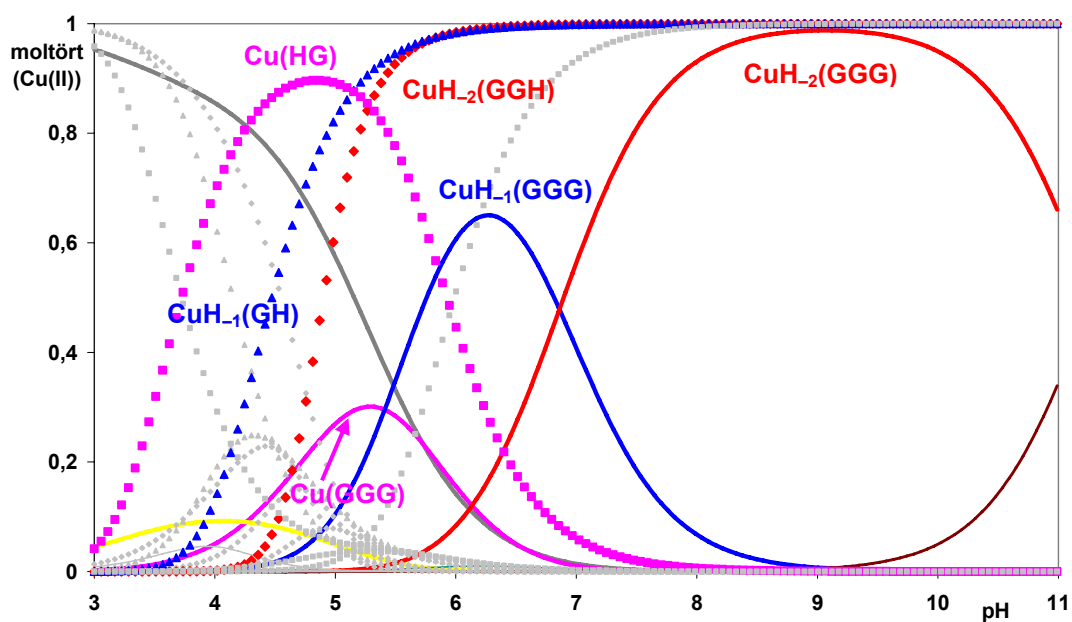
3.2.6. Az oldalláncbéli donorcsoportok hatásának általános tendenciái a peptidek komplexképzési folyamataiban

A fenti eredmények alapján összefoglalóan az alábbi általános következtetéseket fogalmazhatjuk meg:

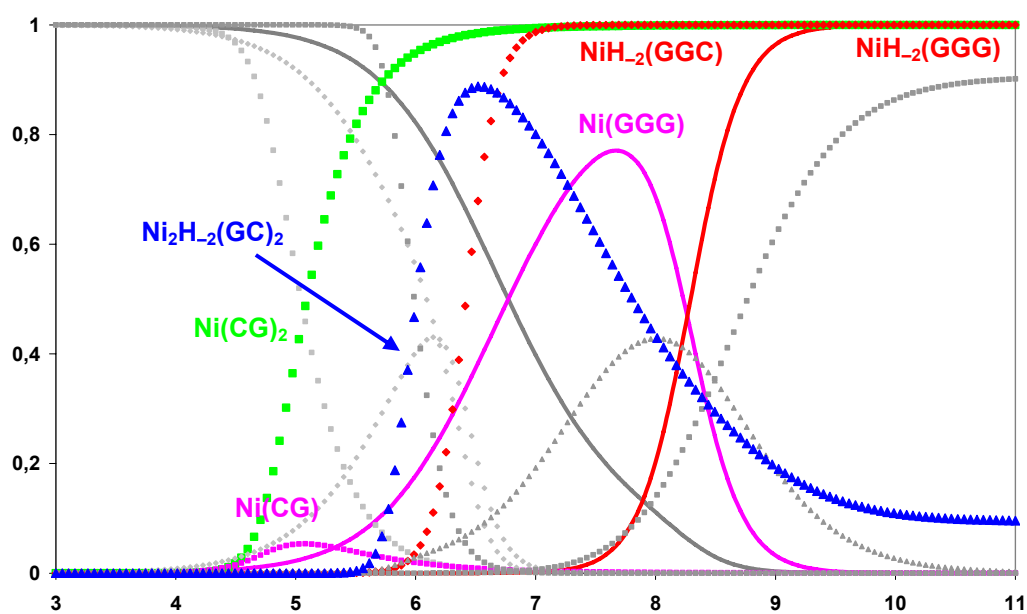
- A terminális aminocsoport jelenlétében általában peptidszerű koordináció alakul ki (2.a-d ábra), a réz(II)- és nikkel(II)ionok esetén a terminális aminocsoport horgonycsoportként elősegíti a peptidnitrogén(ek) deprotonálódását és koordinálódását.
- Ha a peptidben az első helyen olyan aminosav van, amiben a koordinálódásra képes donorcsoport az aminocsoporttal kelátképző helyzetben van, a keletkező ML (és ML₂) komplexek stabilitása nő. Ez a réz(II)ion esetén gátolja a következő amidnitrogén deprotonálódását, a nikkel(II)ion esetén a legerősebben koordinálódó donorcsoportok (tiolát, imidazol) pedig meg is akadályozzák ezt a folyamatot.
- Ha a második helyen található a koordinálódó donorcsoportot tartalmazó aminosav, akkor ez elősegíti az első amidnitrogén deprotonálódását és a keletkező MH₁L komplex stabilitását növeli. Az egyszerű, kistagszámú peptidek esetén ez az egyetlen olyan szekvencia, amelynél ha az oldalláncban imidazolgyűrű van, cink(II) jelenlétében is lejátszódik ez a folyamat.
- A legnagyobb mértékű hatása a harmadik helyen oldalláncban koordinálódó donorcsoportot tartalmazó aminosavnak van, a kialakuló (NH₂,N⁻,N⁻,X) (X = COO⁻(Asp), S(Met), S⁻(Cys), Im(N)(His)) koordinációval telítődik a fémionok koordinációs szférája, és kiugróan nagy stabilitású MH₂L összetételű komplexek keletkeznek, amik uralkodóak a fiziológiás pH tartományban.
- Az első, második és harmadik helyen koordinálódó donorcsoportot tartalmazó aminosavak eltérő hatását szemlélteti a 10. ábra. Réz(II) esetén a GlyGlyGly-t, illetve hisztidint különböző pozícióban tartalmazó di-, illetve tripeptidek (HisGly, GlyHis, GlyGlyHis) ekvimoláris oldatában keletkező részecskék eloszlását egy ábra mutatja be. Az ábrán csak azoknak a részecskéknek megfelelő görbét emeltem ki, ami az egyes rendszerekben megnövekedett stabilitású részecske: a HisGly esetén az CuL (■), a GlyHis esetén a CuH₁L (▲), a GlyGlyHis esetén a CuH₂L (◆) komplex. Az eloszlások is jól tükrözik, hogy a Cu(II)-GlyGlyGly rendszerhez képest a HisXaa szekvencia esetén az ML

komplex, XaaHis szekvencia esetén az $MH_{-1}L$, míg XaaYaaHis szekvencia esetén az $MH_{-2}L$ komplex jóval nagyobb mennyiségben és jóval szélesebb pH tartományban van jelen a GlyGlyGly megfelelő részecskéihez képest.

- A nikkel(II) esetén hasonló ábrán a ciszteint első, második, illetve harmadik pozícióban (CysGly, GlyCys, GlyGlyCys) tartalmazó peptidek és összehasonlításként a GlyGlyGly rendszerekben 1:2 fémion-ligandum aránynál keletkező komplexek láthatók. Erről az ábráról is jól látszik, hogy a CysXaa szekvenciánál megjelenő NiL_2 (■) komplex az összehasonlításként használt GlyGlyGly esetén meg sem jelenik (GlyGly jelenlétében is jóval kisebb mennyiségben és csak pH 7 felett keletkezik). Az XaaCys szekvenciánál az (NH_2, N^-, S^-) koordinációjú $Ni_2H_{-2}L_2$ (▲) komplex jelenik meg nagy mennyiségben, míg a GlyGlyGly rendszerben $NiH_{-1}L$ komplex nem is keletkezik; valamint jól tükröződik a $NiH_{-2}L$ (◆) komplex uralkodó jellege az XaaYaaCys szekvencia esetén.
- Ha a molekulában több, oldalláncban koordinálódó donorcsoportot tartalmazó aminosav van jelen, akkor a keletkező komplexek összetétele és koordinációs módja alapvetően megegyezik (pH-tól függően) az adott aminosavat első, második, illetve harmadik helyen tartalmazó ligandum esetén képződő komplexekével, de a szabadon maradó oldalláncbéli donoratom(ok) kötődése is általában kimutatható axiális pozícióban vagy hídként többmagvú komplexek képződését eredményezve.



(a)



(b)

10. ábra A Cu(II)-GlyGlyGly^{K2} (folytonos vonal), Cu(II)-HisGly⁴⁵ (■), Cu(II)-GlyHis⁴⁷ (▲), Cu(II)-GlyGlyHis^{69,70} (◆) rendszerben képződő komplexek a pH függvényében

($c(\text{Cu(II)}) = 4,00 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{L}) = 4,00 \text{ mmol/dm}^3$) (a)

A Ni(II)-GlyGlyGly²⁰ (folytonos vonal), Ni(II)-CysGly⁴⁰ (■), Ni(II)-GlyCys⁴⁰ (▲), Ni(II)-GlyGlyCys⁴⁰ (◆) rendszerben képződő komplexek a pH függvényében

($c(\text{Ni(II)}) = 2,00 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{L}) = 4,00 \text{ mmol/dm}^3$) (b)

(az azonos összetételű komplexeket azonos szín jelzi)

- Az oldalláncbéli donorcsoportok hatása a donoratomtól és a fémiontól függően eltérő. A réz(II)- és nikkel(II)-komplexek esetén kialakuló trendet szemlélteti a 11. ábra, ami az ML, ML₂, MH₁L és MH₂L komplexekre vonatkozó képezett állandók logaritmusát mutatja be a különböző szekvenciájú aminosavak esetén.

- Az első helyen oldalláncbéli donorcsoportot tartalmazó peptidek ML és ML₂ komplexére vonatkozóan a ligandumok protonálódási állandójával korrigált érték ((1), (2) egyenlet) ad lehetőséget az összehasonlításra (11.a ábra). Az érték növekedése a képződő komplex nagyobb stabilitására utal.

$$\lg K(\text{ML}) = \lg \beta(\text{ML}) - pK_3 \quad (1)$$

$$\lg K(\text{ML}_2) = \lg \beta(\text{ML}_2) - 2 \cdot pK_3 \quad (2)$$

- A második helyen oldalláncbéli donorcsoportot tartalmazó komplexek esetén az aminocsoportot követő peptidnitrogén deprotonálódására jellemző $pK_{1\text{amid}}$ érték ((3), (4) egyenlet) ad információt (11.b ábra), amelynek értéke minél kisebb, annál kedvezőbb az (NH₂, N⁻, X) koordinációjú komplexek képződése.

$$pK_{1\text{amid}} = \lg \beta(\text{ML}) - \lg \beta(\text{MH}_1\text{L}) \quad (3)$$

$$pK_{1,2\text{amid}} = \frac{1}{2}(\lg \beta(\text{ML}) - \lg \beta(\text{MH}_2\text{L})) \quad (4)$$

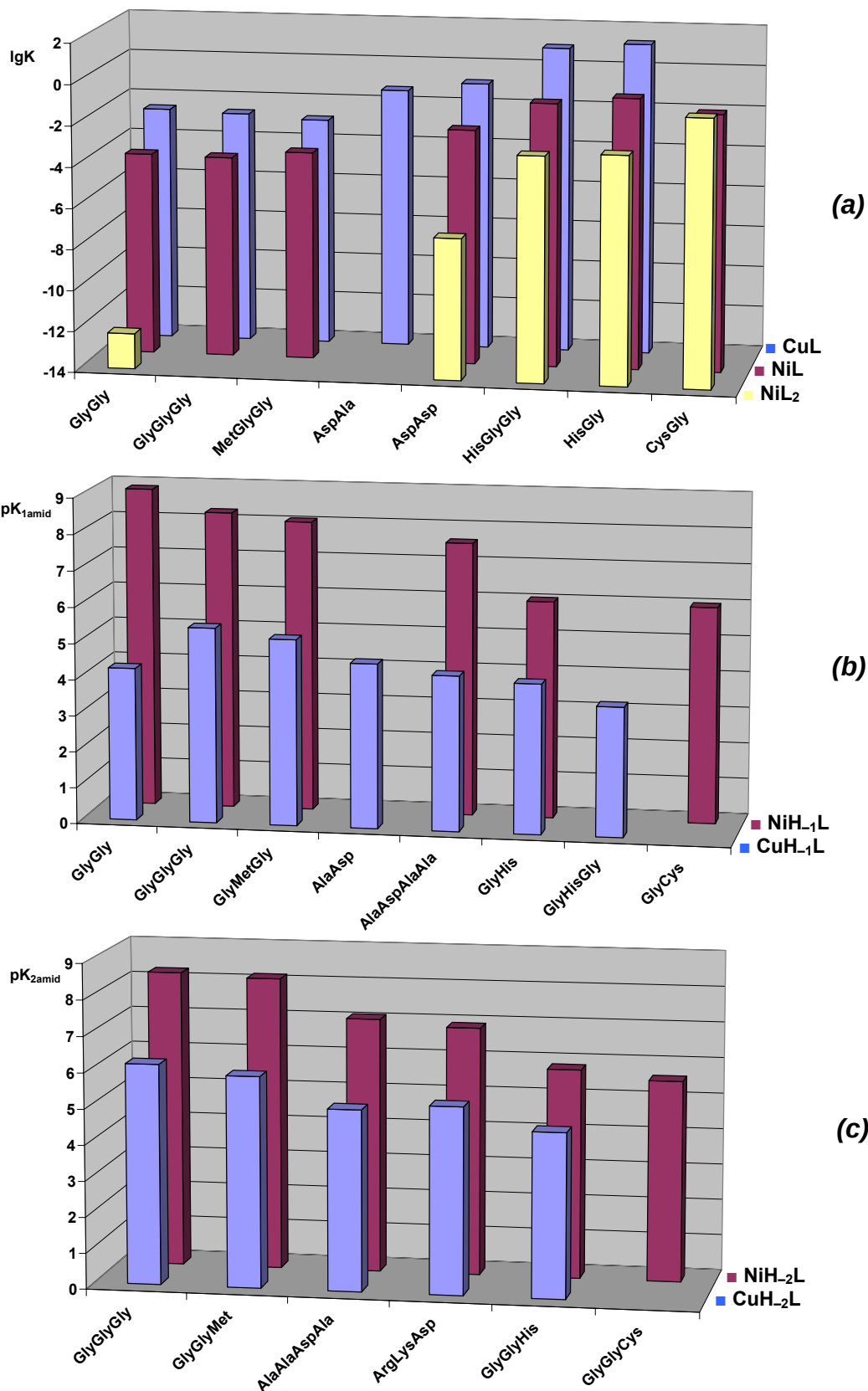
A Ni(II)-GlyCys rendszerben képződő Ni₂H₂L₂ komplexre az eloszlás alapján becsülhető az érték.

- A harmadik helyen oldalláncbéli donorcsoportot tartalmazó komplexeknél a második peptidnitrogén deprotonálódására jellemző $pK_{2\text{amid}}$ értékekből ((5) egyenlet) vonhatunk le következtetéseket (11.c ábra), amely esetben az érték csökkenése az (NH₂, N⁻, N⁻, X) koordinációjú komplexek képződésének növekvő kedvezményezettségére utal. Kooperatív deprotonálódás esetén a $pK_{1,2\text{amid}}$ érték vonatkozik mindkét amidnitrogén deprotonálódására.

$$pK_{2\text{amid}} = \lg \beta(\text{MH}_1\text{L}) - \lg \beta(\text{MH}_2\text{L}) \quad (5)$$

~A három diagram is jól szemlélteti, hogy a réz(II), nikkel(II) ML, ML₂, MH₁L, MH₂L komplexeiben az oldallánc hatása az alábbi sorrendben növekszik:





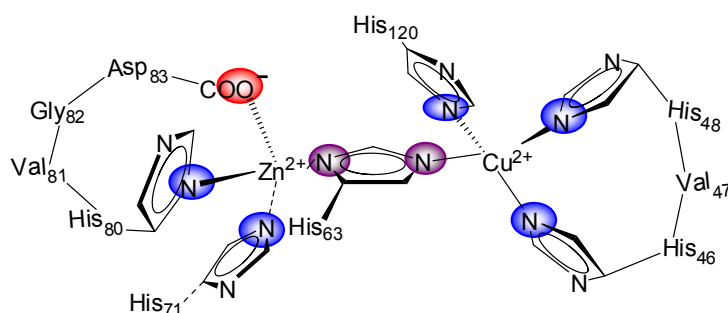
11. ábra A különböző helyzetben különböző oldalláncbéli donorcsoportot tartalmazó peptidek komplexeire vonatkozó képezett állandók logaritmusai^{K2-K4,K7,20,40,45,47,69,70}

3.3. A szuperoxid-diszmutáz enzimek és azok modellezése

Az életműködéshez szükséges energiát minden aerob szervezet a táplálékként felvett szerves molekulák „elégetésével” nyeri. Az oxigén jelenlétében történő lebontási folyamat során azonban melléktermékként úgynevezett szabad gyökök, azaz igen reakcióképes, rövid élettartamú vegyületek keletkeznek, amelyek erősen oxidáló hatásúak. Ezek károsíthatják a sejtek alkotóit, a membránt, a fehérjéket, a DNS-t, aminek következménye az öregedés,⁷¹ de hozzájárulhat betegségek kialakulásához is.^{72,73} A sejtekben vannak azonban olyan enzimek (szuperoxid-diszmutáz, kataláz, peroxidáz enzimek), amelyek ezeket a szabad gyököket elbontják.

Többféle szuperoxid-diszmutáz enzim ismert, ezek közül négy típusnak a részletes vizsgálata és szerkezeti jellemzése történt meg. A Mn-tartalmú enzimet (MnSOD) eukarióta és prokarióta sejtekbeben mutatták ki, míg a Fe-tartalmú enzimet (FeSOD) prokarióta, néhány primitív eukarióta élőlényből, illetve zöld növényekből izolálták. E két enzim szerkezete hasonlóságot mutat annyiban, hogy mindkét fémion körül trigonális bipiramisos elrendeződés alakul ki, az ekvatoriális síkban két hisztidinnitrogén és egy aszpartilrész koordinálódik, a harmadik hisztidin és egy oldószermolekula axiálisan kötődik.⁷⁴⁻⁷⁶ Ez a molekula hidrogénkötéssel egy glutamilrészhez kapcsolódik, az pedig egy tirozinázhoz kötődik. A szuperoxid-diszmutázok harmadik típusának aktív centrumában nikkkel található. Ezt az enzimet a *Streptomyces* törzsben^{77,78} és cianobaktériumokban⁷⁹ mutatták ki.

A CuZnSOD a legismertebb és legszélesebb körben tanulmányozott, valamennyi eukarióta sejtben előforduló diszmutáz enzim. A röntgendiffrakciós vizsgálata azt mutatta, hogy két azonos alegységből épül fel, és mindkettő egy imidazolato-hidas kétmagvú centrumot tartalmaz egy-egy cink(II)- és réz(II)ionnal, melyek 6,2 Å távolságra vannak egymástól. A Cu(II)-ion három hisztidinnitrogénhez és egy vízmolekulához koordinálódik, torzult tetragonális piramisos elrendeződés alakul ki. A Zn(II)-ion körül torzult tetraéderes geometria valósul meg, a fémion két hisztidinnitrogénhez és egy aszparaginsav karboxilátsoportjához kötődik, míg a negyedik pozícióban a Zn(II)- és Cu(II)-ionhoz egyaránt kötődő hisztidin imidazolato-N található, ami egyúttal hidként köti össze a két fémiont tartalmazó egységet.⁸⁰⁻⁸³ A 12. ábra a CuZnSOD enzim aktív centrumának sematikus szerkezetét és a 153 tagú enzim azon részének szekvenciáját mutatja be, ami tartalmazza a két fémkötőhelyet



45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
F	H	V	H	E	F	G	D	N	T	A	G	C	T	S	A	G	P	H	F	N	P

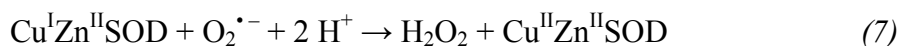
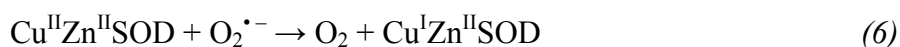
67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
L	S	R	K	H	G	G	P	K	D	E	E	R	H	V	G	D	L	G	N	V	T

89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
A	D	K	D	G	V	A	D	V	S	I	E	D	S	V	I	S	L	S	G	D	H

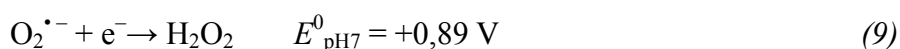
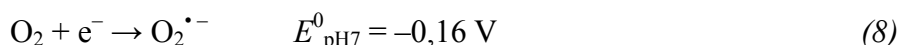
111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
C	I	I	G	R	T	L	V	V	H	E	K	A	D	D	L	G	K	G	G	N	E

12. ábra A humán CuZnSOD enzim sematikus szerkezete és fémkötőhelyének aminosavszekvenciája (■ – réz(II)ionhoz, ■ – cink(II)ionhoz, ■ – mindkét fémionhoz kötődő aminosavak)

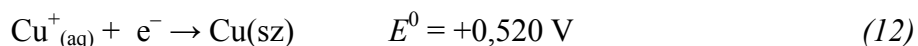
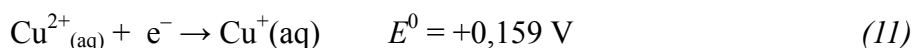
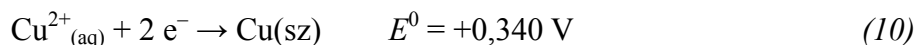
A szuperoxid-diszmutáz enzimek a szervezetben keletkező szuperoxid diszproporcióját katalizálják hidrogénperoxiddá és oxigénné. Ezzel a reakcióval az enzim a nagyon reaktív gyök elbontásával csökkenti az oxidatív stresszt. Korábbi vizsgálatok már egyértelműen bizonyították, hogy a réz(II) ciklikusan redukálódik és oxidálódik; a szuperoxid gyökanion az első lépésben redukálja a réz(II)iont oxigént eredményezve és egy másik szuperoxid gyök oxidálja a Cu(I) centrumot, miközben hidrogén-peroxid keletkezik ((6),(7) egyenlet).^{84,85}



A természetes CuZnSOD enzimre jellemző redoxipotenciál értéke a +0,200 – (+0,400) V tartományban van.^{86,87} Ahhoz, hogy egy komplex az enzimhez hasonlóan képes legyen a szuperoxid gyökanion elbontására, a rá jellemző redoxipotenciál értéknek az alábbi két folyamatot jellemző redoxipotenciál értékek közé kell esnie:^{86,88}



A réz(II)ionok redoxi átalakulásait az alábbi redoxipotenciál értékek jellemzik:⁸⁹



Komplexbépződés hatására ezek az értékek megváltoznak. Általánosságban igaz, hogy a Cu(II)/Cu(I) rendszer redoxipotenciál értékeit jelentősen befolyásolja a rézkomplexek koordinációs módja. A réz(II)-komplexek esetében általában a tetragonálisan megnyúlt pszeudo-oktaédes elrendeződés, míg a réz(I)-komplexek esetében a lineáris, síkháromszöges vagy tetraédes geometria jellemző. Ciklikus voltammetriás mérések során, miközben a réz(II)-centrumot redukáljuk, majd oxidáljuk, egy sztereokémiai átrendeződés valósul meg, ami általában kvázireverzibilis redoxi folyamatokhoz vezet, és a katódos és anódos csúcsok szeparációja nagyobb, mint ami az egyelektronos redoxi folyamatokat általában jellemzi ((28) egyenlet).

A réz(II)-komplexek ciklikus voltammetriás vizsgálata, a redoxi paraméterek meghatározása információt szolgáltat arra vonatkozóan, hogy az adott komplex megfelelően modellezheti a CuZnSOD enzimet, a jellemző redoxipotenciál érték beleesik-e a (8),(9) egyenletekre jellemző potenciáltartományba.

A CuZnSOD enzim modelljeként azok a komplex vegyületek jöhetnek szóba, amelyek szerkezetükben és/vagy működésükben hasonlóságot mutatnak az enzimhez. Ez jelenthet olyan szerkezeteket, amelyekben a réz(II)- és/vagy cink(II)ion koordinációs környezete hasonlít az aktív centruméhoz, és a CuZnSOD-hoz hasonló redoxi sajátságok jellemzik a komplexet. A CuZnSOD enzimet modellező különböző típusú réz(II)-komplexek elektrokémiai és SOD aktivitás vizsgálataira vonatkozó irodalmi előzményeket a saját eredmények bemutatásánál foglalom össze.

4. Alkalmazott vizsgálati módszerek és értékelési eljárások

4.1. Felhasznált vegyszerek, vizsgált ligandumok

A CuCl_2 -, NiCl_2 -, ZnCl_2 -oldatokat a.l.t. minőségű, a Reanal cég által gyártott vegyszerekből készítettük, a pontos fémion-koncentrációkat gravimetriásan oxinát formájában határoztuk meg. A KOH-oldat a Sigma-Aldrich cég által gyártott a.l.t minőségű vegyszerből készült, a sav-, illetve a lúgkoncentrációkat pH-potenciometriásan határoztuk meg.

Az ESR spektroszkópiás vizsgálatokhoz a fémrezet (99,3% ^{63}Cu és 0,7% ^{65}Cu) Oroszországból vásárolták (Moszkva, JV Izoflex), melyet szulfát vegyületté alakítottak. A ^1H NMR vizsgálatokhoz 99,8%-os izotóptisztaságú, az ISOTEC Inc. cég által előállított D_2O -t, DCl - és NaOD -oldatot használtunk. A SOD aktivitás mérésekhez a nitroblue-tetrazólium-klorid sót (NBT), a xantint és a xantin-oxidáz enzimet a Sigma-Aldrich cégtől rendeltük.

A vizsgált ligandumok egy része kereskedelmi forgalomban kapható volt, a többi vegyületet szintézissel állítottuk, állították elő. Ezekre vonatkozó adatokat az 1. táblázat tartalmazza a továbbiakban használt rövidítésekkel együtt.

1. táblázat A vizsgált ligandumok neve, rövidítése, a forgalmazó cég, illetve a szintézisre vonatkozó adat

Ligandum neve	Rövidítés	Forgalmazó cég, szintézis körülményei
N-acetil-hisztamin	Ac-Hm	Sigma-Aldrich
N-acetil-hisztidin	Ac-His	
glicil-glicil-L-hisztidin	GlyGlyHis	
β -(piridin-2-il)-DL-alanin	pyrAla	Bachem
β -(tien-2-il)-DL-alanin	thiAla	
β -(1,2,4-triazol-2-il)-DL-alanin	triazAla	
β -(tiazol-2-il)-DL-alanin	thiazAla	
α -(tien-2-il)-glicin	thiGly	
2-(2-aminoetil)piridin	amet-Pyr	
N-acetil-L-hisztidil-glicil-L-hisztidin	Ac-HisGlyHis, Ac-HGH	
N-acetil-L-hisztidil-glicin-L-hisztidinamid	Ac-HisGlyHis-NHMe, Ac-HGH-NHMe	
N-acetil-L-hisztidil-L-hisztidil-glicil-L-hisztidin	Ac-HisHisGlyHis, Ac-HHGH	
N-acetil-L-hisztidil-L-hisztidil-glicil-L-hisztidinamid	Ac-HisHisGlyHis-NHMe, Ac-HHGH-NHMe	

N-acetil-L-hisztidil-glicil-glicil-hisztidinamid	Ac-HisGlyGlyHis-NH ₂ , Ac-HGGH-NH ₂	Genscript
N-acetil-L-hisztidil-L-valil-L-valil-L-hisztidinamid	Ac-HisValValHis-NH ₂ , Ac-HVVH-NH ₂	
glicil-glicil-glicil-L-hisztidin	Gly ₃ His, GGGH	Szintézis, Ioannina, Görögország
glicil-glicil-glicil-glicil-hisztidin	Gly ₄ His, GGGGH	
glicil-glicil-glicil-glicil-glicil-L-hisztidin	Gly ₅ His, GGGGGH	
N-acetil-L-hisztidil-L-hisztidil-L-valil-glicil-L-aszparaginsavamid	Ac-HisHisValGlyAsp-NH ₂ , Ac-HHVGD-NH ₂	Szintézis, Ioannina, Görögország, Kállay Csilla
N-acetil-L-hisztidil-L-alanil-L-hisztidil-L-valil-L-hisztidinamid	Ac-HisAlaHisValHis-NH ₂ , Ac-HAHVH-NH ₂	
N-acetil-L-hisztidil-L-valil-L-hisztidil-L-alanil-L-hisztidinamid	Ac-HisValHisAlaHis-NH ₂ , Ac-HVHAH-NH ₂	
N-acetil-L-hisztidil-L-alanil-L-hisztidil-L-prolil-L-hisztidinamid	Ac-HisAlaHisProHis-NH ₂ , Ac-HAHPH-NH ₂	
N-acetil-L-hisztidil-L-prolil-L-hisztidil-L-alanil-L-hisztidinamid	Ac-HisProHisAlaHis-NH ₂ , Ac-HPHAH-NH ₂	
N-acetil-L-hisztidil-glicil-L-hisztidil-L-valil-L-hisztidinamid	Ac-HisGlyHisValHis-NH ₂ , Ac-HGHVH-NH ₂	
N-acetil-L-hisztidil-L-valil-L-hisztidil-glicil-L-hisztidinamid	Ac-HisValHisGlyHis-NH ₂ , Ac-HVHGH-NH ₂	
N-acetil-L-hisztidil-szarkozil-L-hisztidinamid	Ac-S1H2-NH ₂	
N-acetil-L-hisztidil-szarkozil-L-hisztidil-szarkozil-L-hisztidinamid	Ac-S2H3-NH ₂	
N-acetil-L-hisztidil-szarkozil-L-hisztidil-szarkozil-L-hisztidil-szarkozil-L-hisztidinamid	Ac-S3H4-NH ₂	
N-glicil-β-(pirid-2-il)-L-alanin	Gly-pyrAla	
N-glicil-β-(tien-2-il)-L-alanin	Gly-thiAla	
N-glicil-glicil-β-(pirid-2-il)-L-alanin	GlyGly-pyrAla	
N-glicil-glicil-β-(tien-2-il)-L-alanin	GlyGly-thiAla	
bisz(imidazol-2-il)-metán	BIM	Szintézis, MTA Peptidkémiai Kutatócsoport, Süli-Vargha Helga és mtsai
bisz(imidazol-2-il)-metilamin	BIMA	
3-bisz(imidazol-2-il)-propionsav	BIP	
N-glicil-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	Gly-BIMA	
N-fenilalanil-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	Phe-BIMA	
N-β-alanil-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	β-Ala-BIMA	
N-α-aszpartil-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	α-Asp-BIMA	
N-α-glutamil-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	α-Glu-BIMA	
N-γ-glutamil-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	γ-Glu-BIMA	
N-hisztidil-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	His-BIMA	
N-alanil-prolil-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	AlaPro-BIMA	

N-leucil-glicil-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	LeuGly-BIMA	Szintézis, MTA Peptidkémiai Kutatócsoport, Süli-Vargha Helga és mtsai
N-glicil-leucil-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	GlyLeu-BIMA	
N-fenilalanil-glicil-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	PheGly-BIMA	
N-fenilalanil-hisztidil-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	PheHis-BIMA	
N-hisztidil-fenilalanil-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	HisPhe-BIMA	
N-(acetyl-prolil-leucil-glicil)- bisz(imidazol-2-il)-metilamin	Ac-ProLeuGly-BIMA	
N-(Boc-prolil-leucil-hisztidil)- bisz(imidazol-2-il)-metilamin	Boc-ProLeuHis-BIMA	
N-(Boc-prolil-hisztidil-glicil)-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	Boc-ProHisGly-BIMA	
N-(Boc-hisztidil-leucil-glicil)- bisz(imidazol-2-il)-metilamin	Boc-HisLeuGly-BIMA	
N-(bisz(imidazol-2-il-propionil)-izoleucil-alanil-glicil-etilészter	BIP-IleAlaGly-OEt	
N-(bisz(imidazol-2-il-propionil)-hisztidil-alanil-glicil-etilészter	BIP-HisAlaGly-OEt	
N-(bisz(imidazol-2-il-propionil)-izoleucil-hisztidil-glicil-etilészter	BIP-IleHisGly-OEt	
N-(bisz(imidazol-2-il-propionil)-izoleucil-alanil-hisztidil-etilészter	BIP-IleAlaHis-OMe	
N-(alanil-fenilalanil-glicil)- bisz(imidazol-2-il)-metilamin	AlaPheGly-BIMA	
N-(glicil-izoleucil-glicil)-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	GlyIleGly-BIMA	
N-(glicil-glicil-hisztidil)-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	GlyGlyHis-BIMA	
Bisz(piridin-2-il)-metán	BPM	Szintézis, Heidelberg, Peter Comba és mtsai
N-glicil-bisz(piridin-2-il)-metilamin	Gly-BPMA	
N-hisztidil-bisz(piridin-2-il)-metilamin	His-BPMA	
N-prolil-bisz(piridin-2-il)-metilamin	Pro-BPMA	
bisz(piridin-2-il)-metilamin	BPMA	Szintézis, Debrecen, Buglyó Péter
N-(Z-glicil)-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	Z-Gly-BIMA	
N-(Z-alanil)-bisz(imidazol-2-il)-metilamin	Z-Ala-BIMA	

4.2. Szintézis^{90,D5,D17,D20,D22,D24}

A vizsgált ligandumok nagy részét magyar és nemzetközi együttműködés keretében az együttműködő fél kutatócsoportjában szintetizálták, ugyanakkor a szintézisbe nagyon gyakran a kutatócsoportunk tagjai is bekapcsolódtak.

A peptidek előállítására Ioannina-ban, Prof. Nick Hadjiliadis kutatócsoportjában került sor. A vegyületek előállítása szilárdfázisú peptidszintézissel történt.⁹¹ Emellett lehetőségünk volt arra is, hogy külföldi tanulmányút keretében az olaszországi Catania-i Egyetemen működő, *Prof. Enrico Rizzarelli* és *Prof. Giuseppe Pappalardo* vezette kutatócsoportban az automata peptidszintetizáló készülék működésével, alkalmazásával is megismerkedjünk. Néhány éve pedig a csoportunk is vásárolt egy automata mikrohullámú peptidszintetizáló készüléket, ami további nagy lendületet adott a peptidek tervezésének, előállításának és vizsgálatának.

A bisz(imidazol-2-il)- és bisz(piridin-2-il)-csoportot tartalmazó nagyszámú ligandumot az MTA Peptidkémiai Kutatócsoportjában *Prof. Süli-Vargha Helga* és munkatársai állították elő, oldatfázisú szintézissel.^{92,93}

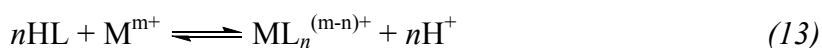
Közel kétéves külföldi tanulmányutam során *Prof. Peter Comba* kutatócsoportjában dolgoztam, és az együttműködés ezt követően is folytatódott, aminek keretében néhány vegyületet ebben a csoportban állítottak elő.⁹⁴

Az előállított ligandumok tisztaságát nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) és VRK segítségével ellenőriztük. A tisztítást HPLC alkalmazásával valósították meg. Ezt követően a vizsgált ligandumok szerkezetét és tisztaságát VRK, NMR-spektroszkópia, HPLC, valamint pH-potenciometria segítségével ellenőriztük.

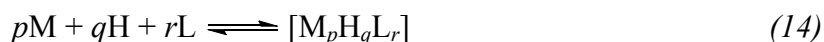
Az egyes ligandumok előállítására vonatkozó pontos receptek, kitermelési adatok, a kapott vegyületeket jellemző elemanalízis, NMR és R_f paraméterek az adott ligandum eredményeit leíró közleményekben^{93,D5,D17,D20,D22,D24} találhatóak meg.

4.3. pH-potenciometria

Az oldatfázisban lejátszódó komplexképződési folyamatok egyensúlyi vizsgálatának egyik legáltalánosabb módszere a pH-potenciometria. Alkalmazhatóságának feltétele, hogy a fémion koordinációja hatással legyen a ligandum protonálódási egyensúlyára, vagyis a komplexképződés az oldat pH-jának megváltozásával járjon. A kompetíciós folyamat az alábbi egyensúllyal jellemezhető:



A bruttó komplexképződési folyamat általános formája (az egyszerűség kedvéért a töltéseket nem tüntettem fel) a (14) egyenlettel,



a képződő komplexek stabilitási szorzata a (15) egyenlettel adható meg:

$$\beta = \frac{[\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r]}{[\text{M}]^p \cdot [\text{H}]^q \cdot [\text{L}]^r} \quad (15)$$

A titrálási adatokból a proton- és fémkomplexek stabilitási szorzatát a Tanszéken kifejlesztett PSEQUAD,⁹⁵ valamint – ennek továbbfejlesztett változata – a SUPERQUAD⁹⁶ nevű számítógépes programokkal számítottuk ki. A program képes ugyanazon rendszer különböző fémion/ligandum aránynál vagy koncentrációknál kapott mérési adatait párhuzamosan kiértékelni. A térfogat-pH adatpárok mellett, bemenő adatként meg kell adnunk a komponensek (M, H, L), valamint az asszociátumok (a ligandum különböző protonáltsági fokú részecskéi, a $\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r$ összetételű fémkomplexek, illetve a hidroxokomplexek) számát, azok összetételét az M, H és L komponensekre nézve (p, q, r), és az egyes asszociátumok pontos vagy közelítő stabilitási szorzatait. További kiindulási paraméter az egyes komponensek kiindulási koncentrációja, a titráló oldat koncentrációja, a vízionszorzat és a mérőegységre jellemző Irving korrekciós tényező.⁹⁷ A program a keresett stabilitási szorzatokat az M, H és L komponensekre felírt alábbi anyagmérlegek megoldásával adja:

$$c_{\text{M}} = [\text{M}] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{pqr} [\text{M}]_i^p [\text{H}]_i^q [\text{L}]_i^r \quad (16)$$

$$c_{\text{H}} = [\text{H}] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{pqr} [\text{M}]_i^p [\text{H}]_i^q [\text{L}]_i^r \quad (17)$$

$$c_M = [M] + \sum_{i=1}^n \tau_i \beta_{pqr} [M]_i^p [H]_i^q [L]_i^r \quad (18)$$

ahol n a rendszerben képződő asszociátumok számát, p , q és r pedig a sztöchiometriai együtthatókat jelöli.

Amennyiben vegyes ligandumú rendszereket vizsgálunk, a komponensek száma eggyel nő a második ligandum miatt, így négy komponensre írható fel az anyagmérleg. A program a kiindulási adatokat felhasználva Newton-Raphson iterációval végzi a közelítést mindaddig, míg a titráló oldatra nézve a $\Sigma(V_{\text{mért}} - V_{\text{számolt}})^2$ értéke minimumot nem ér el (V a titrálóoldat térfogata). A program minden megadott pH-értéknél kiszámolja az összes képződő részecske egyensúlyi koncentrációját és a hozzátartozó standard deviáció értékét. Az iterációsorozat végén megkapjuk a finomított stabilitási szorzatokat és azok hibáját, valamint az ún. illesztési paramétert, ami a kísérleti és a számított titrálási görbék pontjaihoz tartozó $|V_{\text{mért}} - V_{\text{számolt}}|$ értékek átlaga. Ez az érték a közelítés jóságát jellemzi. A program egy adott komponensre vonatkozóan megadja az asszociátumok koncentráció-eloszlási görbéit a pH függvényében. A dolgozatban szereplő koncentráció-eloszlások a SED program⁹⁸ Windows alatt futó változatával, a MEDUSA-val⁹⁹ készültek a képződő komplexek összetétele és stabilitási állandója, valamint a komponensek teljes koncentrációjának ismeretében. A fémiont is tartalmazó – három- vagy négykomponensű – rendszerek esetében csak azoknak a részecskéknak a moltört szerinti eloszlását tüntettem fel, melyekben a fémion sztöchiometriai száma 0-tól különböző.

A méréseket pHM 84 (Radiometer) digitális pH-mérővel és 6.0234.100 (Metrohm) kombinált üvegelektóddal végeztük. A $\sim 0,2 \text{ mol/dm}^3$ -es, pontosan ismert koncentrációjú KOH-mérőoldat adagolását Dosimat 715 (Metrohm) automata buretta segítségével valósítottuk meg. Azoknak a ligandumoknak a vizsgálatánál, amelyek kisebb mennyiségben álltak rendelkezésre, egy számítógép által vezérelt automata MOL-AcS burettát és egy MOLSPIN pH-mérőt használtunk, amihez szintén egy Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektród csatlakozott. A lúgoldatot 0,5, 1,0 vagy 2,5 cm^3 végtérfogatú Hamilton fecskendővel adagoltuk.

A lúgoldat koncentrációját valamennyi esetben ismert koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát-oldat titrálási görbéjének Gran-féle linearizálásával határoztuk meg.¹⁰⁰ A diffúziós potenciál kiküszöbölésére és a mért pH-értékből a hidrogénion-koncentráció ($[H^+]$; mol/dm^3) számolására az Irving és munkatársai által javasolt módszert alkalmaztuk.⁹⁷

A pH-mérőt $0,050 \text{ mol/dm}^3$ kálium-hidrogén-ftalát-oldattal kalibráltuk, melynek pH-ja 25°C -on 4,008. Az állandó hőmérsékletet ($25 \pm 0,1^\circ\text{C}$) ultratermosztáttal, az oxigén kizárását és a kevertetést pedig argongáz átbuborékoltatásával biztosítottuk.

A mérésekhez készített minták térfogata $3\text{--}10 \text{ cm}^3$ volt a rendelkezésünkre álló ligandumok mennyiségétől függően. A ligandumok kezdeti teljes koncentrációja $2,5 - 4,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ volt. A ligandumok koncentrációját beméréssel vagy – ahol pontos tömegmérésre nem volt lehetőség a ligandum higroszkóposága miatt – a potenciometriás titrálási görbe ekvivalenciapontjai alapján, a SUPERQUAD program⁹⁶ segítségével határoztuk meg. A fémion/ligandum arányt 1:10 és 2:1 között változtattuk. A titrálások során fellépő térfogatnövekedést a kiértékelésre használt számítógépes program figyelembe vette.

A minták állandó ionerősségét ($0,20 \text{ mol/dm}^3$) megfelelő mennyiségű $1,0 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú KCl- vagy KNO_3 -oldatnak a titrálandó oldathoz való hozzáadásával biztosítottuk. Ez az ionerősség jó pontossággal megegyezik a mérőoldat koncentrációjával, ugyanakkor jóval nagyobb, mint a titrálandó oldat fémion- és ligandumkoncentrációjának az összege. Ez biztosítja azt, hogy a titrálás során az oldat ionerőssége gyakorlatilag ne változzon.

A pH-potenciometria az egyik legfontosabb komplexkémiai vizsgálómódszer, de vannak hiányosságai: pl. ha két részecske képződése azonos pH-effektussal jár, akkor azok nem különböztethetők meg ezzel a módszerrel. Egyes esetekben egy rendszer több, kémiaiailag reális modellel is jól leírható. Emellett a meghatározott stabilitási állandók nem adnak felvilágosítást arról, hogy a képződő komplexekben milyen kötésmód valósul meg, milyen a komplex geometriája. Sok esetben megfelelő modellrendszerekkel való összehasonlítással közvetett információt kaphatunk, de legtöbbször különböző spektrális mérések (pl. spektrofotometria, CD, ESR) szükségesek a pH-potenciometriás mérések eredményeinek bizonyításához, kiegészítéséhez.

4.4. UV-látható spektrofotometria

Réz(II)- és nikkel(II)-komplexek esetén végeztünk spektrális vizsgálatokat. A spektrumok elemzésével a képződött komplexek szerkezetére, geometriájára, a koordinálódó donortomok számára és kémiai jellegére lehet következtetni.

A **réz(II)komplexek**re jellemző tetragonálisan torzult, oktaéderes térben gyenge és erős terű ligandumokkal különbözőképpen ugyan, de mindkét esetben négyfelé hasadnak az

energiaszintek. Az így létrejött négy energiaszint között háromféle energiájú d-d átmenetnek kellene megjelennie: $d_{xz} (d_{yz}) \rightarrow d_{x^2-y^2}$; $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$; $d_{z^2} \rightarrow d_{x^2-y^2}$. Ezek az átmenetek gyakran összeolvadnak egyetlen sávva, és az energiájuk, illetve az intenzitásuk erősen függ attól, hogy a ligandumnak hány donoratoma koordinálódik a fémionhoz. Ezen kívül az abszorpciós maximumához tartozó hullámhossz értékeket befolyásolja a komplex pontos geometriája és a donoratomok kémiai minősége is.

Ez utóbbinak a hatását Sigel és Martin,⁴ valamint Pettit és munkatársai¹⁰¹ vizsgálták. A vizes oldatokban jelenlevő $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -ion négy ekvatoriális vízmolekulájának oxigén- vagy nitrogéndonorokkal történő helyettesítése az abszorpciós maximumot a rövidebb hullámhosszak felé tolja el. Ez az effektus különösen nitrogéndonoroknál jelentős. Kvantitatív összefüggések megadását az nehezíti, hogy az effektus nagysága a donoratom kémiai természetén kívül függ a kelátgyűrű méretétől, valamint a ligandumhoz kapcsolódó, de a koordinációban részt nem vevő szubsztituensektől is. Ezeket a hatásokat figyelmen kívül hagyva az alábbi közelítő egyenlet 2% pontossággal adja meg a várható λ_{max} értékét:⁴

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

Ez az összefüggés nem használható axiális koordináció esetén, az ugyanis a λ_{max} értékeinek kismértékű eltolódását eredményezi a nagyobb hullámhosszak felé (vörös eltolódás).

A **nikkel(II)komplexek**¹⁰¹ jellemző koordinációs száma a 4, 5 és 6, ezek közül a leggyakoribb a 4 és a 6. A 6-os koordinációs számú, oktaédes geometriájú komplexeknek három spinmegengedett d-d átmenete van a látható hullámhossztartományban, de mindhárom elég gyenge ($\epsilon < 30 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a Laporte-szabályban megfogalmazott tiltás miatt. Ezek az átmenetek:

$$\lambda_1 = 1430\text{-}770 \text{ nm } (^3\text{A}_2 \rightarrow ^3\text{T}_2 \text{ közötti átmenet})$$

$$\lambda_2 = 910\text{-}500 \text{ nm } (^3\text{A}_2 \rightarrow ^3\text{T}_1(\text{F}) \text{ átmenet})$$

$$\lambda_3 = 520\text{-}370 \text{ nm } (^3\text{A}_2 \rightarrow ^3\text{T}_1(\text{P}) \text{ átmenet})$$

A komplex geometriájának torzulása a középső sáv felhasadását eredményezheti. Ezek mellett létezik egy még kisebb intenzitású, spintiltott ($^3\text{A}_2 \rightarrow ^1\text{E}$) átmenet is, amely általában csak vállként jelenik meg valamelyik csúcson.

A 4-es koordinációs számú, tetraédes geometriájú Ni(II)-komplexek elnyelése sokkal intenzívebb ($\epsilon = 102\text{-}103 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A látható sáv hullámhossz-tartománya 900-500 nm. 4-es koordinációs számmal gyakran képződnek diamágneses sajátságú, síknégyszetes geometriájú komplexek is, különösen erős terű ligandumok esetén (pl. peptidek amidnitrogénjének kötődése). Ezek könnyen alakulnak ki más geometriájú komplexekből. Az

ilyen szerkezetű komplexek 550-400 nm körül adnak egy elég intenzív ($\varepsilon = 50\text{-}500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) sávot. Egy második, még intenzívebb sáv található 430 nm alatt, amely gyakran töltésátviteli eredetű.

A réz(II)- és nikkel(II)-komplexeket tartalmazó rendszerek spektrális vizsgálatát a 250-900 nm-es hullámhossz-tartományban végeztük. A spektrumokat Hewlett Packard HP 8453 típusú egysugaras, diódasoros, valamint Perkin Elmer Lamda 25 típusú kétsugaras fotométereken, 1,000 cm-es küvettában vettük fel különböző pH-értékeken, különböző fémion/ligandum arányoknál a pH-potenciometriánál alkalmazott koncentráció-tartományban. A kapott spektrumok elemzését egyrészt a gyártó cég által biztosított kezelő- és kiértékelő programmal végeztük, másrészt a PSEQUAD program segítségével számos esetben az egyes komplexek spektrumát is meghatároztuk.

4.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia¹⁰²

A CD spektroszkópia a polarizált fény és egy optikailag aktív anyag kölcsönhatásán alapuló spektroszkópai módszer. A síkban polarizált fény egy balra és egy jobbra cirkulárisan polarizált fénysugár összegének tekinthető. Az optikailag aktív anyagok a síkban polarizált fény ezen két összetevőjével különbözőképpen lépnek kölcsönhatásba (eltérő a törésmutatójuk), a kilépő fény elliptikusan polarizált lesz. A cirkuláris dikroizmus vagy más néven Cotton-effektus a síkban polarizált fény két összetevőjének különböző abszorpciója. Az abszorpcióban mutatkozó különbség a teljes abszorpcióhoz viszonyítva igen kicsi, annak kb. 1%-a.

Az optikailag aktív anyagokban a jobbra és a balra cirkulárisan polarizált sugárzás nemcsak különböző törésmutatóval, hanem különböző abszorpciós koefficienssel is jellemezhető. Így a közegen való áthaladás után a két sugár különböző helyen és amplitúdóval találkozik. A kétféle fénysugár abszorpciójának különbségét (pontosabban a $\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{bal}} - \varepsilon_{\text{jobb}}$ értéket) a hullámhossz függvényében ábrázolva megkapjuk a cirkuláris dikroizmus görbét. A CD görbe maximuma, illetve minimuma az elektrongerjesztési abszorpciós spektrum maximuma helyén, illetve ahhoz igen közel jelentkezik. Optikailag aktív vegyületekben tehát az abszorpciós sávokhoz tartozik a cirkuláris dikroizmus görbe egy-egy sávja. Az utóbbi görbe sávjai viszonylag keskeny Gauss-görbék, ellentétben az elektrongerjesztési spektrum abszorpciós sávjaival, melyek jóval szélesebbek.

A fémkomplexek optikai aktivitása a komplexmolekula aszimmetriájától vagy a ligandum saját – a komplexképződés előtt is meglevő – aszimmetriájától származhat. A komplexmolekula optikai aktivitását okozhatja a központi atom aszimmetriája vagy a komplexképződés hatására a ligandum donoratomján kialakuló aszimmetria (Meisenheimer-komplex). A koordináció hatására nemcsak egy donoratom, hanem egy egész ligandum is aszimmetrikussá válhat, ami szintén a komplex optikai aktivitását eredményezi.

Számos komplex szerkezetének vizsgálatában eredményesen használták a CD spektroszkópiát, melyek között említhetjük a Cu(II), Ni(II) és a Pd(II) peptidkomplexeit.¹⁰³ A különböző di- és tripeptidek tanulmányozása során bizonyos törvényszerűségeket figyeltek meg, amelyeket Sigel és Martin foglalt össze.⁴ Tripeptidek esetén az MH_2L összetételű komplexekben a deprotonálódott amidnitrogének koordinációja révén viszonylag merev szerkezet alakul ki. Megállapították, hogy ezen peptidek komplexeinek CD spektrumai jól értelmezhetők az ún. dupla-oktán vagy hexadekán szabállyal. Eszerint, ha a komplex koordinációs síkja alatti és feletti teret 8-8 szektorra osztjuk, és minden szomszédos szektornak ellentétes előjelet tulajdonítunk, akkor az adott szektorban található optikailag aktív csoport hatására bekövetkező Cotton-effektus előjelét a szektor előjele adja meg. A komplexek CD spektrumának másik jellegzetessége a jelek intenzitásának additivitása, azaz az egyes (nem koordinálódó oldalláncok) hatása összeadódik. Például az AlaAlaAla komplexének CD intenzitása egy adott hullámhosszon egyenlő a háromféle, egy alaninből és két glicinből felépülő tripeptidek esetén tapasztalt intenzitások összegével. Ez az összefüggés nemcsak az alanin esetén igaz, hanem valamennyi nemkoordinálódó oldalláncot tartalmazó peptidre érvényes.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Ezek alapján felállítottak egy összefüggést, amelynek segítségével egy XaaYaaZaa tripeptid komplexének várható Cotton-effektusa adott hullámhosszon kiszámítható:

$$\Delta\epsilon_{\lambda}^{XaaYaaZaa} = \Delta\epsilon_{\lambda}^{XaaGlyGly} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{GlyYaaGly} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{GlyGlyZaa} \quad (20)$$

ahol $\Delta\epsilon_{\lambda}^{XaaYaaZaa}$ az adott XaaYaaZaa tripeptid fémkomplexének λ hullámhosszon mért Cotton-effektusa. Megállapították azt is, hogy a komplexben különböző helyzetben lévő, de azonos kémiai minőségű optikailag aktív csoportok különböző nagyságú Cotton-effektust eredményeznek:

$$\Delta\epsilon_{\lambda}^{GlyXaaGly} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{GlyGlyXaa} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{XaaGlyGly} \quad (21)$$

Ennek oka az, hogy a központi fémionhoz, mint kromofor csoporthoz kapcsolódó különböző donorcsoportok nem azonos hatásfokkal továbbítják a királis információt. Hatásuk alapján a következő sorrend állítható fel: amidnitrogén > karboxilátóxién > aminonitrogén.

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

A kapott CD görbék elemzését egyrészt a gyártó cég által biztosított kezelő- és kiértékelő programmal végeztük, másrészt a PSEQUAD⁹⁵ program segítségével az egyes komplexek spektrumát is meghatároztuk. A spektrumok elemzésével a képződött komplexek szerkezetére, geometriájára, a koordinálódó donatoratomok számára és kémiai jellegére lehet következtetni.

4.6. ESR spektroszkópia

Az elektronspin-rezonancia (ESR) spektroszkópia fontos vizsgálati módszer olyan molekulák és ionok tanulmányozására, melyek párosítatlan elektronokat tartalmaznak, azaz paramágneses sajátosságúak. Ebbe a csoportba tartoznak az általunk vizsgált tetragonálisan torzult oktaéderes Cu(II)-komplexek is, amelyekre jellemző ESR paramétereket az alábbi összefüggések alapján számolhatók:

$$g_{\parallel} = g_{\parallel}^0 \cdot \frac{H_0}{H_{\parallel}} \quad (22)$$

$$A_{\parallel} [\text{cm}^{-1}] = \frac{g_{\parallel} \cdot \mu_B \cdot a_{\parallel}}{h \cdot c} \quad (23)$$

ahol $H_{\parallel}$ a mintában mért mágneses térerő [Gauss], H_0 a standard esetén kapott mágneses térerő érték [Gauss], $a_{\parallel}$ a csatolási állandó [Gauss], c a fénysebesség ($2,998 \cdot 10^{10} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$).

Az ESR spektrumok paramétereiből ($A_{\parallel}$ és $g_{\parallel}$) – a már ismert szerkezetű komplexek paramétereivel való összehasonlítás alapján – a fémion körül kialakuló koordinációs módra és a koordinálódó atomok kémiai minőségére lehet következtetni. Az ESR spektroszkópia előnye az UV-látható spektrofotometriával szemben, hogy itt keskenyebb csúcsok vannak, így több komplex együttes jelenléte esetén is lehetséges az egyes komplexek ESR paramétereinek

a számítása, emellett az ESR spektrumok egymáshoz viszonyított intenzitásából monomer szerkezetek esetén az egymáshoz viszonyított móltört is jól becsülhető. A jelek kiszélesedéséből, és a merőleges tartományban található 7 jel megjelenéséből pedig dimer vagy más oligomer szerkezetek jelenlétére lehet következtetni.

Dimer szerkezetek esetében az ESR spektrum alapján, a merőleges tartományból lehetőség van a Cu-Cu távolság ($R_{\text{Cu-Cu}}$) számolására is a Stevens egyenlet alapján.¹⁰⁷

$$R_{\text{Cu-Cu}} = \sqrt[3]{\frac{0,325 \cdot g_{\perp}^2}{D} \cdot |1 - (3 \cdot \cos^2 \Theta)|} \quad (24)$$

Az egyenletben szereplő Θ szög azt mutatja, hogy milyen szöget zár be egymással a réz(II)ionok koordinációs síkjára merőleges egyenes és a két fémiont összekötő egyenes. Mivel erre a szögre egyéb mérésekből információ nem állt rendelkezésünkre, így ezt a szöveget a számolásoknál 0-nak vettük.

A mérések Olaszországban (Department of Chemistry, University of Sassari), Prof. Giovanni Micera Kutatócsoportjában, Daniele Sanna és Eugenio Garribba vezetésével készültek. A spektrumokat Varian E-9 spektrométeren (9,15 GHz), etilén-glikol hozzáadása után 120 K hőmérsékletűre lehűtött oldatokban vették fel különböző pH-értékeknél, illetve fémion/ligandum arányoknál. A szobahőmérsékleten készült spektrumokat Bruker EMX spektrométerrel vették fel. A mérésekhez használt fémtörzsoldat ^{63}Cu izotópot tartalmazott, koncentrációja valamennyi mintában 5 mM volt. Külső standardként difenil-pikril-hidrazint használtak, melyre $g_{\parallel}^0 = 2,0028$.

4.7. Tömegspektrometria (MALDI-TOF-MS)

Többmagvú réz(II)komplexek vizsgálatára az eddig leírt spektroszkópiai módszerek csak korlátozottan alkalmasak, mivel itt egy molekulán belül is többféle kémiai környezetben lévő fémionok találhatók. A komplexek összetételének meghatározásában jelentős segítséget nyújt, ha ismerjük a komplex pontos molekulatömegét, melynek mérésére alkalmas módszernek bizonyult a MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight) módszer. Emellett – a komplex fragmentálódását, hasadását vizsgálva – szerkezeti információ is nyerhető.¹⁰⁸

"Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation" (MALDI):

Tömegspektroszkópiás méréseknél az első feladat a vizsgálni kívánt molekula ionos formába hozása. Erre (az "Electrospray Ionisation" (EI) mellett) a legkíméletesebb módszer a

MALDI.^{109,110} Mindkét módszert széles körben alkalmazzák peptidek és proteinek, valamint fémkomplexeik vizsgálatára.¹¹¹ A MALDI technikánál a komplexet egy megfelelő mátrixszal keverjük össze, mely elnyeli a gerjesztéshez használt lézersugarat, az energiáját átadja a vizsgált komplexnek és ezáltal ionizálja azt. Mátrixként olyan anyagot kell választani, melynek az alkalmazhatósági körülményei megegyeznek a komplex képződési körülményeivel, ugyanakkor nem szorítja ki a vizsgált ligandumot a fémion koordinációs szférájából és a komplexszel semmiféle reakcióba nem lép. Az alkalmazott mátrixok ezen sav-bázis és komplexkémiai viselkedését korábbi irodalmi adatok alapján ellenőriztük. Két mátrix felelt meg ezen kritériumoknak, a 2,5-dihidroxi-benzoészav¹¹²⁻¹¹⁴ és a 2-amino-5-nitropiridin.

"Time of Flight" (TOF):

Tömegspektrometriában a gerjesztés (ionizáció) során képződő ionokat az alapján választjuk el, hogy egy állandó feszültséget kapcsolva egy térre, azon a molekulák a tömeg/töltés (m/Z) hányadosuk alapján különböző idő alatt érnek keresztül.

A réz(II)komplexekre kapott MALDI-TOF-MS mérések kiértékelésénél szem előtt kell tartani, hogy a réz(II)ion legtöbbször (bár nem minden esetben) csak réz(I)ionná való redukálódása után képes repülni. Ez a redukció megváltoztatja az addukt vagy a komplex töltését (egy réz(II)ion réz(I)ionná történő redukciója 1 egységgel csökkenti a töltést), amit pozitív üzemmódban való detektálás esetén egy H^+ vagy alkálifémion kompenzál.

Szintén korábbi vizsgálatok azt állapították meg, hogy a MALDI elég kíméletes ionizációs módszer ahhoz, hogy a fémkomplexek a gerjesztés során ne bomoljanak el. Azonban a fő molekulaion mellett általában megtalálhatjuk a fragmenseket is. Átmenetifémionok (vas(II), kobalt(II), nikkel(II), réz(II), cink(II)) hisztidinnel alkotott $MH_{-1}L$ komplexeire végzett szisztematikus vizsgálatok azt mutatták, hogy legkönnyebben a karboxilátcsoport lép ki a komplexből. Az ezt követő lépésben NH_3 , $CH_2=NH$, HCN vagy redukált fémion hasad le.¹¹⁵

A méréseket a *Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén* végezték *Prof. Kéki Sándor* és munkatársai BRUKER Biflex III. tömegspektrométeren, LS nitrogén-lézer alkalmazásával ($\lambda = 337 \text{ nm}$).

4.8. ¹H NMR spektroszkópia

Valamennyi ligandum esetén készült ¹H NMR spektrum, egyrészt a ligandum azonosítása, másrészt a tisztaságának ellenőrzése céljából. Az általunk vizsgált komplexek közül egyes nikkell(II)-, illetve cink(II)-komplexek esetében végeztünk ¹H NMR méréseket. Nikkell(II) esetében csak a síknégyszetes, diamágneses komplexek vizsgálata lehetséges, így a peptidek esetén a NiH₃L összetételű komplex spektrumát vizsgáltuk erősen lúgos oldatokban. Az NMR időskálájához viszonyítva ezekben a komplexekben a ligandumcsere sebessége többnyire lassú, ami azt eredményezi, hogy a szabad és a koordinált ligandum mágneses rezonanciajelei különböző kémiai eltolódás (δ) értékeknél jelennek meg. A cink(II)-komplexek szerkezetének meghatározására nem alkalmasak az UV-látható, illetve CD-spektroszkópiás módszerek, mivel ezeknek a komplexeknek a látható tartományban nincs elnyelése, ugyanakkor szóba jöhet a ¹H NMR-spektroszkópia. A ¹H NMR spektrumban megjelenő jelek pontos asszignálása érdekében felvettük a teljesen deprotonált ligandumok spektrumát is. A hidrogént tartalmazó csoportokra jellemző jelek megjelenéséből, a kémiai eltolódás értékéből (δ), illetve az eltolódás értékének változásából (a szabad ligandumhoz viszonyítva), valamint a jelek felhasadásából következtethetünk a ligandum csoportjainak protonáltságára, illetve a fémion kötésére, az esetleges izomerek jelenlétére.

A ligandumokat 99,8 %-os izotóptisztaságú D₂O-ban oldottuk fel. A spektrumok felvételéhez 0,01 – 0,003 mol/dm³ koncentrációjú oldatokat készítettünk, és általában 1:2 fémion-ligandum arányt alkalmaztunk. Az oldatok pH* értékeit DCl- és NaOD-oldatok segítségével állítottuk be a kívánt értékre. A mérések során vizes közegbeli pufferre kalibrált pH-mérő által kijelzett értékek a D₂O-oldatokban pH* értékeknek felelnek meg. A pH* értékeket az alábbi egyenlet¹¹⁶ segítségével tudjuk átszámolni a pH-skálára:

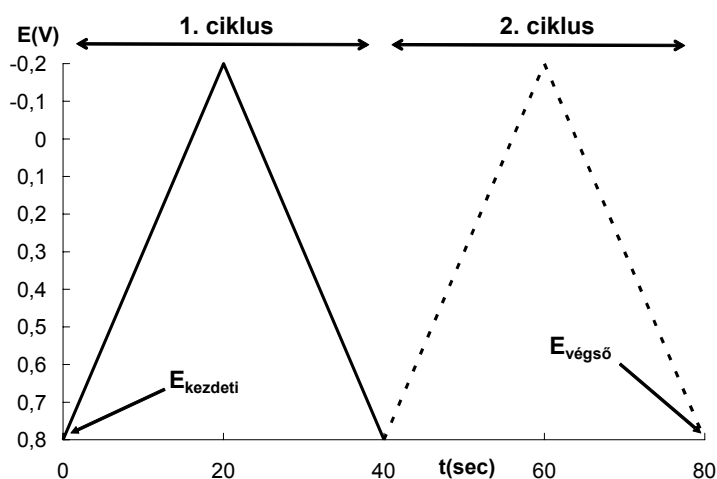
$$\text{pH} = 0,930 \text{ pH}^* + 0,40 \quad (25)$$

A ¹H NMR spektrumokat BRUKER AM360 MHz FT-NMR készüléken vettük fel, standardként nátrium-3-trimetil-szilil-propánszulfonátot (TSP) vagy nátrium-2,2-dimetil-2-szilapentán-5-szulfonsavat (DSS) használtunk. A kapott spektrumokat az NMR spektrométer saját szoftverjével, illetve az 1D WINNMR programmal értékeltük ki.

4.9. Ciklikus voltammetria

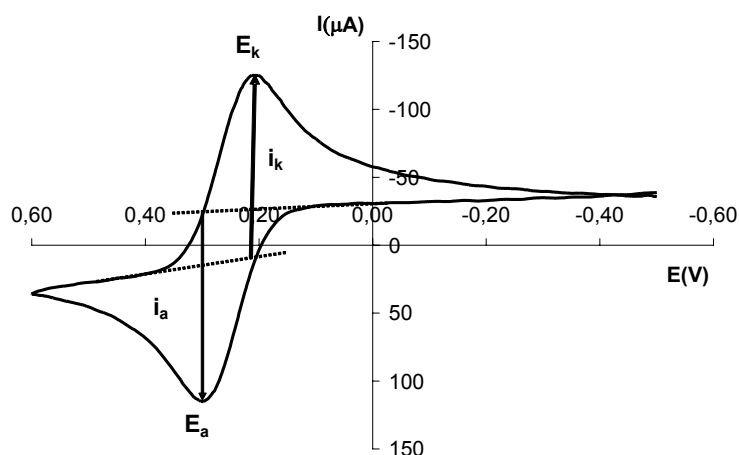
A Cu(II)-komplexek redoxipotenciál értékeit ciklikus voltammetria segítségével határoztuk meg. A ciklikus voltammetria egy sokoldalúan használható elektroanalitikai technika. Egyike azon vizsgálati módszereknek, mely segítségével a különböző kémiai vegyületek, biológiai anyagok vagy elektródák felületének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

A ciklikus voltammetriában egy munkaelektrodon lineárisan változtatjuk a feszültséget egy kezdeti potenciál értéktől (E_{kezdeti}) egy meghatározott feszültség értékig ($E_{\lambda 1}$), melyet forduló potenciálnak nevezünk.¹¹⁷⁻¹¹⁹ A potenciál változását egy referenciaelektrod potenciáljához képest mérjük, mely általában telített kalomel (SCE) vagy Ag/AgCl elektród.



13. ábra Potenciálváltozás az idő függvényében ciklikus voltammetriás mérés során

A 13. ábra segítségével nyomon követhetjük, hogy hogyan változik a potenciál az induló potenciálról a forduló értékig, majd vissza az eredeti értékre és a második ciklusban mindezen lépések ismétlődnek az idő függvényében. Amennyiben a munkaelektrodon átfolyó áramerősséget ábrázoljuk a feszültség függvényében ciklikus voltammogramot kapunk, amit a 14. ábrán bemutatott példa szemléltet.



14. ábra Egy voltammogram és kiértékelésének szemléltetése

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

$$E_{1/2} = \frac{E_k + E_a}{2} \quad (26)$$

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

$$E^0 = E_{1/2} + E^0(\text{Ag/AgCl}) \quad (27)$$

Lényeges információt hordoz a katódos és az anódos csúcspotenciálok különbsége, amelyet csúcsszeparációnak is nevezünk. A csúcsszeparáció értékéből következtetni lehet a reakció mechanizmusára és a redoxi folyamatban résztvevő elektronok számára. Amennyiben a reakció reverzibilis, (vagyis a diffúziós koefficiens azonos az oxidált és a redukált formára), az alábbi egyenlet teljesül:

$$\Delta E = E_a - E_k = \frac{0,059}{n} \quad (28)$$

ahol n a résztvevő elektronok száma.

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

$$\frac{i_a}{i_k} \approx 1 \quad (29)$$

Ciklikus voltammetriás méréseinket egy Metrohm gyártmányú 746 VA Trace Analyzer készülékkel végeztük el, amelyhez egy 747 VA Stand csatlakozott. A minták

méréséhez klasszikus háromelektrodos rendszert használtunk. Referenciaelektródunk egy 6.0728.010 (Metrohm) Ag/AgCl elektrod volt 3 mol/dm³-es KCl háttélektrolittal ($E^0(\text{Ag/AgCl}) = 0,210 \text{ V}$), segédelektrodként 6.1247.010 (Metrohm) platina elektrodot, míg munkaelektrodként az adott rendszer várható redoxipotenciál értékének függvényében 3 mm átmérőjű 6.1204.110 (Metrohm) szén vagy 6.1204.120 (Metrohm) platina munkaelektrodokat használtunk. Valamennyi esetben vizes oldatokat vizsgáltunk 25 °C-on, az oldatok pH-ját KOH-oldattal és HNO₃-oldattal állítottuk be a kívánt értékre, melyet a MEDUSA⁹⁹ program segítségével számolt eloszlási görbék alapján választottunk ki. A pH ellenőrzésére Metrohm 827 mobil pH-mérő készüléket és 6.0234.100 kombinált üvegelektrodot használtunk.

Minden esetben rögzítettük a deprotonált ligandum voltammogramját erősen bázikus közegben, és azt tapasztaltuk, hogy nem jelennek meg redoxi folyamatra utaló jelek a voltammogramban. A kezdeti méréseknél a minták térfogata 10 cm³ volt, a vizsgált komplexekben a réz(II)ion koncentrációját 1·10⁻³ – 1·10⁻⁴ mol/dm³ közötti értékre állítottuk be. A mérések során általában nyolc-tízszeres ligandumfelesleget alkalmaztunk. A legtöbb ligandumból azonban csak igen kis mennyiség állt rendelkezésünkre, így le kellett csökkentenünk a mérendő minta térfogatát, hogy a szükséges ligandumfelesleget biztosítani tudjuk. Egy mikrocellát (15. ábra) építettünk ezen vizsgálatokhoz, amelyhez BASI Instr. RE-5B, MF-2079 Ag/AgCl referencia elektrodot használtunk, de ebben az esetben 3 mol/dm³-os NaCl-oldat volt a háttélektrolit ($E^0(\text{Ag/AgCl}) = 0,209 \text{ V}$).



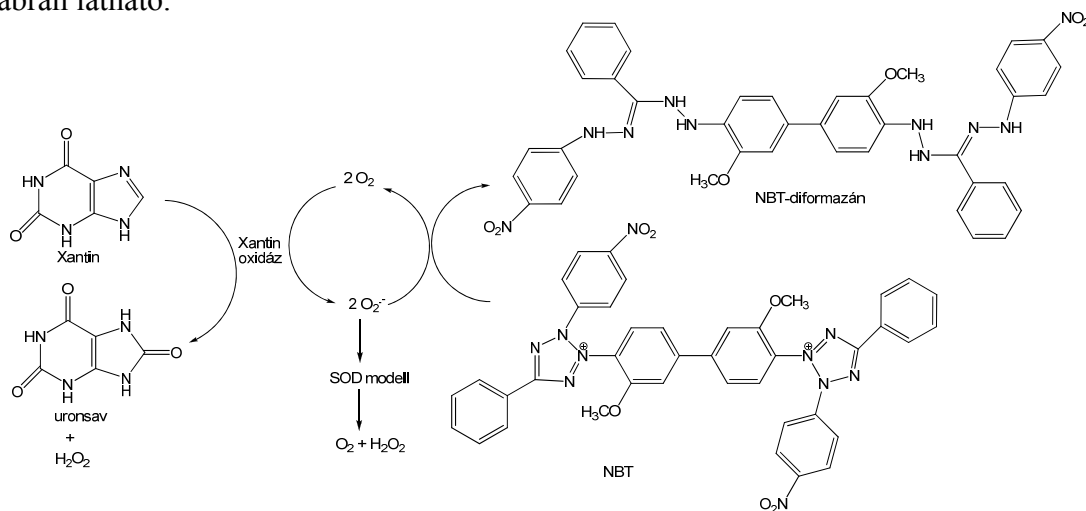
15. ábra Az alkalmazott mikrocella fényképe

Segédelektrodként egy mikrocellában is alkalmazható platinaelektrodot (ALS Co. Japan), munkaelektrodként pedig 2 mm átmérőjű szén- (CHI104) és platinaelektrodokat (CHI102) használtunk. Mind a normálcellát, mind a mikrocellát a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ redoxi rendszerrel kalibráltuk, a mért redoxipotenciál érték jó egyezésben volt a korábbi irodalmi adattal ($E^0 = 0,458 \text{ V}$).¹²⁰

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

4.10. Szuperoxid-diszmutáz aktivitás vizsgálatok

A Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzim a szuperoxid gyökkanion diszproporcióját katalizálja ($k \sim 2 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$, pH = 7,4). Az enzim működését utánzó fémkomplexek aktivitása mérhető közvetlenül és közvetve is. A közvetlen mérés azonban elég költséges, emiatt ritkán használt eljárás.¹²¹ A közvetett technikák közül az egyik legelterjedtebb módszer a xantin-xantin-oxidáz reakciójában *in situ* előállított szuperoxid gyökkanion és a nitroblue-tetrazólium-klorid (NBT) közötti reakció spektrofotometriás nyomon követése. A modellreakció sémája a 16. ábrán látható.



16. ábra A SOD-aktivitás méréséhez használt modellreakció sematikus rajza

SOD aktivitást mutató fémkomplex hiányában az NBT a keletkező szuperoxid hatására redukálódik diformazánná, és ez a redukció színváltozással jár, amelyet 560 nm-en lehet nyomon követni. Amennyiben aktívnek bizonyuló fémkomplext adunk a mintához, az 560 nm-en mért abszorbancia csökkenést mutat.

A SOD aktivitás méréseket $\text{H}_2\text{PO}_4^- - \text{HPO}_4^{2-}$ puffert tartalmazó közegben végeztük el ($c = 5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$), az NBT-oldat $5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$, a xantin $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú volt. A xantin oxidáz mennyiségét úgy állítottuk be, hogy az abszorbancia változás 560 nm-en $0,025 - 0,028 \text{ min}^{-1}$ érték közé essen. Az NBT redukcióját 480 másodpercig követtük nyomon változó koncentrációjú réz(II)-komplex jelenlétében, illetve annak távollétében, a $\text{Cu(II)}_{\text{teljes}} = 0 - 2,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ között változott. Összehasonlítás céljából a natív enzim SOD aktivitását is vizsgáltuk (pH 6,8: $c_{\text{enzim}} = 3,75 \cdot 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$; pH = 7,4: $c_{\text{enzim}} = 4,92 \cdot 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$).

A SOD aktivitást mutató vegyületek aktivitását az IC_{50} értékkel szokás jellemezni. Ez azt a komplexkoncentrációt jelöli, amelynél a diformazán képződése az enzimutánczó vegyület távollétében mért értékhez képest a felére csökken. Ezt a (30) egyenletnek megfelelően számított inhibíció% görbéből határozzuk meg, az 50 %-os inhibícióhoz tartozó komplexkoncentráció adja az IC_{50} értéket.

$$\text{inhibíció\%} = \frac{\left(\frac{\Delta A}{\text{idő}}\right)^{\text{vak}} - \left(\frac{\Delta A}{\text{idő}}\right)^{\text{komplex}}}{\left(\frac{\Delta A}{\text{idő}}\right)^{\text{vak}}} \cdot 100 \quad (30)$$

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

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

A $c_{\text{Cu(II)-komplex}}$ és a kiszámított inhibíció adatokra Scientist program segítségével telítési görbét illesztettünk az alábbi egyenlet szerint:¹²¹

$$\text{inhibíció} = \frac{A \cdot c_{\text{Cu(II)-komplex}}}{B + A \cdot c_{\text{Cu(II)-komplex}}} \quad (31)$$

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

$$\text{relatív aktivitás} = \frac{\text{IC}_{50}(\text{CuZnSOD})}{\text{IC}_{50}(\text{komplex})} \cdot 100 \quad (32)$$

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

5.1. Kelátképző helyzetben levő imidazolgyűrűk hatása az aminosav- és peptidszármazékok komplexképző sajátosságaira^{D3-D15}

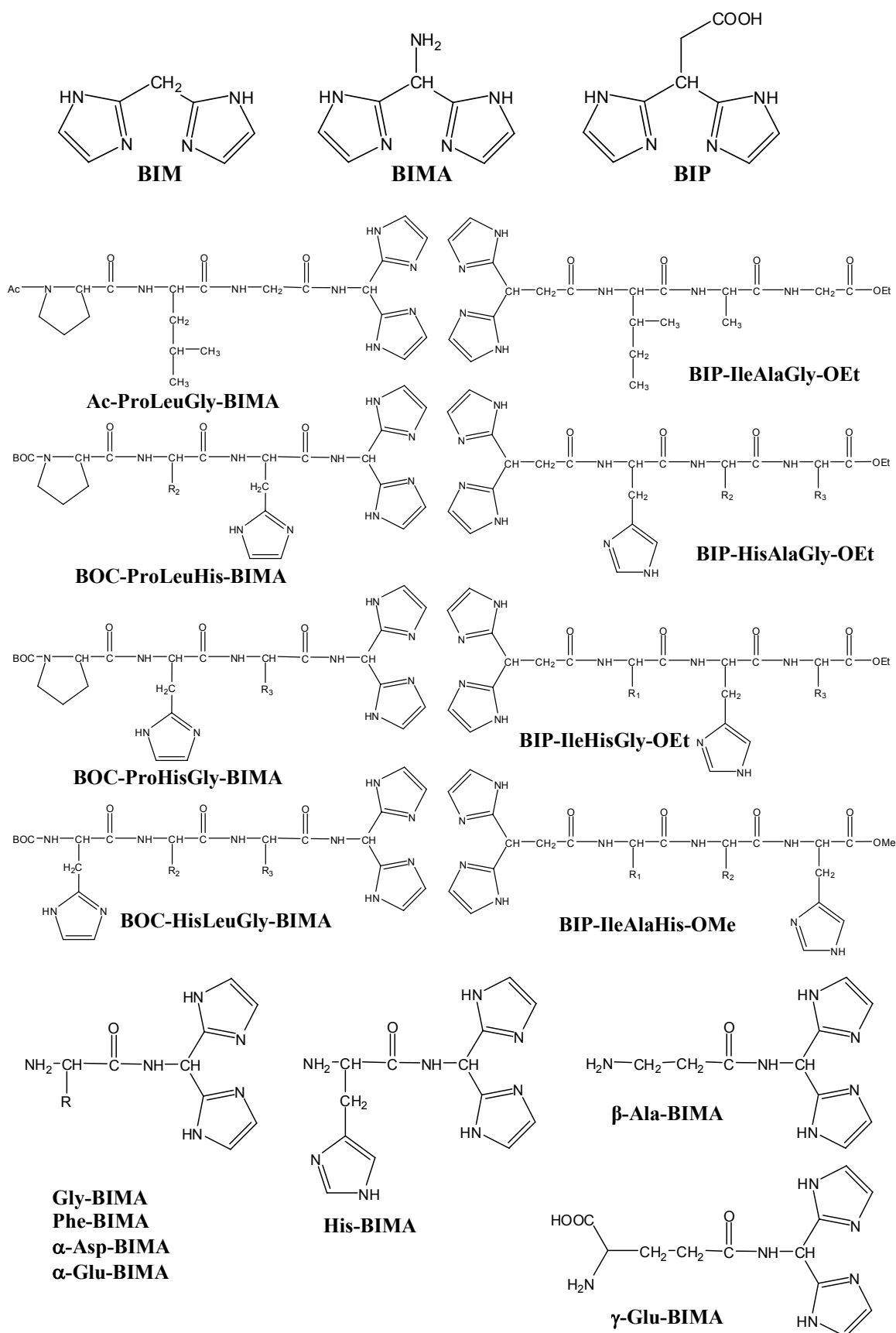
A különböző metalloenzimekben a fémionok általában több oldalláncbeli donoratomhoz kötődnek, és ez nagyon gyakran jelenti két vagy több imidazolgyűrűhöz való koordinációt. Ezen enzimek aktív centrumában a peptidláncok háromdimenziós szerkezete az imidazolcsoportokat olyan közeli helyzetbe hozza, hogy ugyanahhoz a fémionhoz tudnak kötődni. Így ezeknek az enzimeknek jó modelljei lehetnek azok az egyszerű imidazolszármazékok, amelyekben két vagy több imidazolcsoport alifás hídon keresztül kapcsolódik össze. A legegyszerűbb ilyen típusú vegyületek előállítása és komplexeik vizsgálata még az 1960-as évekre nyúlik vissza. 1965-ben Drey és Fruton^{122,123} a bisz(imidazol-4-il)-metánt állította elő és vizsgálta protonálódási és komplexképződési folyamatait. Az 1970-es évek végén több egyszerű bisz(imidazol-2-il) származék előállítása is megtörtént és komplexeik oldatbeli és szilárdfázisú vizsgálatának eredményeiről több közlemény jelent meg.^{124,125} Ezt követően számos poliimidazol ligandum szintéziséről, komplexeik előállításáról, vizsgálatáról számoltak be. Ezek a vizsgálatok azt tükrözték, hogy a több imidazolgyűrű jelenléte a molekulában a ligandumok jelentős fémmegkötő képességet eredményezi. Ezek alapján egyrészt többféle poliimidazol ligandumot tartalmazó polimer réteget állítottak elő és vizsgálták tulajdonságaikat,¹²⁶⁻¹²⁸ másrészt különböző enzimek szerkezeti modelljeiként tanulmányozták a kialakuló komplexeket – például hidrolitikus, nitrit reduktáz, tirozináz, szuperoxid-diszmutáz (SOD) aktivitásukat vizsgálták.¹²⁹⁻¹³⁷ Ez utóbbi kutatások eredményei arra mutatnak, hogy a két vagy több imidazolgyűrűt tartalmazó ligandumok komplexei potenciális szerkezeti és funkcionális modelljei lehetnek egyes metalloenzimeknek.

A különböző bisz(imidazol-2-il) származékok előállítása és vizsgálata kutatócsoportunkban az 1990-es évek elején indult, együttműködésben *Prof. Süli-Vargha Helgával* és munkatársaival (MTA, Peptidkémiai Kutatócsoport). A kiindulópont az volt, hogy a proteolitikus enzimek egy csoportja cink(II)-tartalmú metalloenzim, amelyek működését cink(II)ionokat koordinálni képes vegyületek (pl. imidazolszármazékok) alkalmazásával gátolni lehet. Ha szelektív gátlást akarunk elérni, akkor a cink(II) megkötésére képes csoporthoz olyan vegyületrészt kell kapcsolni, amely modellezi az enzim által hasítani

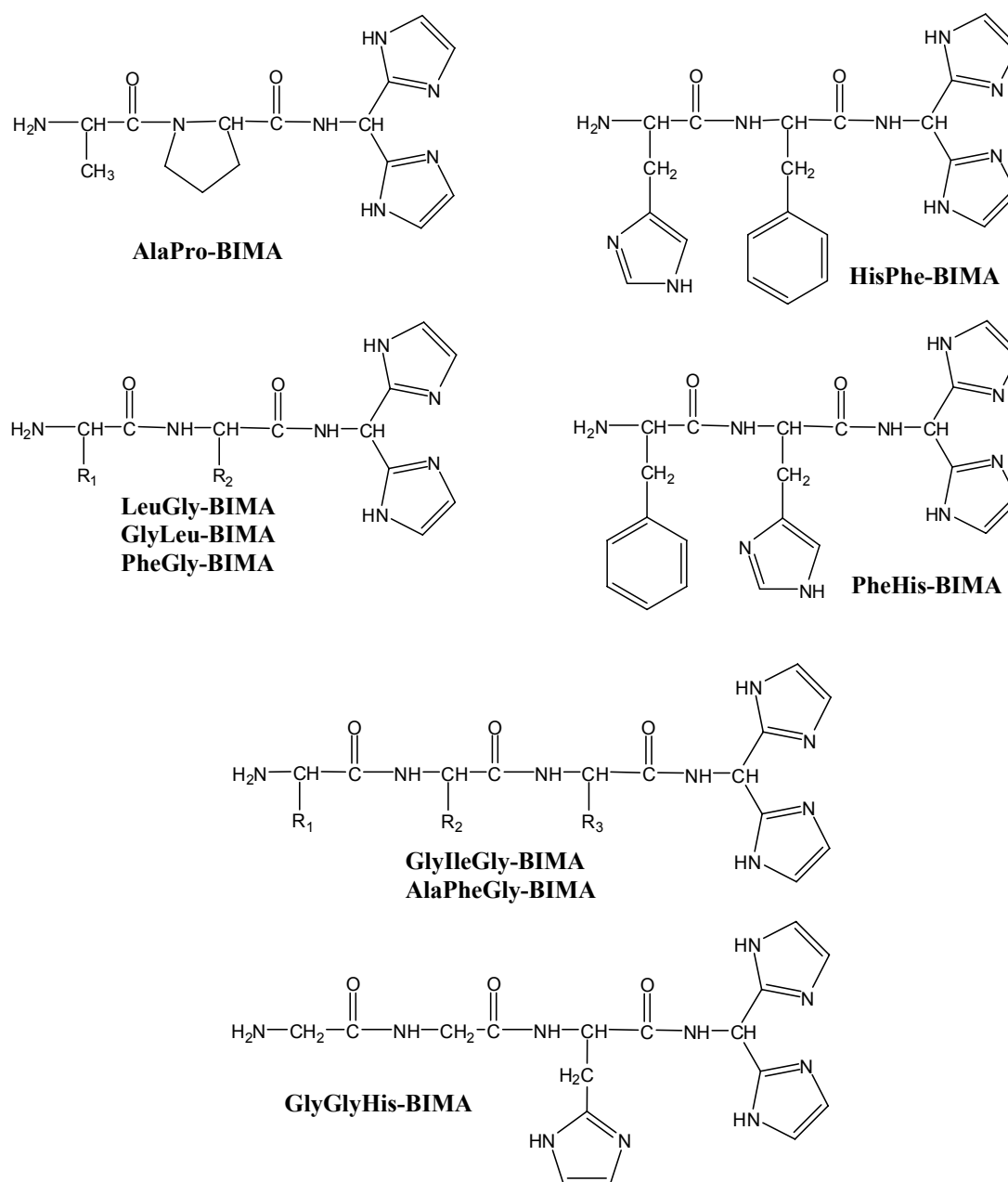
képes szubsztrátot vagy annak hasadó kötés körüli környezetét. Ilyen típusú ligandumtól az várható, hogy specifikusan kötődik az enzimhez és a cinkhez koordinálódva akadályozza a természetes szubsztrát hidrolízisét.

A kötőszövetet bontó kollagenáz enzimek gátlására így olyan vegyületeket terveztek és szintetizáltak a Peptidkémiai Kutatócsoportban, amelyben a cink(II)ionhoz való kötődést a bisz(imidazol-2-il)-csoport biztosítja, és ehhez az emlős kollagenáz által hasítható kollagén szekvencia hasadó kötés körüli környezetének (-ProLeuGlyIleAlaGly-) megfelelő peptidláncok kapcsolódnak. Az oldategyensúlyi vizsgálatokat Debrecenben végeztük, kiegészítve a legegyszerűbb bisz(imidazol-2-il) származékok vizsgálatával.

Bár az így előállított ligandumcsaládhoz, mint szelektív inhibitorhoz fűzött remények nem váltak be, a komplexképző sajátosságok tanulmányozása azt tükrözte, hogy a bisz(imidazol-2-il)-csoport nagyon jó fémmegkötő képességének köszönhetően alkalmas horgonycsoport lehet a különböző aminosav- és peptidszármazékokban az amidnitrogén deprotonálódásának elősegítésére, és jelenléte a molekulában alapvetően módosíthatja a komplexképződési folyamatokat. A BIP karboxilátcsoportján, illetve BIMA aminocsoportján keresztüli peptidkötés kialakítása N-terminálisan, illetve C-terminálisan bisz(imidazol-2-il)-csoportot tartalmazó származékok előállítását tette lehetővé. Az eredmények alapján ugyanakkor azt is megállapítottuk, hogy a peptidszerű koordináció kialakulásához a molekulában további horgonycsoportra van szükség, és ezt a szerepet az oldalláncbeli imidazolgyűrű nem képes betölteni. Így olyan aminosav-, illetve di- és tripeptidszármazékokat is előállítottunk, amelyek szabad aminocsoportot tartalmaznak és C-terminálisan egy bisz(imidazol-2-il)-csoporttal kapcsolódnak. A ligandumok komplexképző sajátosságainak vizsgálatából arra számítottunk, hogy a bisz(imidazol-2-il)-csoport jelentősen módosíthatja az aminosavak és peptidek komplexképző sajátosságait, és további információt adhat az imidazol-N koordinációs sajátosságairól. Az aminosav-, illetve peptidrész potenciális donorcsoportjai és a bisz(imidazol-2-il) rész koordinációja között jelentős kompetíció alakulhat ki, ami igen változatos szerkezetű komplexek képződéséhez vezethet. Hétféle aminosav-, hatféle dipeptid- és háromféle tripeptidszármazék fémkomplexeit – elsősorban réz(II), nikkel(II)- és cink(II)-komplexeit – tanulmányoztuk. Mindhárom ligandumcsoportban van olyan származék, amely a bisz(imidazol-2-il) részhez kapcsolódó láncban további oldalláncbeli donorcsoportot, elsősorban hisztidin imidazolgyűrűt is tartalmaz. A vizsgált ligandumok szerkezeti képletét a 17. és 18. ábra mutatja be, a kapott eredményeket pedig az alábbiakban foglalom össze.



17. ábra Bisz(imidazol-2-il)-csoportot tartalmazó származékok szerkezeti képlete I.



18. ábra Bisz(imidazol-2-il)-csoportot tartalmazó származékok szerkezeti képlete II.

5.1.1. A bisz(imidazol-2-il)-csoportot tartalmazó ligandumok sav-bázis sajátosságai

A bisz(imidazol-2-il)-csoport aromás gyűrűinek protonálódása valamennyi ligandum esetén a savas tartományban játszódik (Melléklet, M1. táblázat), a két protonált nitrogén közeli helyzete ugyanis elősegíti az imidazolcsoport deprotonálódását. Ennek mértéke függ attól, hogy milyen távol helyezkedik el egymástól a két gyűrű. Ha ugyanis a két aromás gyűrű közvetlenül kapcsolódik össze, a vonatkozó két deprotonálódási állandó nem határozható meg (2,2'-biimidazol)¹³⁸ vagy igen kis érték (2,2'-bipiridil: $pK_1 = -0,12$ ¹³⁹) A molekulában

jelenlevő más protonálódásra képes csoportok a két aromás nitrogén bázicitását tovább csökkentik. Ez azt eredményezi, hogy a legegyszerűbb vegyület (BIM) protonálódási állandói a legnagyobbak ($pK_1 = 4,74$, $pK_2 = 6,93$), míg a legnagyobb mértékben a metilén-csoport-hoz kapcsolódó aminocsoport növeli a két aromás nitrogénatom savasságát. Így a BIMA esetén az első deprotonálódási állandó pH-potenciometrián nem is határozható meg ($pK_1 < 1,5$). A két imidazolgyűrűre jellemző protonálódási állandó különbsége 2 logaritmus egység körül van, ami arra utal, hogy a két közeli helyzetben levő donortom között hidrogénkötés kialakulására van lehetőség. A különböző aminosav- és peptidszármazékok szintén kisebb pK értékei ugyanakkor arra is utalnak, hogy a metilén-csoport-hoz kapcsolódó peptidkötés karbonilcsoportja is elősegíti az imidazolgyűrűk deprotonálódását.

A bisz(imidazol-2-il)-csoport-hoz kapcsolódó aminosavban, illetve peptidláncban jelenlevő csoportok (terminális aminocsoport, illetve oldalláncbeli donorescsoportok) sav-bázis folyamataira a bisz(imidazol-2-il)-csoport jóval kisebb hatással van, a jellemző protonálódási értékek közel vannak a megfelelő di- és oligopeptidekre jellemző értékekhez. Ha a molekulában terminális aminocsoport és különösen, ha oldalláncbeli imidazolgyűrű is jelen van, a 3 vagy 4 nitrogéndonortomra jellemző sav-bázis egyensúlyok jelentős átfedésbe kerülnek egymással. A protonálódási mikrokonstansok meghatározása^{116,D14} alapján megállapítható, hogy a 4 donortom bázicitásának sorrendje: $\text{Im(N)}_{\text{BIM}(1)} < \text{Im(N)}_{\text{BIM}(2)} < \text{Im(N)}_{\text{His}} < \text{NH}_2$.

5.1.2. Bisz(imidazol-2-il) koordinációjú komplexek

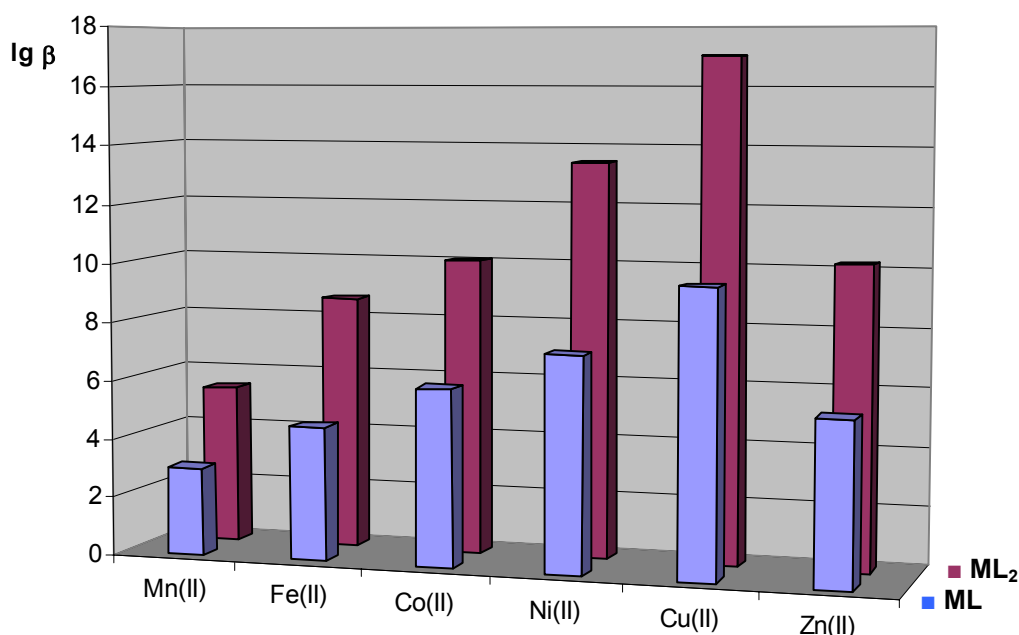
A nagyszámú ligandum átmenetifém-komplexeit nem a különböző típusú ligandumok vagy fémionok szerint mutatom be, hanem a kialakuló kötésmódok alapján csoportosítva. A komplexekre meghatározott stabilitási állandókat a Melléklet M2-M8 táblázatai tartalmazzák.

A legegyszerűbb bisz(imidazolil)-csoportot tartalmazó vegyület (BIM) vizsgálata egyértelműen bizonyította, hogy maga a bisz(imidazol-2-il) rész jó kötőhely szinte valamennyi vizsgált fémion számára. A BIM ligandummal számos átmenetifém képez ML és ML_2 (22.a ábra) összetételű komplexet. A két imidazolnitrogén koordinálódása a fémionhoz stabilis hattagú kelátgyűrű kialakulását eredményezi és stabilis mono- és bisz-komplexek képződnek 2 illetve 4 ekvivalens nitrogénatom kötődésével. A vizsgált rendszereket és a keletkező komplexek stabilitását mutatja be a következő táblázat.

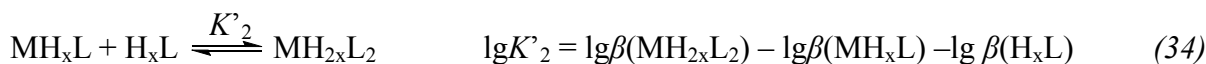
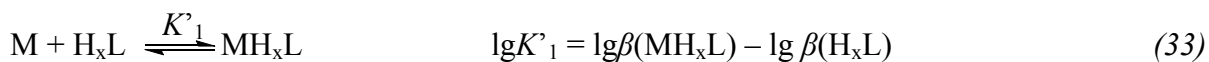
2. táblázat A BIM különböző átmenetifémionokkal alkotott komplexeinek stabilitási állandói

	Cu(II)	Ni(II)	Zn(II)	Co(II)	Fe(II)	Mn(II)	VO(IV)	Fe(III)
$\lg \beta(\text{ML})$	9,64	7,29	5,53	6,01	4,57	2,98	7,24	8,92
$\lg \beta(\text{ML}_2)$	17,03	13,46	10,22	10,06	8,64	5,38	12,89	13,1

A táblázat adatai és a 19. ábra jól tükrözi, hogy a különböző 3d átmenetifém-ionokkal képződött komplexek stabilitása követi az Irving-Williams sort.

**19. ábra** A BIM 3d átmenetifém-ionokkal alkotott komplexeinek stabilitása

A 2, illetve 4 imidazol (22.a ábra) koordinációjú komplex képződése valamennyi további vizsgált ligandum esetén képződik a savas tartományban. Ha a molekulában egyéb protonálódásra képes csoportok is jelen vannak, akkor a kialakuló komplexek összetétele általánosan MH_xL , illetve MH_yL_2 formában adhatók meg, ahol $x = 1,2$, $y = 1-4$ lehet. A különböző ligandumok esetén keletkező eltérő protonáltsági fokú mono- és bisz-komplexek stabilitásának összehasonlítására a stabilitási szorzatokból képezett állandók lehetnek alkalmasak az alábbi egyenleteknek megfelelően:



$$\lg(K'_1/K'_2) = \lg K'_2 - \lg K'_1 \quad (35)$$

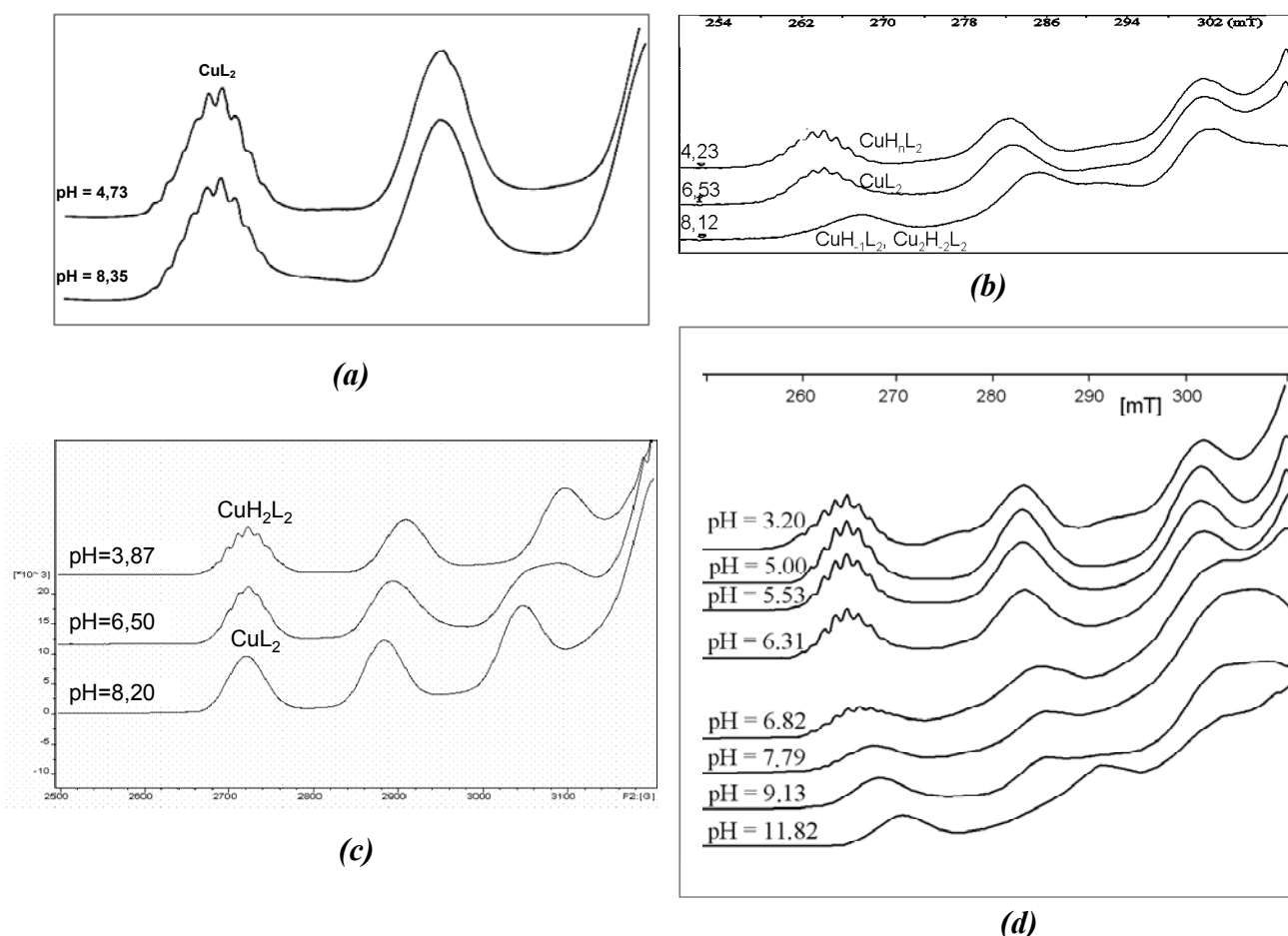
3. táblázat Az MH_xL_2 összetételű komplexekre jellemző képezett stabilitási állandók és spektrális paraméterek

MH_xL_2	$\lg K'_1$	$\lg K'_2$	$\lg(K'_1/K'_2)$	$\lambda_{\max}$ [nm]	$A_{\parallel} \times 10^4$ [cm ⁻¹]	$g_{\parallel}$ [Hz]
BIM*	9,64	7,39	2,25	578	199	2,237
BIP				580	202	2,235
BIMA	7,51	4,73	2,78	580	198	2,239
Ac-ProLeuGly-BIMA*	8,65	6,59	2,06	583		
BIP-IleAlaGly-OEt*	8,92	6,6	2,32			
BOC-ProLeuHis-BIMA	7,73	6,33	1,4	580	198	2,24
BOC-ProHisGly-BIMA	8,32	6,36	1,96	598		
BOC-HisLeuGly-BIMA	8,02	6,13	1,89	595	197	2,24
BIP-IleAlaHis-OMe	8,03	6,13	1,90	597		
BIP-IleHisGly-OEt	8,02	5,36	2,66	620	191	2,234
BIP-HisAlaGly-Oet	8,31	6,12	2,19	605	198	2,23
Gly-BIMA	9,16	6,58	2,58	590	201	2,236
Phe-BIMA	8,27	6,37	1,90	588	192	2,235
α-Asp-BIMA	8,15	5,93	2,22	601	193	2,234
α-Glu-BIMA	8,85	5,93	2,92	596	193	2,232
β-Ala-BIMA	8,05	6,22	1,83	590	201	2,236
γ-Glu-BIMA	8,13	6,31	1,82	592	193	2,234
His-BIMA	6,20	4,82	1,38	605	197	2,234
GlyLeu-BIMA	7,84	6,45	1,39	599	193	2,235
LeuGly-BIMA	8,01	6,49	1,52	595	193	2,235
PheGly-BIMA	8,8	6,65	2,15	595	192	2,235
AlaPro-BIMA	9,34	6,61	2,73	601	193	2,234
HisPhe-BIMA	7,60	6,19	1,41	594	192	2,234
PheHis-BIMA	7,61	6,15	1,46	584	191	2,235
GlyIleGly-BIMA	8,68	6,06	2,62	582	195	2,230
AlaPheGly-BIMA	8,41	6,5	1,91	595	192	2,235
GlyGlyHis-BIMA	10,37	5,02	5,35	592	195	2,234

* $\lg(K'_1/K'_2) = \lg(K_1/K_2)$

A vizsgált rendszerek réz(II)-komplexei esetén meghatározott $\lg(K'_1/K'_2)$ értékeket a 3. táblázat foglalja össze. A táblázat adatai jól tükrözik, hogy ezek 2 lg egység körüli értékek, az eltérések a koordinálódó ligandumokban a koordinálódó csoportra jellemző eltérő protonálódási állandókból adódnak.

Ugyanakkor a Cu(II) esetén a négy imidazol koordinációjú szerkezetnek a kialakulását, a négy ekvivalens nitrogén kötődését a spektrális paraméterek is egyértelműen alátámasztják (3. táblázat). Az abszorpciós maximum az 590 ± 15 nm hullámhossz tartományba esik, míg az ESR spektrum párhuzamos tartományában egy 9 vonalas ^{14}N szuperhiperfinom felhasadás figyelhető meg és a jellemző paraméterek: $g_{\parallel} = 2,235 \pm 0,005$ és $A_{\parallel} = 196 \pm 5 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$. Ezt szemléltetik a 20. ábrán bemutatott ESR spektrumok, amelyeket különböző 1:2 arányú réz(II)-ligandum rendszerben savas tartományban vettek fel.



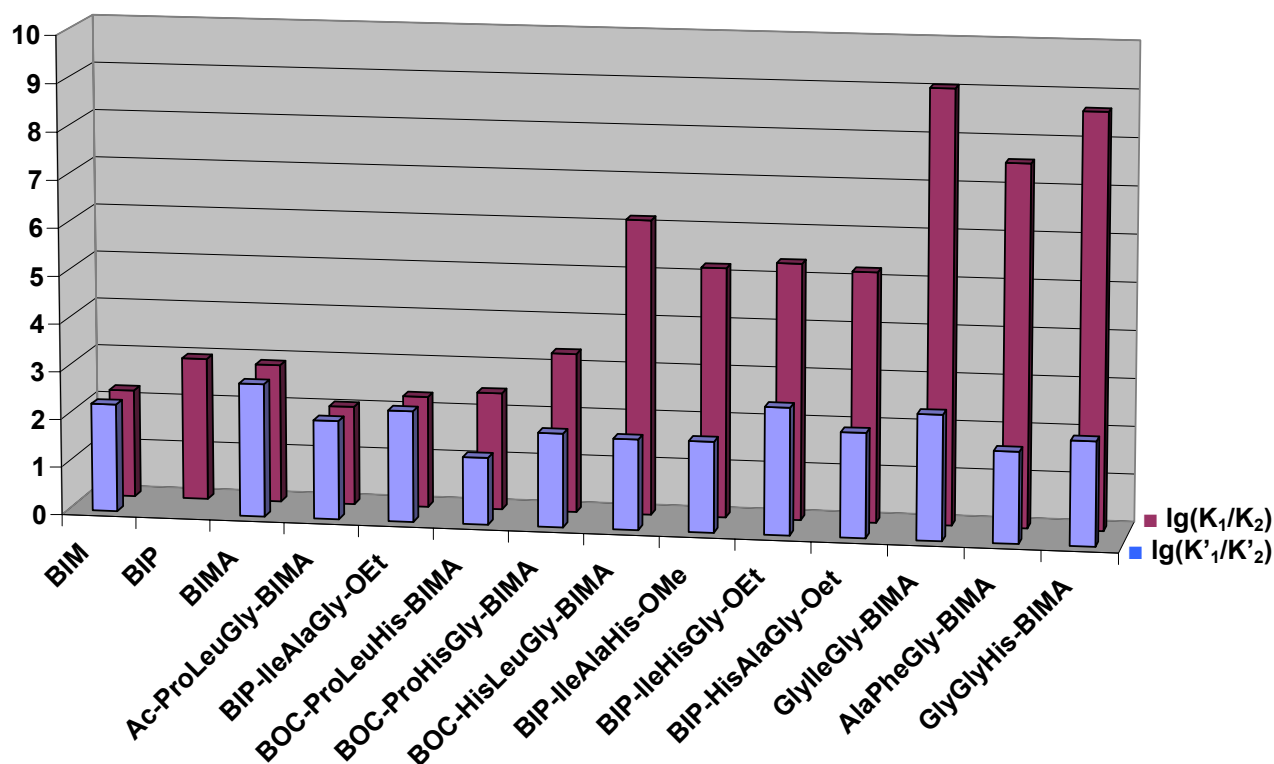
20. ábra A Cu(II)-BIM (a), Cu(II)-His-BIMA (b), Cu(II)-GlyIleGly-BIMA (c) és Cu(II)-PheHis-BIMA (d) 1:2 aránynál felvett ESR spektrumai

Az oldalláncbeli donorcsoportok deprotonálódását követően kialakuló 1:1 és 1:2 összetételű komplexek szerkezete már jelentősen függ az oldallánc hosszától és az oldalláncban jelenlevő

egyéb donorcsoportoktól. A legegyszerűbb származékok, valamint a védett hisztidintartalmú és nemvédett tripeptidszármazékok esetén a deprotonálódást követően is monokomplexek jelenléte mutatható ki (ML és ML_2), amelyek a protonált komplexekhez hasonlóan $\lg(K_1/K_2)$ értékkel ((36) egyenlet) jellemezhetők:

$$\lg(K_1/K_2) = \lg K_1 - \lg K_2 = 2 \cdot \lg \beta(ML) - \lg \beta(ML_2) \quad (36)$$

A $\lg(K'_1/K'_2)$ és $\lg(K_1/K_2)$ értékek összehasonlítása (21. ábra) azonban egyértelműen utal a koordinációs mód változására.

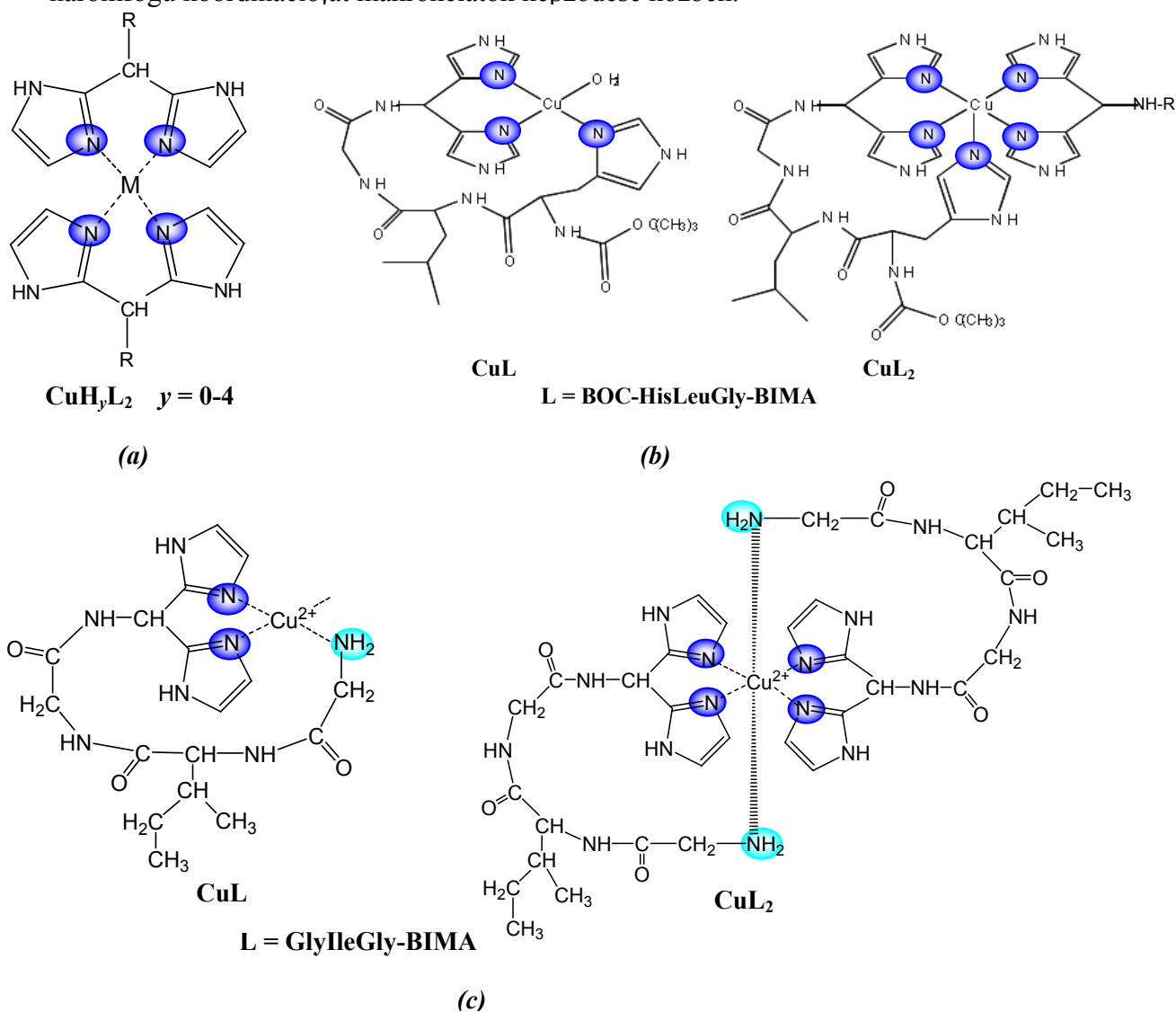


21. ábra A Cu(II)-bis(imidazol-2-il) származékok mono- és bisz-komplexeire jellemző stabilitási állandók ($\lg(K'_1/K'_2)$, $\lg(K_1/K_2)$) aránya a különböző ligandumok esetén

A jelentős növekedés a stabilitási állandók arányában, és a komplexek képződésével párhuzamosan megfigyelhető spektrális változás (az abszorpciós maximum nagyobb hullámhosszak felé tolódása, a $g_{||}$ értékének növekedése, az $A_{||}$ csökkenése) a szimmetrikus szerkezetű szabályos négyzetes geometria torzulására utal, ami az oldalláncban jelenlevő kötődésre képes donorcsoport(ok) koordinációban való részvételével értelmezhető. A karboxilátcsoport gyenge axiális kölcsönhatása feltételezhető a BIP esetén, míg a réz(II)-BIMA CuL_2 komplexében az aminosoport axiális kötődése mutatható ki. Ugyanakkor a

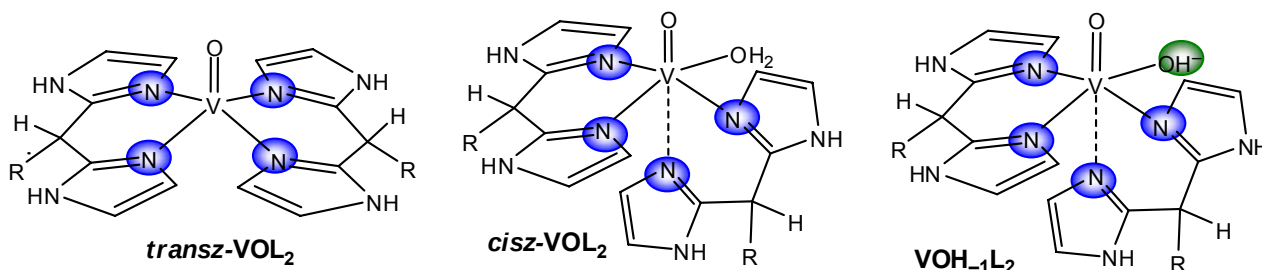
BIMA CuL komplexében az aminocsoport kötődése kizorítja az egyik imidazolgyűrűt az ekvatoriális helyről, annak axiális kölcsönhatása valószínűsíthető.

Az oldalláncban hisztidint tartalmazó védett tripeptidek-származékok esetén a hisztidin imidazolgyűrű koordinációja mutatható ki (22.b ábra). A CuL komplexekben az így kialakuló makrokelát stabilizáló hatása akkor a legnagyobb, ha a hisztidin a legtávolabb van a koordinálódó láncvégi bisz(imidazol-2-il)-csoporttól (BOC-HisLeuGly-BIMA). A nem védett tripeptidszármazékok CuL és CuL₂ komplexében (22.c ábra) pedig a két, illetve négy imidazolnitrogén kötődése mellett az N-terminális aminocsoport axiális koordinációjára lehetett következtetni, mivel a kapcsolódó lánc hossza már lehetővé teszi a ligandum háromfogú koordinációját makrokelátok képződése közben.



22. ábra A két, illetve négy imidazol-koordinációjú mono- és bisz-komplexei lehetséges szerkezetei

A Ni(II)-, Zn(II)- és VO(IV)-ionokkal a Cu(II)-hez hasonlóan 2 és 4 imidazol-koordinációjú komplexek képződését mutattuk ki. A komplexképződési folyamatok azonban nagyobb pH-n játszódnak le, és a keletkező komplexek stabilitása kisebb. Így általában protonált komplexek képződése sem figyelhető meg. Ugyanakkor a nikkel(II) és cink(II)-komplexek oktaéderez geometriája a ligandumok háromfogú koordinációját kedvezményezettebbé teszi, ez mutatható ki pl. a BIMA nikkel(II)- és cink(II)-komplexeiben vagy a védett hisztidintartalmú származékok cink(II)-komplexeiben. A VO(IV) nagy ligandumfelesleget (fémion-ligandum 1:5 arány) tartalmazó rendszerének részletes ESR vizsgálata pedig azt is kimutatta, hogy *cisz*- és *transz*-izomer szerkezetű ML_2 komplexek képződnek közel azonos mennyiségben mind a BIM, mind a védett Z-Gly-BIMA és Z-Ala-BIMA esetén is (23. ábra).



23. ábra A bisz(imidazol-2-il) koordinációjú VO(IV) komplexek szerkezete

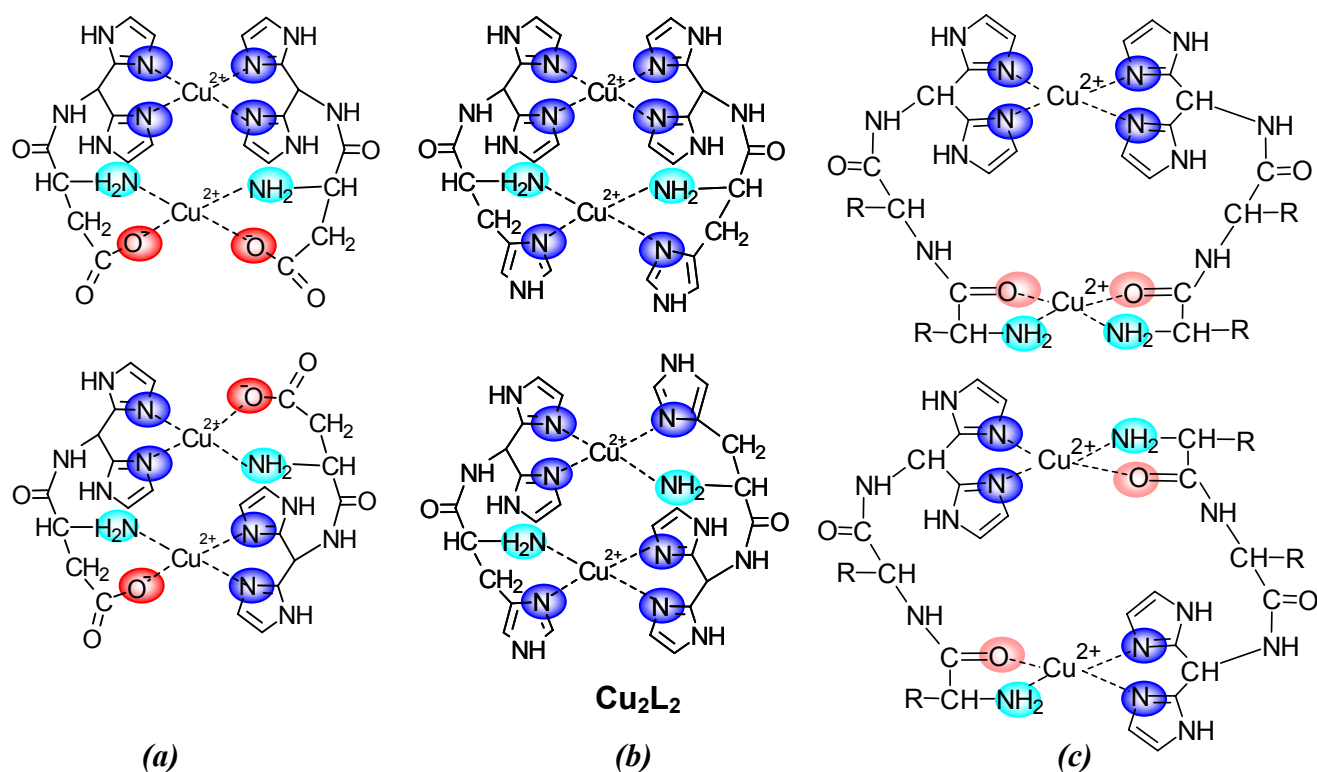
A vizsgálatok azonban azt is bizonyították, hogy a két- illetve négy imidazolgyűrű kötődésével kialakuló komplexek egyik ligandum esetén sem tartják oldatban a fémiont a lúgos tartományban, ez csak akkor valósul meg, ha a fémion körüli koordinációs mód megváltozik.

5.1.3. Ligandumhidas és imidazolhidas kétmagvú komplexek

Az aminosav- és dipeptidszármazékok esetén a bisz(imidazol-2-il) rész és az aminosav-oldalláncbeli donorcsoportok helyzete térbelileg nem kedvező ugyanahhoz a fémionhoz történő koordinációhoz. Ugyanakkor a molekulában két egymástól elkülönült fémkötőhely van, így az N-terminális részen levő α -aszparaginsav, illetve γ -glutaminsav (NH_2, COO^-) koordinációval, a hisztidin hisztaminszerű koordinációval képes egy újabb réz(II)ionhoz kötődni kétmagvú ligandumhidas Cu_2L_2 összetételű komplexeket eredményezve az α -Asp-BIMA, γ -Glu-BIMA, His-BIMA és HisPhe-BIMA ligandumok jelenlétében.

Ugyancsak ilyen összetételű komplexek megjelenése figyelhető meg az oldalláncban koordinálódó donorcsoportot nem tartalmazó dipeptidszármazékok esetén is, ahol az (NH_2, CO) donorcsoportok képesek a második fémion megkötésére. Valamennyi esetben a

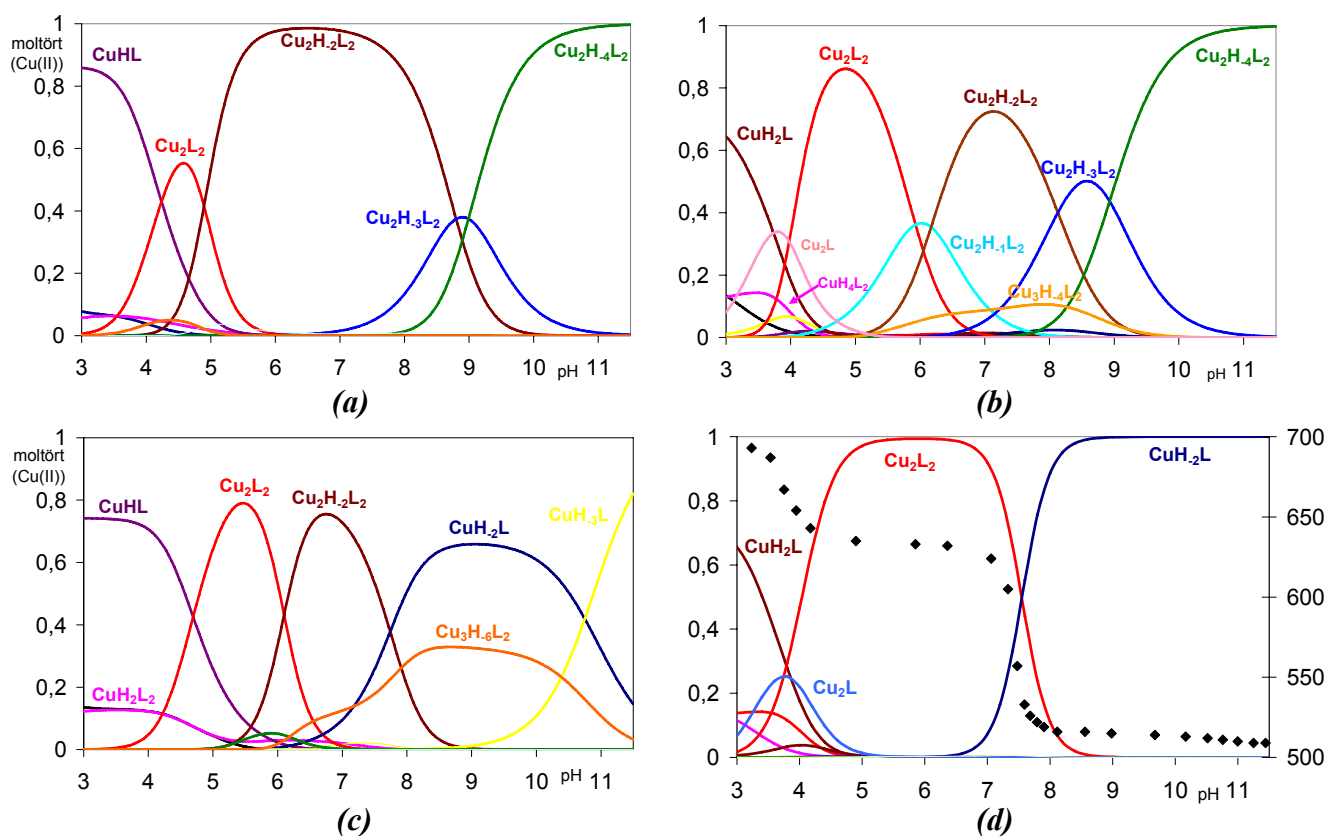
réz(II)ion négy ekvatoriális kötőhelye telített, a koordinálódó donorcsoportok szimmetrikus ($2x(\text{Im}(\text{N}), \text{Im}(\text{N}) + 2x(\text{NH}_2, \text{X}))$) és nem szimmetrikus ($2x[(\text{Im}(\text{N}), \text{Im}(\text{N})) + (\text{NH}_2, \text{X})]$) elrendeződésével többféle izomer szerkezet kialakulására van lehetőség (24. ábra). Ezek a komplexek ekvimoláris oldatban gyengén savas tartományban jelennek meg, ezt szemlélteti a két példaként bemutatott eloszlási görbe is (25. ábra)



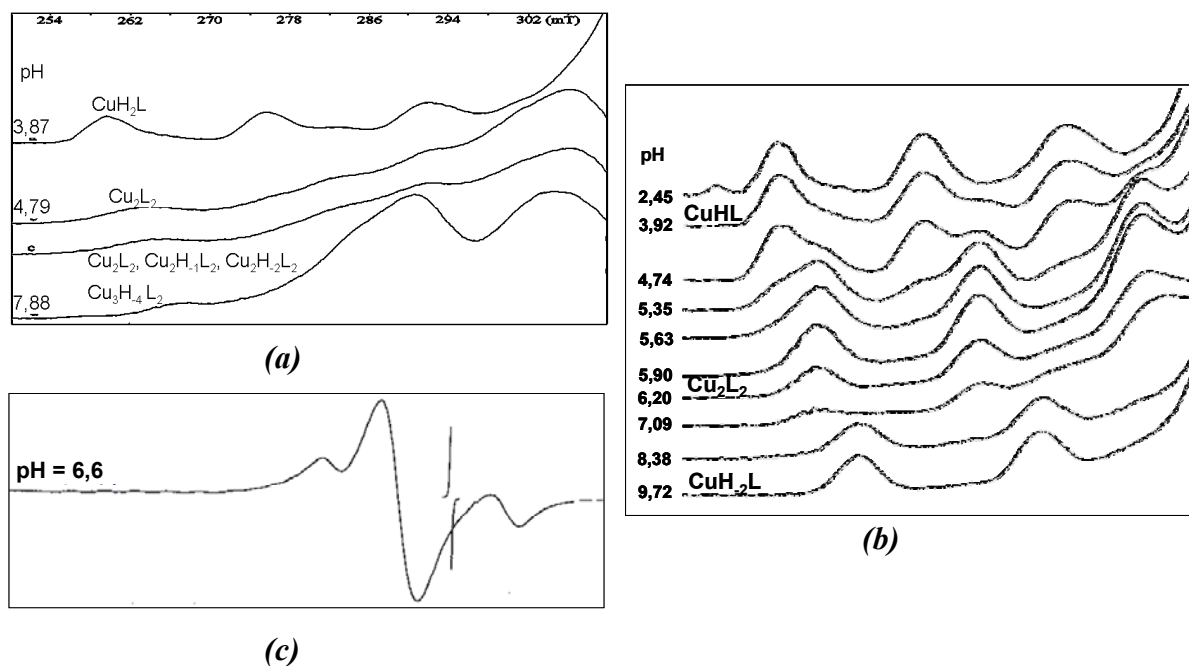
24. ábra A ligandumhidas Cu₂L₂ komplexek sematikus szerkezete

L = α-Asp-BIMA (a), His-BIMA (b), XaaYaa-BIMA (Xaa, Yaa = Leu, Gly vagy Phe) (c)

Az ESR spektrumokban a jelek szélesedése figyelhető meg (26.a, b ábra). Ez egyrészt a többféle izomer komplexek egyidejű jelenlétét, másrészt a két réz(II)ion kötődését a komplexben támasztja alá, bár a Cu-Cu távolság viszonylag nagy, így a teljes spinkicserélődés nem valósul meg. Az izomerek arányára a spektrum rossz felbonthatósága miatt nem következtethetünk, de az a korábbi tapasztalat, mely szerint a vegyes komplexek képződése aromás és alifás nitrogén donoratomokat tartalmazó ligandumok esetén nem kedvezményezett,¹⁴⁰ a szimmetrikus szerkezetek nagyobb arányát valószínűsíti.



25. ábra A Cu(II)- α -Asp-BIMA (**a**), Cu(II)-His-BIMA (**b**), Cu(II)-LeuGly-BIMA (**c**) és Cu(II)-HisPhe-BIMA (**d**) ekvimoláris oldatában képződő komplexek eloszlása a pH függvényében ($c(\text{Cu(II)}) = c(\text{L}) = 4,00 \text{ mmol/dm}^3$). A (**d**) ábrán az ekvimoláris oldatban felvett spektrumok abszorpciós maximuma (λ_{max}) is szerepel a pH függvényében

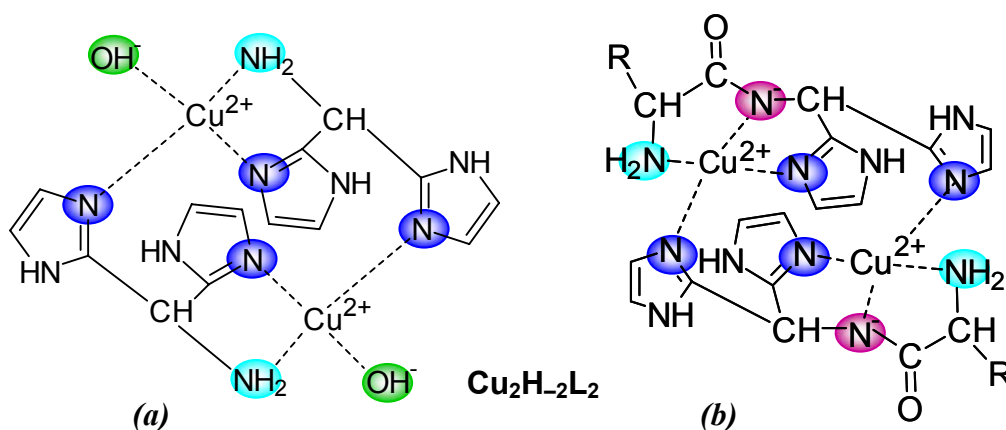


26. ábra A Cu(II)-His-BIMA **(a)**, PheGly-BIMA **(b)** és Phe-BIMA **(c)** 1:1 arányánál különböző pH-kon felvett ESR spektrumai

Az N-terminális részen levő amino- és egyéb donorcsoportok mellett azonban a peptidváz amid nitrogénatomjai is kötőhelyet jelentenek a fémionok, elsősorban a réz(II)ion számára. A védett tripeptidszármazékokkal ellentétben a terminális aminocsoport horgonycsoportként viselkedik és a pH 6 felett lejátszódó deprotonálódási folyamatok az amidnitrogén(ek) deprotonálódásának felelnek meg. Az oldalláncban koordinálódó donorcsoportot nem tartalmazó dipeptidszármazékok esetén ez a folyamat nem bontja meg a ligandumhidas szerkezetet, a keletkező $\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2$ komplexben a réz(II)ionok ($\text{Im}(\text{N}), \text{Im}(\text{N})$) és $(\text{NH}_2, \text{N}^-)$ donoregységekhez kötődnek szimmetrikus és aszimmetrikus elrendeződésű izomer komplexekben. Az ESR spektrumban továbbra is megfigyelhető szuperhiperfinom felhasadás (26.b ábra, pH = 7,09-nél felvett spektrum) ebben az esetben is a szimmetrikus elrendeződés kedvezményezettségét támasztja alá.

Az aminosav-származékok esetén az amidnitrogén deprotonálódása és koordinálódása kedvezővé teszi az egyik imidazolgyűrű kötődését is, az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N}))$ koordinációval (5,5)-tagú csatolt kelátgyűrű alakul ki, ami hasonló a GlyHis-szerű koordinációhoz. Ez azt jelenti, hogy az amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja megbontja a bisz(imidazol-2-il)-szerű koordinációt, a fémion koordinálásában csak az egyik aromás nitrogénatom vesz részt.

Ha a koordinációs szférából kiszorul az egyik imidazolcsoport, ez potenciális kötőhelyet jelent egy másik fémion számára. Így lehetőség van olyan többmagvú szerkezetek kialakulására is, amelyben az imidazolgyűrű tölti be a híd szerepét. Ilyen szerkezetet már a BIMA réz(II)-komplexeinél is kimutattunk, lúgos pH tartományban, ekvimoláris oldatban.



27. ábra Imidazolhidas kétmagvú $\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2$ komplexek sematikus szerkezete
L = BIMA (a), Xaa-BIMA (Xaa = Gly, Phe, α -Asp, α -Glu, His) (b)

A BIMA $\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2$ (27.a ábra) összetételű komplexében az egyik imidazolgyűrű és az aminocsoport ekvatoriális kötődése valósul meg, a fémion harmadik koordinációs helyét egy

hidroxocsoport foglalja el, míg a bisz(imidazol-2-il)-csoport másik imidazolgyűrűje hídként kapcsolódik egy másik ugyanilyen koordinációjú fémionhoz, telítve annak koordinációs szféráját.

Ugyancsak imidazolhidas kétmagvú szerkezetek képződése volt megfigyelhető az aminosav-BIMA származékok fentebb említett $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N}))$ koordinációjú réz(II)-komplexei esetén is, ahol a kettős kelát által elfoglalt három koordinációs hely mellett a fémion negyedik helyére egy másik ugyanilyen egység kötődik a szabadon maradt imidazolnitrogén donoratomon keresztül, $\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2$ (27.b ábra) összetételt eredményezve. A kétmagvú imidazolhidas komplexek képződését és szerkezetét a spektrális paraméterek egyértelműen bizonyítják valamennyi vizsgált α -aminosav-BIMA-származék esetén. Az abszorpciós maximum 590 nm körüli értéke az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N})) + \text{Im}(\text{N})$ donorcsoportok koordinációjának, a komplexre jellemző ESR spektrum pedig a réz(II) dimer(II) komplexeknek felel meg.¹⁴¹ Az ESR spektrumban a $\Delta M = 1$ -hez tartozó merőleges tartományban két-két éles csúcsot kapunk $g \sim 2$ értéknél, amelyekből a Stevens egyenlet ((24) egyenlet) segítségével a komplexekben a réz–réz távolság is kiszámítható volt (4. táblázat). A kapott adatok alapján az is megállapítható, hogy az eltérő oldalláncú ligandumok esetén keletkező komplexek szerkezete azonos, azaz a nagyobb térkitöltésű oldalláncoknak nincs hatása a dimer komplex szerkezetére. Eltérés a β -Ala-BIMA esetén figyelhető meg, ahol az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N}))$ koordinációval (6,5)-tagú csatolt kelát alakul ki, ami magyarázza a nagyobb Cu-Cu távolságot.

4. táblázat Az aminosav-BIMA származékok $\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2$ és $\text{Cu}_2\text{H}_4\text{L}_2$ komplexeinek jellemző paraméterei

		Gly-BIMA	β -Ala-BIMA	α -Asp-BIMA	α -Glu-BIMA	His-BIMA
$\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2$	λ_{max} [nm]	595	564	591	589	592
	Cu-Cu távolság [pm]	390	414	393	393	397
$\text{Cu}_2\text{H}_4\text{L}_2$	λ_{max} [nm]			567	562	565
	Cu-Cu távolság [pm]			386	385	384

A nikkel(II)-, cink(II)- és VO(V)-ionok esetén néhány esetben vizsgáltuk a komplexképződési folyamatokat. Ligandumhidas kétmagvú szerkezetet csak az erősen koordinálódó donorcsoportot tartalmazó His-BIMA nikkel(II)ionokkal alkotott komplexeiben mutattunk ki, a gyengén kötődő karboxilát-, illetve karbonil-O jelenléte ilyen szerkezetű komplexek képződését nem tette lehetővé sem az aminosav-, sem a dipeptidszármazékok

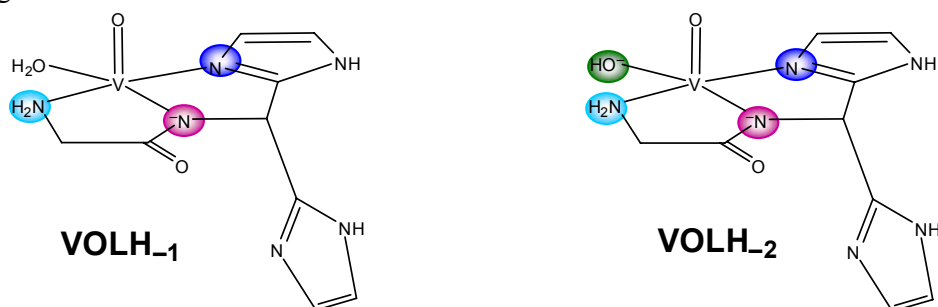
esetén. Cink(II)- és VO(IV)-ionok jelenlétében a fémion hidrolízise valamennyi esetben megakadályozta a ligandumhidas komplexek kialakulását.

A terminális aminos csoport horgonycsoportként való viselkedése azonban nikkell(II)ionok esetén is indukálja az amidnitrogén deprotonálódását és koordinálódását és ez a Gly-BIMA esetén a Cu(II)-komplexekhez hasonló imidazolhidas kétmagvú komplex képződéséhez vezet. Ezzel párhuzamosan spektrális változás is megfigyelhető, a síknégyzetes geometriára jellemzően 448 nm-nél megjelenik egy újabb abszorpciós sáv. A síknégyzetes nikkell(II)-komplexeinél lehetőség lenne a szerkezet ^1H NMR vizsgálatára is, azonban a jelek kiszélesedése azt mutatta, hogy mind a $\text{Ni}_2\text{H}_2\text{L}_2$ komplex, mind a nagyobb pH-n megjelenő NiH_2L vegyes hidroxó komplexekben is oktaéderes–síknégyzetes egyensúlyi geometria valósul meg. A Phe-BIMA és a His-BIMA ligandumok esetén – bár az amidnitrogén deprotonálódása és koordinálódása nikkell(II) jelenlétében feltételezhető – az egyszerű peptidekhez képest ezek a folyamatok nagyobb pH-n játszódnak le, és minden esetben átfedésben vannak a fémion hidrolízisével, így az imidazolhidas $\text{Ni}_2\text{H}_2\text{L}_2$ komplexek jelenlétét nem tudtuk kimutatni.

Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy a cink(II)-Gly-BIMA rendszerben, hasonlóan a réz(II)- és nikkell(II)-ionokat tartalmazó rendszerekhez, egy extra lúgfogyasztó folyamat figyelhető meg a titrálás során, ami az amidnitrogén deprotonálódásához rendelhető és a másik két fémionnal való analógia alapján az imidazolhidas $\text{Zn}_2\text{H}_2\text{L}_2$ komplex képződésére következtettünk. Ezt az a tény is indokolja, hogy a komplex keletkezése abban a pH tartományban játszódik le, ahol a szabad cink(II)ion már hidrolizálna, a hidrolízist pedig valószínűleg jobban gátolja a cink körüli telítettebb koordinációs szerkezet, azaz a kétmagvú komplex képződése. Ez összhangban áll azzal a korábbi eredménnyel, mely szerint a cink(II) a GlyHis dipeptidben is képes elősegíteni a peptidnitrogén deprotonálódását⁴⁷ és a cink(II) körüli $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N}))$ (5,6)-tagú csatolt kettős keláthoz hasonlóan a Gly-BIMA komplexében is $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N}))$ (5,5)-tagú csatolt kettős kelátrendszer alakul ki, megakadályozva a fémion hidrolízisét.

Ugyancsak az amidnitrogén deprotonálódása és koordinálódása volt kimutatható (ötszörös ligandumfelesleget tartalmazó oldatban) a VO(IV)-Gly-BIMA, α -Asp-BIMA, α -Glu-BIMA és His-BIMA rendszerekben is, amely – ellentétben a Cu(II)-komplexekkel – monomer VOH_2L és VOH_2L összetételű komplexek képződéséhez vezet (28. ábra). A keletkező komplexek szerkezetét az UV-látható és ESR vizsgálatok is alátámasztották. Ezek az eredmények azért is érdekesek, mert általában nem jellemző a VO(IV)-peptid rendszerekre

az amidnitrogének deprotonálódása és részvétele a fémionmegkötésben, ilyen folyamatot csak a fenolát- O^- vagy tiolát- S^- jelenlétében sikerült korábban kimutatni nagy ligandumfeleslegnél.¹⁴²

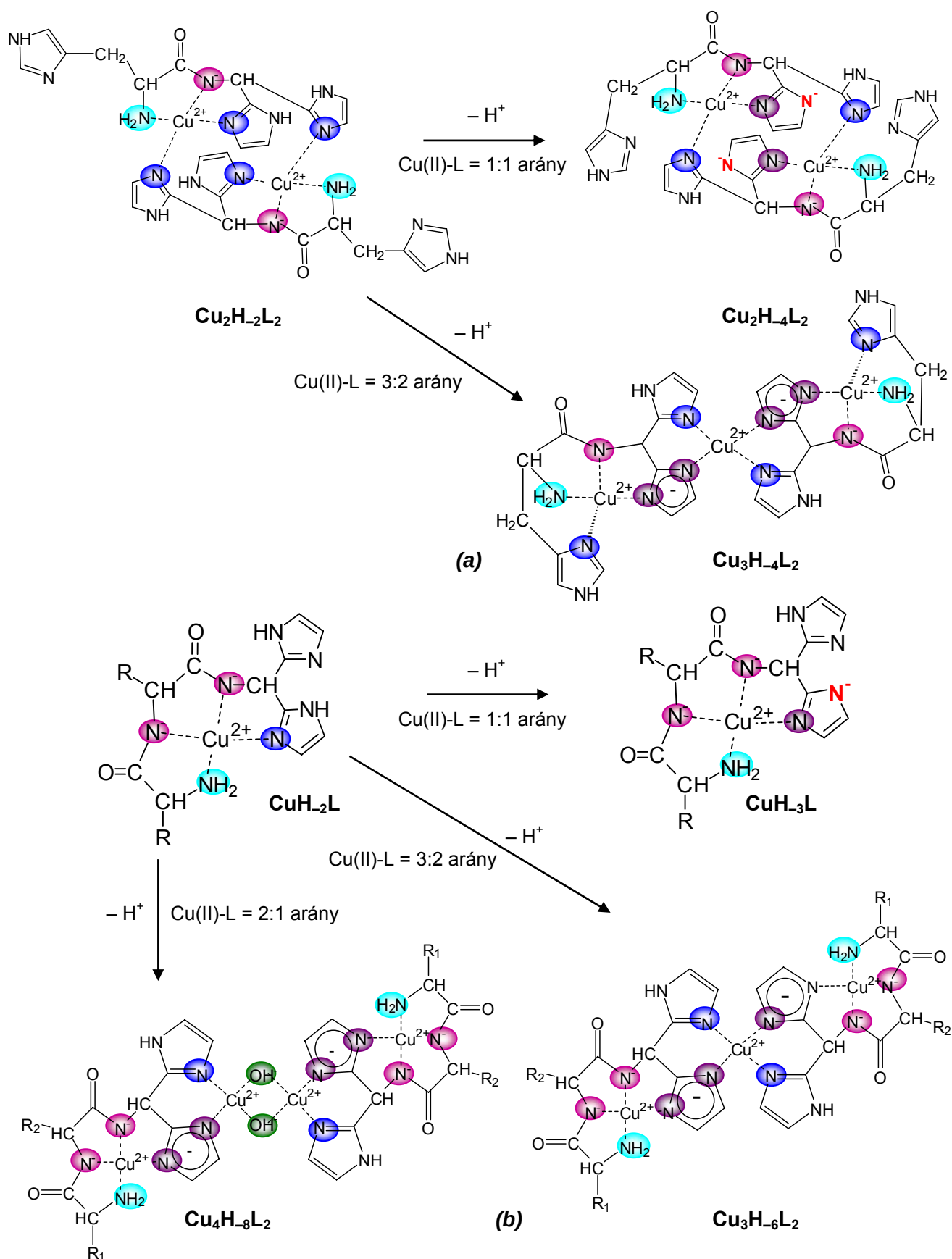


28. ábra A peptidszerű koordinációjú VO(IV) komplexek szerkezete

5.1.4. Imidazoláto-hidas többmagvú komplexek

A Cu(II)- α -aminosav-BIMA rendszerekben az amidnitrogén deprotonálódását követően újabb lúgfogyasztó folyamatokat detektáltunk. Ez a folyamat a Gly-BIMA és a Phe-BIMA esetén vegyes hidroxó komplexek képződéséhez rendelhető, melyet követően $(CuH_2L)_n$ összetételű komplexek képződnek. A spektrofotometriás és ESR spektroszkópiás adatok alapján ez a Gly-BIMA esetén egy torzult geometriájú, ötös koordinációjú, valószínűleg imidazolhidas polimer szerkezet, míg a Phe-BIMA esetén monomer komplex képződését jelenti. Ez utóbbi esetben a feniloldallánc és a koordinált imidazolcsoport közötti stacking kölcsönhatás akadályozza a többmagvú szerkezet létrejöttét.

Az oldalláncban koordinálódó donoresoportot tartalmazó aminosav-származékok esetén az újabb lúgfogyasztó folyamat más komplexek képződéséhez rendelhető. A kétmagvú szerkezetben a kötődő imidazolgyűrű N(1)H csoportjának deprotonálódását igazolják a spektroszkópiás adatok. Ez az α -Asp-BIMA, α -Glu-BIMA és His-BIMA esetén $Cu_2H_3L_2$, illetve $Cu_2H_4L_2$ komplexek (29.a ábra) megjelenését eredményezi a lúgos pH-tartományban. A komplex képződésével párhuzamosan az abszorpciós spektrumban kék eltolódást (λ_{max} csökkenést) (4. táblázat) figyelhetünk meg, amely alapján a hidrolízist kizárhatjuk. Így ez a spektrális változás az irodalmi előzmények⁴⁸ alapján a töltéssel rendelkező nitrogén koordinációját valószínűsíti. Ezzel párhuzamosan az ESR spektrumban is újabb kétmagvú részecske detektálható pH 10 felett (26.a ábra). A spektrumból számított Cu-Cu távolság (4. táblázat) a $Cu_2H_2L_2$ összetételű komplexben számítottéhoz képest csekély csökkenést mutat, ami szintén azt támasztja alá, hogy bár hasonló a réz(II)ionok koordinációs környezete, az eltérés a koordinálódott imidazolgyűrűben levő N(1)H csoport deprotonálódásának köszönhető.



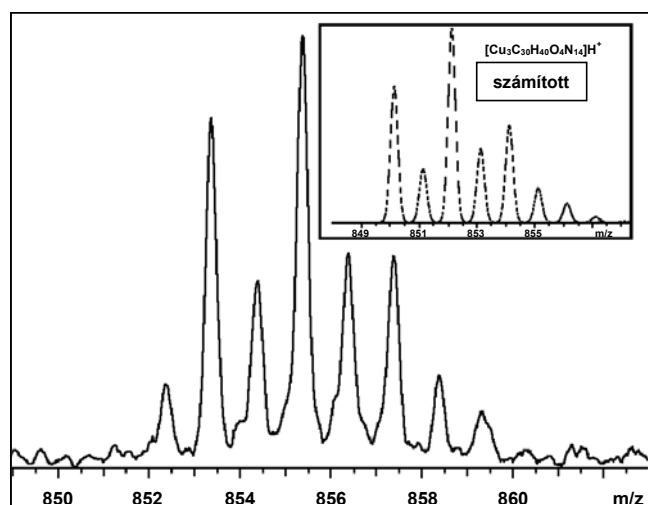
29. ábra Az imidazolato-hidas komplexek sematikus szerkezete a His-BIMA (a) és a XaYaa-BIMA (Xaa, Yaa = Gly, Leu) ligandumok esetén

Ez a deprotonálódott és így koordinálódásra képes N(1) donoratom a másik imidazolgyűrűvel újabb fémionkötőhelyet hoz létre, ennek következtében fémionfelesleg jelenlétében (3:2 fémion-ligandum arány) egy hárommagvú $\text{Cu}_3\text{H}_4\text{L}_2$ összetételű komplex (29.a ábra) keletkezik, ami uralkodó a fiziológiás és lúgos pH tartományban (30.a ábra). A keletkező komplexhez viszonylag széles abszorpciós maximum tartozik a $\lambda_{\text{max}} = 583 \text{ nm}$ hullámhossznál, ami az eltérő környezetben levő réz(II)ionok jelenlétére utal. Az ESR spektrum jelei kiszélesednek, ami azt tükrözi, hogy a fémionok között dipoláris kölcsönhatás van. Ellentétben az oldalláncban karboxilát-, illetve hiszitin imidazolgyűrűt tartalmazó aminosav-BIMA származékokkal, a Gly-BIMA és Phe-BIMA esetén ezeket a folyamatokat nem tapasztaltuk, ami arra enged következtetni, hogy az oldalláncbeli csoportok gyenge axiális kölcsönhatása megvédi a fémiont a hidrolízistől.

Az oldalláncban koordinálódó donorcsoportot nem tartalmazó dipeptidszármazékok esetén a szabad terminális aminocsoport jelenléte pH 6 fölött elősegíti a peptidnitrogén donoratomok deprotonálódását. Míg az első lépésben lezajló deprotonálódási folyamat nem bontja meg a molekula két terminális részének kötődésével létrejövő kétmagvú szerkezeteket, addig a második amidnitrogén deprotonálódása már a réz(II) körül a koordinációs mód átrendeződését eredményezi, az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N}))$ donorcsoportok peptidszerű kötődéssel CuH_2L egymagvú komplexek kialakulásához vezetnek (29.b ábra). Ez a koordinációs mód analóg a GlyGlyHis-szerű koordinációval azzal a különbséggel, hogy míg az előbbinél (5,5,5)-tagú, addig az utóbbinál (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer alakul ki. Ez a kötődés a dipeptid-BIMA származékok réz(II) komplexeiben kedvezményezetté teszi a koordinálódott imidazol N(1)H csoportjának deprotonálódását már a mérhető pH tartományban.

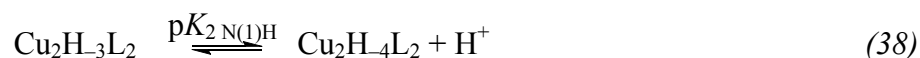
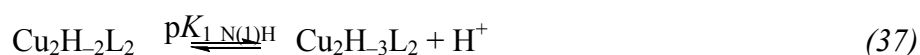
Ez a deprotonálódott N(1) donoratom a másik, nem kötődő imidazol N(3) donoratommal együtt – hasonlóan az aminosav-BIMA származékokhoz – újabb fémion kötésére alkalmas helyet teremt, amely a fémion-ligandum aránytól függően különböző többmagvú komplexek képződését eredményezi. Ezek közül jelentős mennyiségben 3:2 fémion-ligandum aránynál a $\text{Cu}_3\text{H}_6\text{L}_2$ összetételű komplex, 2:1 fémion-ligandum aránynál a $\text{Cu}_4\text{H}_8\text{L}_2$ összetételű vegyes hidroxó komplex keletkezik, amelyek sematikus szerkezetét a 29.b ábra mutatja be. A hárommagvú komplex jelenlétét az enyhén lúgos tartományban a tömegspektroszkópiás vizsgálatok is alátámasztották. A 30. ábra a GlyLeu-BIMA 3:2 réz(II)-ligandum rendszerében pH ~ 8 körül felvett MALDI-TOF-MS spektrumát mutatja be. A spektrum izotópeloszlását összehasonlítva az 1,2,3... réz esetén számolt izotópeloszlással, a

spektrum egyértelműen három rézion jelenlétét mutatja a komplexben. Emellett a mért és a feltételezett molekulára számolt moláris tömeg is megegyezett a mérés hibahatárán belül.



30. ábra A Cu(II)-GlyLeu-BIMA rendszerben 3:2 fémion-ligandum arány esetén kialakuló $\text{Cu}_3\text{H}_6\text{L}_2$ komplex (molekulaion: $[\text{Cu}_3\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{O}_4\text{N}_{14}]\text{H}^+$) mért MALDI-TOF-MS spektrumának izotópeloszlása (nagy ábra), valamint az erre a molekulaióra számított izotópeloszlás (kis ábra)

Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy az aminosav- és dipeptid-BIMA származékok esetén réz(II) jelenlétében még a mérhető pH tartományban lejátszódik a koordinálódott imidazolgyűrű N(1)H csoportjának deprotonálódása. A meghatározott pK értékek az aminosav-származékok esetén a (37), (38) egyensúlyokra, a dipeptid-származékok esetén pedig a (39) egyensúlyra jellemzők:

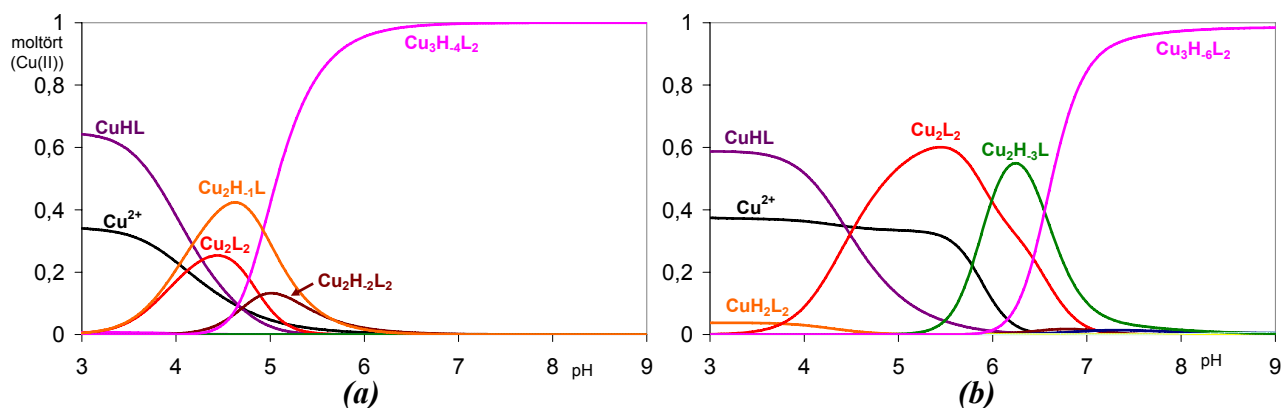


A pK értékeket az 6. táblázat tartalmazza összehasonlítva korábban más ligandumokra meghatározott értékekkel.

6. táblázat Az imidazol N(1)H csoportjának jellemző deprotonálódási értékei a különböző BIMA és hisztidin-származékok esetén

	α -Asp-BIMA	α -Glu-BIMA	His-BIMA	GlyLeu-BIMA	LeuGly-BIMA	PheGly-BIMA	His ¹⁴³	GlyHis ⁴⁸
$pK_{1\text{N(1)H}}$	8,80	8,44	8,13	10,69	10,75	10,51	11,7	9,6
$pK_{2\text{N(1)H}}$	8,99	8,97	8,93					

A táblázat adatai jól tükrözik, hogy ez a folyamat különösen kedvező az aminosav-BIMA származékok 1:1 összetételű kétmagvú komplexei esetén. Ez a folyamat azonban a fentiekhez képest is szokatlanul kis pH-n játszódik le a fémion felesleget tartalmazó rendszerekben, a deprotonálódás és a hárommagvú komplexek képződése már pH 6 felett kimutatható mind a két típusú ligandum 3:2 fémion-ligandum arányú rendszerében (31. ábra).



31. ábra A Cu(II)- α -Asp-BIMA **(a)** és Cu(II)-GlyLeu-BIMA **(b)** 3:2 fémion-ligandum arányú oldatában képződő komplexek eloszlása a pH függvényében ($c(\text{Cu(II)}) = 6,00 \text{ mmol/dm}^3$, $c(\text{L}) = 4,00 \text{ mmol/dm}^3$).

Ugyancsak hangsúlyozni kell ezen komplexek szerkezetével kapcsolatban, hogy az imidazolgyűrű deprotonálódott N(1) csoportja kötődve egy másik réz(II)ionhoz, hídként kapcsol össze két fémiont. Ilyen imidazolato-hidas szerkezet jellemzi a CuZnSOD enzim aktív centrumát, ahol a Cu(II)- és Zn(II)-ionok között alakul ki hasonló kötémód. Ezek alapján a bisz(imidazol-2-il) csoport aminosav- és dipeptid-származékainak ezen hárommagvú, imidazolato-hidas komplexe potenciális szerkezeti modellje a CuZnSOD enzimnek.

Nikkel(II)-, cink(II)- és VO(IV)-ionok jelenlétében az imidazol N(1)H csoportjának deprotonálódása egyik esetben sem figyelhető meg. Bár a His-BIMA fémionfeleslegnél képes két nikkel(II)iont megkötni a fiziológiás pH tartományban, ez a szerkezet nagyobb pH-n nem stabilis és pH 7 felett hidrolízis és csapadékképződés tapasztalható.

A Ni(II)-dipeptid-BIMA rendszerekben ugyancsak képződnek a fémion-ligandum aránytól függően egymagvú NiH_2L , illetve kétmagvú $\text{Ni}_2\text{H}_3\text{L}$, NiH_4L összetételű komplexek, amelyekben a ligandum peptidszerű kötődése valósul meg, ezt követően a pH emelése vegyes hidroxokomplexek képződéséhez és csapadékkiváláshoz vezet.

Cink(II)ionok esetén a Gly-BIMA rendszer kivételével az amidnitrogén deprotonálódást sem tudtuk kimutatni a fent bemutatott ligandumoknál, a bisz(imidazol-2-il)

koordinációjú komplexek képződését a pH emelésével hidroxokomplexek képződése és csapadékkiválás követi.

5.1.5. A peptidlánc koordinációjának szerepe a bisz(imidazol-2-il) származékok komplexképződési folyamataiban

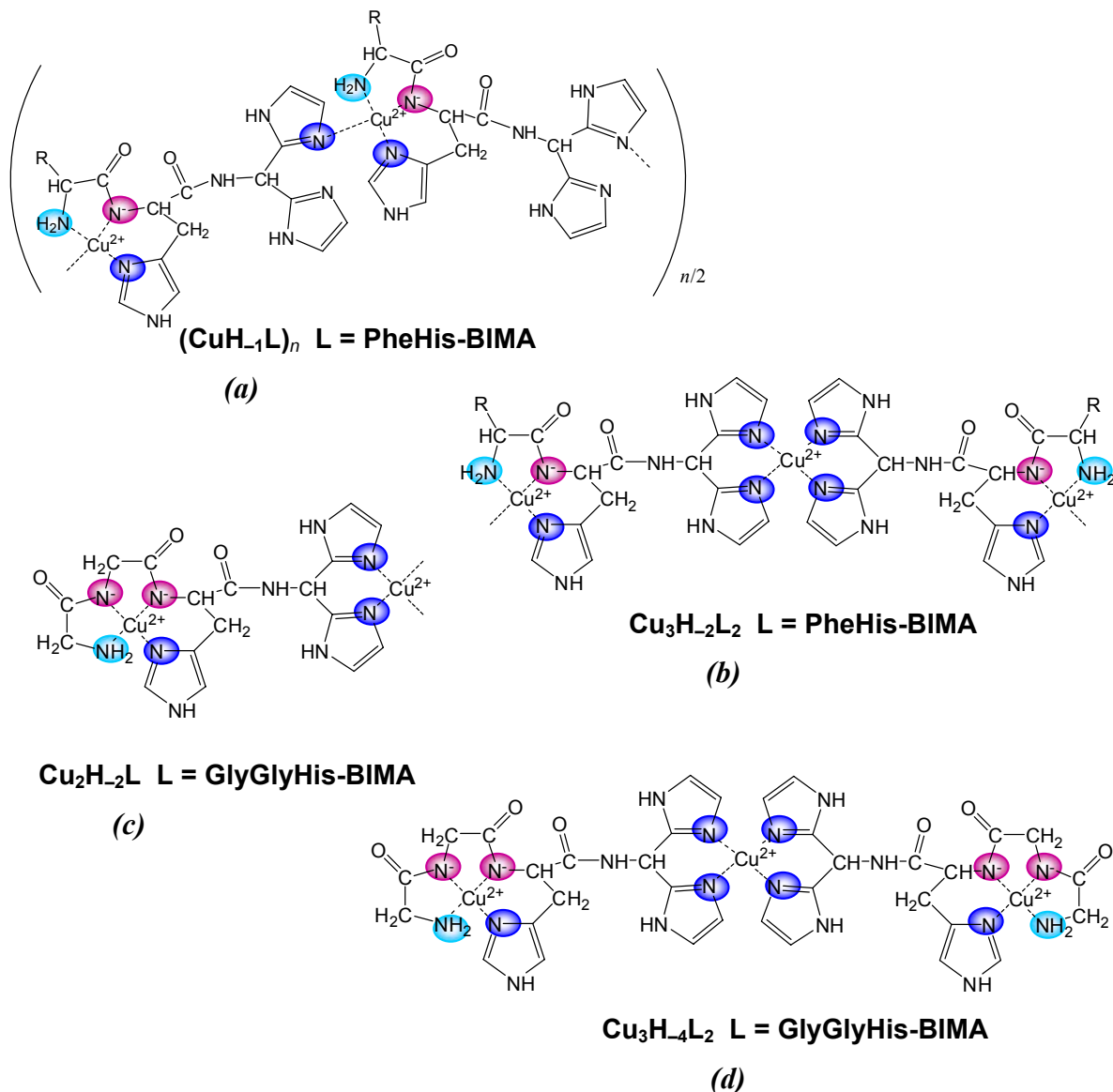
A bisz(imidazol-2-il)-csoportot tartalmazó ligandumok fentiekben bemutatott komplexképződési folyamataira alapvetően jellemző, hogy a bisz(imidazol-2-il)-csoport egy vagy mindkét imidazolgyűrűje szerepet játszik a fémion megkötésében, és savas tartományban meghatározó az (Im(N),Im(N)) koordináció, míg a pH emelésével, az amidnitrogének deprotonálódását követően a kapcsolódó aminosav- vagy peptidlánc is részt vesz a fémion megkötésében és az (NH₂,N⁻,Im(N)) vagy (NH₂,N⁻,N⁻,Im(N)) koordinációs mód a jellemző.

A bisz(imidazol-2-il)-csoporthoz kapcsolódó láncban levő hisztidin és/vagy a peptidlánc hosszának növelése azonban egyre meghatározóbbá teszi a peptidszerű koordinációt a komplexképződési folyamatokban. A ligandumokban két elkülönült kötőhelyet jelent a peptidlánc és a bisz(imidazol-2-il)-rész, ami révén tovább növekedik a különböző összetételű és koordinációs módú komplexek száma. Az alifás tripeptidláncot tartalmazó két származék esetén az amidnitrogének deprotonálódását követően többféle 1:1 összetételű és többmagvú részecske kialakulása feltételezhető, de a komplexek összetételének és szerkezetének pontos meghatározását nehezíti a keletkező komplexek viszonylag rossz oldhatósága. A spektrális adatok alapján a 3:2 fémion-ligandum arányú oldatban gyengén lúgos tartományban keletkező Cu₃H₄L₂ összetételű komplex valószínűsíthető, ahol a két réz(II)ion (NH₂,N⁻,N⁻) koordinációval kötődik a peptidlánchoz, míg a harmadik fémion bisz(imidazol-2-il) koordinációval kapcsolja össze a két egységet.

Még inkább előtérbe kerül a peptidlánc koordinációja azokban a származékokban, ahol a peptidlánc első (HisPhe-BIMA), második (PheHis-BIMA) vagy harmadik helyén (GlyGlyHis-BIMA) hisztidin található. Az N-terminális hisztidint tartalmazó bisz(imidazol-2-il) származék esetén már az imidazolhidas szerkezetek bemutatásánál említettem, hogy a hisztaminszerű és bisz(imidazol-2-il)-szerű koordinációval stabilis Cu₂L₂ összetételű komplexek keletkeznek. Ennek a komplexnek a stabilitása kiugró a hasonló összetételű, de (NH₂,COO⁻) vagy (NH₂,CO) koordinációs módú komplexekhez képest, amit jól tükröz a 25.c és 25.d ábra közötti különbség. A hisztaminszerű koordinációt tartalmazó komplex széles pH tartományban uralkodó részecske, és akadályozza az amidnitrogének deprotonálódását és koordinálódását. Ez csak nagyobb pH-n és kooperatív módon játszódik le, a keletkező CuH₂L

a többi dipeptid-BIMA-nál azonosított szerkezetű. További deprotonálódási folyamatokat és többmagvú komplexek képződését azonban nem tudtuk kimutatni.

A második helyen hisztidint tartalmazó származék esetén az amidnitrogén deprotonálódását és koordinálódását követően a megjelenő $\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2$ vagy $(\text{CuH}_{-1}\text{L})_n$ összetételű komplex képződik, amelyben a molekula GlyHis-szerű koordinációval kötődik a fémionhoz, és a szabadon maradt negyedik koordinációs helyre egy másik egység szabadon maradt imidazolgyűrűje kapcsolódik polimer szerkezetet kialakítva (32.a ábra).



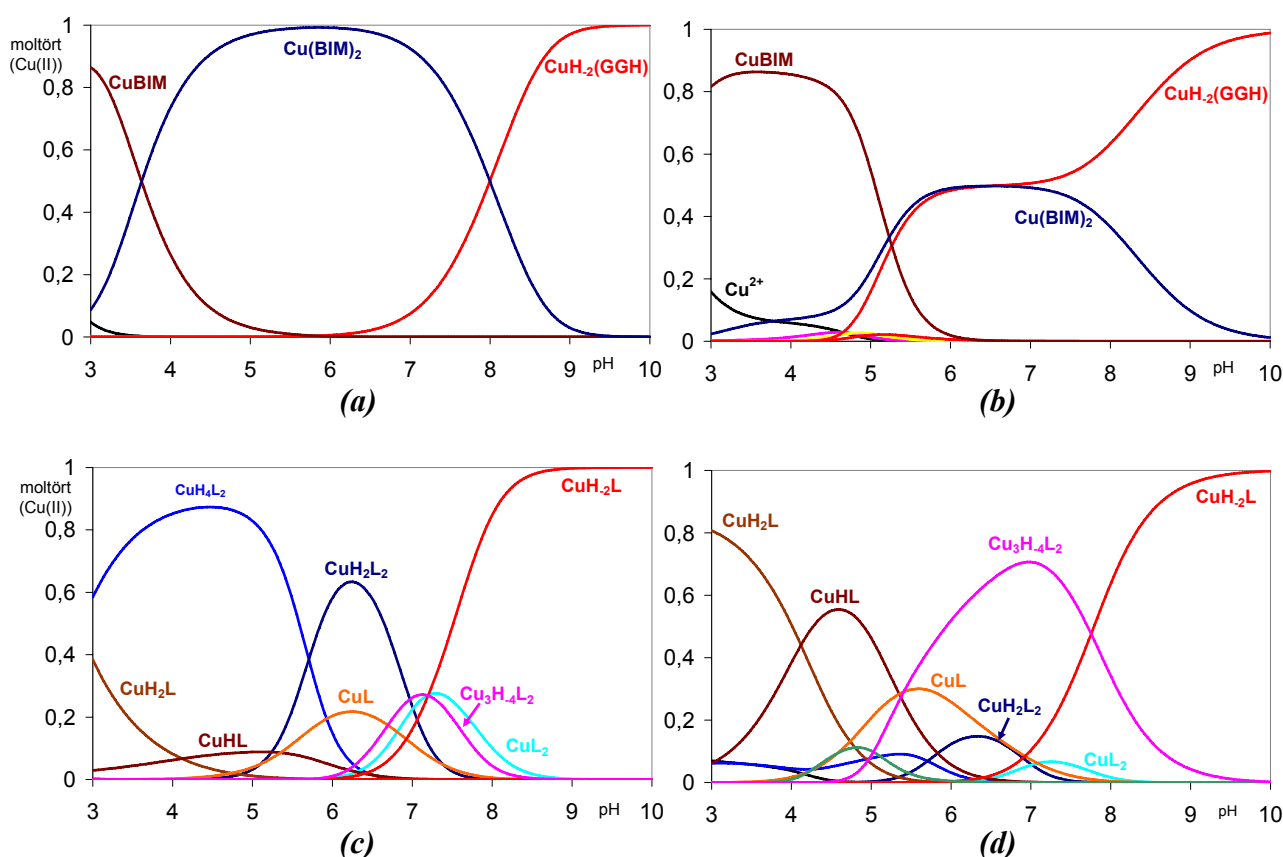
32. ábra A hisztidint tartalmazó peptidszármazékok néhány komplexének sematikus szerkezete

A további vizsgálatokat megnehezíti a keletkező komplex rossz oldhatósága, de a ligandumfelesleg esetén végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy ez a koordináció sem képes

megakadályozni a dipeptid-BIMA ligandumokra jellemző ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N})$) kötődésű CuH_2L komplexek képződését. Ugyanakkor a bisz(imidazol-2-il)-rész egy újabb fémion megkötésére képes, ez egy hárommagvú $\text{Cu}_3\text{H}_2\text{L}$ összetételű komplex képződéséhez vezet (32.b ábra), ami uralkodó ekvimoláris és fémion felesleget tartalmazó oldatban fiziológiás pH tartományban.

A harmadik helyen hisztidint tartalmazó GlyGlyHis-BIMA ligandumban a bisz(imidazol-2-il) koordináció mellett lehetőség van a kiugró stabilitású GlyGlyHis-szerű koordináció kialakulására is. Ez a koordináció meghatározó a keletkező komplexekben, de a fémion-ligandum aránytól függő mértékben kompetíció alakul ki a bisz(imidazol-2-il) részhez való kötődéssel. Ez azt jelenti, hogy ligandumfelesleg esetén a savas és semleges pH tartományban a bisz(imidazol-2-il) koordinációjú komplexek az uralkodóak és a GlyGlyHis koordinációjú CuH_2L komplex csak pH 7 felett képződik. A komplex szerkezetét igazolják a spektrális adatok, a CuH_2L komplexre jellemző $\lambda_{\text{max}} = 516 \text{ nm}$, $g_{\parallel} = 2,181$, $A_{\parallel} = 206 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ értékek jó egyezésben vannak a $\text{Cu}(\text{II})$ -GlyGlyHis rendszerben képződő CuH_2L komplexére jellemző paraméterekkel ($\lambda_{\text{max}} = 525 \text{ nm}$, $g_{\parallel} = 2,178$, $A_{\parallel} = 209 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$).^{D20} Ekvimoláris oldatban és fémionfelesleg jelenlétében már pH 5 felett is kimutathatóak a peptidrészen kötődő fémiont tartalmazó részecskék, többmagvú komplexek vannak jelen a fiziológiás pH tartományban, amelyben a ligandum jelenti a hidat a kötődő fémionok között (32.c,d ábra). A hárommagvú $\text{Cu}_3\text{H}_4\text{L}_2$ összetételű komplexek jelenlétét az 1:1 és 3:2 arányú rendszerek pH ~ 7 körüli mintáiban végzett tömegspektroszkópiás vizsgálatok is bizonyították. A GlyGlyHis-szerű koordináció ekvimoláris oldatban is csak pH 7 felett képes teljesen kiszorítani a bisz(imidazol-2-il)-szerű koordinációt. A kétféle koordinációs mód közötti kompetíciót jól szemlélteti a $\text{Cu}(\text{II})$ -BIM-GlyGlyHis 1:2:2 és 1:1:1 arányú rendszerében elméletileg képződő komplexek koncentrációeloszlása (33.a,b ábra), amely összhangban áll a GlyGlyHis-BIMA rendszer vizsgálati eredményeivel (33.c,d ábra).

Cink(II)ionokkal a hisztidint tartalmazó peptidszármazékok közül csak a GlyGlyHis-BIMA komplexeit tanulmányoztuk. Az egyéb peptidszármazékok cink(II)-komplexeitől annyiban tapasztaltunk eltérést, hogy a protonált mono- és bisz-komplexek mellett megjelenő ZnL és ZnL_2 komplexekben kimutatható az oldalláncbeli imidazolgyűrű kölcsönhatása, és ez a háromfogú koordináció a keletkező komplexek nagyobb stabilitását eredményezi, megakadályozva a fémion hidrolízisét pH 8 alatt.



33. ábra A Cu(II)-BIM-GlyGlyHis 1:2:2 arányú (a), Cu(II)-BIM-GlyGlyHis 1:1:1 arányú (b), Cu(II)-GlyGlyHis-BIMA 1:2 arányú (c) és Cu(II)-GlyGlyHis-BIMA 1:1 arányú (d) oldatában képződő komplexek eloszlása a pH függvényében ($c(\text{L}) = 4,00 \text{ mmol/dm}^3$)

Összegezve a bisz(imidazol-2-il) származékok komplexeivel végzett vizsgálatok eredményeit, általános megállapíthatjuk, hogy bár a kelátképző helyzetben levő két imidazolgyűrű stabilis kötődést biztosít a fémionok számára a savas tartományban, önmagában nem képes horgonycsoportként viselkedni és elősegíteni az amidnitrogének deprotonálódását még akkor sem, ha a molekulában egy oldalláncbeli hisztidin imidazolgyűrű is jelen van. A terminális aminocsoport jelenlétében azonban lejátszódik az amidnitrogén(ek) deprotonálódása és koordinálódása a réz(II)- és nikkell(II)-tartalmú rendszerekben és az imidazolrész és a kapcsolódó lánc együttes koordinációja változatos összetételű egy- és többmagvú komplexek képződéséhez vezet. Ez réz(II) jelenlétében néhány aminosav- és dipeptid-származék esetén a fémion-ligandum aránytól függően fiziológiás vagy lúgos tartományban kedvezményezetté teszi a koordinálódó imidazolgyűrű N(1)H csoportjának deprotonálódását és imidazolátohidas komplexek képződését.

A peptidlánc növelése és különösen az oldalláncbéli hisztidin imidazolgyűrű jelenléte a peptidszerű koordináció kialakulásához és dominanciájához vezet. Bár jelentős kompetíció

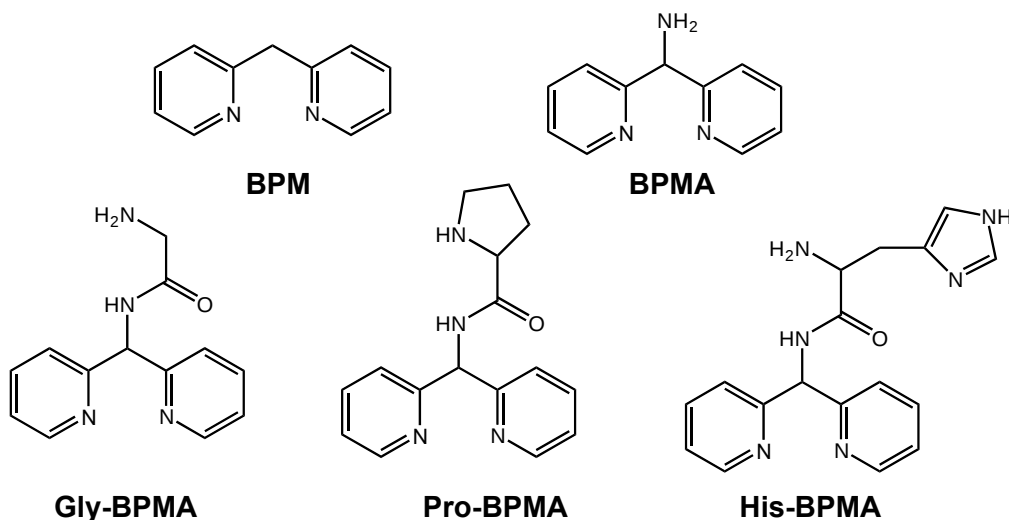
alakul ki a peptidszerű és bisz(imidazol-2-il)-szerű koordináció között, a bisz(imidazol-2-il)-részt csak a GlyGlyHis-szerű kötődés és csak lúgos pH tartományban képes teljesen kiszorítani a koordinációs szférából.

Az aminosav- és dipeptid-származékok esetén keletkező imidazolátohidat tartalmazó komplexek potenciális CuZnSOD modellek lehetnek, és ugyancsak ezen enzimben levő réz(II) koordinációs környezetét modellezhetik a négy imidazol-N kötődésével létrejövő bisz(imidazol-2-il) koordinációjú bisz-komplexek is. Így ezen komplexeknek, mint lehetséges CuZnSOD modelleknek a vizsgálatával kapcsolatos eredményeket a későbbi fejezetekben mutatom be.

5.2. Kelátképző helyzetben levő piridingyűrűk hatása az aminosavszármazékok komplexképző sajátosságaira^{D5,D16-D18}

A piridin nitrogén kisebb fémionmegkötő képességű, mint az imidazol nitrogéndonoratomja, de a két vagy több piridint tartalmazó ligandumok stabilis komplexeket képezhetnek a különböző átmenetifém-ionokkal. Mind az oldatok egyensúlyi,¹⁴⁴ mind a szilárd komplexek röntgendiffrakciós¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ vizsgálatai azt tükrözik, hogy ha a molekula kelátképző helyzetben tartalmazza a piridin nitrogénatomokat, akkor általában ez a rész szolgál a fémionok megkötésére, a további donorcsoportok, mint pl. az amino- vagy karboxilátcsoport módosíthatja a komplexképző sajátságokat, de az aromás nitrogének maradnak az elsődleges fémionkötőhelyek.

Néhány bisz(piridin-2-il)-csoportot tartalmazó, a bisz(imidazol-2-il) származékokkal analóg ligandum komplexképző sajátosságainak vizsgálata egyrészt a ligandumban jelenlevő két piridingyűrű, a terminális aminocsoport és az oldalláncbeli imidazolgyűrű koordinációban betöltött szerepének, a kialakuló komplexek szerkezetének megismerésére ad lehetőséget. Másrészt az analóg imidazolgyűrűt tartalmazó származékokkal való összehasonlítás további információt nyújt az imidazolgyűrű komplexképződésben betöltött szerepéről is. Két egyszerű bisz(piridin-2-il)-csoportot tartalmazó ligandum és három aminosav származékának (34. ábra) réz(II) és nikkel(II)-komplexeit tanulmányoztuk, és néhány esetben kiegészítettük a vanádium(IV)-komplexek sajátosságainak vizsgálatával is.



34. ábra Bisz(piridin-2-il)-csoportot tartalmazó származékok szerkezeti képlete

5.2.1. Bisz(piridin-2-il)-származékok sav-bázis sajátságai

A bisz(piridin-2-il)-csoportot tartalmazó vegyületek protonálódási folyamataiban (Melléklet, M9 táblázat) hasonló tendenciát figyelhetünk meg, mint a bisz(imidazol-2-il)-csoportot tartalmazó ligandumok esetén. A bisz(piridin-2-il)-csoport piridinnitrogénjei gyengébb bázisok, mint maga a piridin, ugyanakkor 2,2'-bipiridilhez¹³⁹ képest nagyobb pH-n játszódnak le a deprotonálódási folyamatok, ami a két aromás gyűrű közötti távolság növekedésével értelmezhető.¹⁴⁸ A két aromás nitrogénre jellemző pK értékek között azonban a bisz(imidazol-2-il)-csoporthoz hasonlóan ~ 2 log egység különbség van, ami az aromás nitrogének közötti kölcsönhatással értelmezhető. Ezeknek a donoratomoknak a bázicitását is csökkenti a metilénecsoporthoz kapcsolódó amino-, illetve amidnitrogén, aminek következtében a BPMA és az aminosav-BPMA származékoknál a legkisebb pK érték pH potenciometriásan nem határozható meg. A kelátképző helyzetben levő két aromás gyűrű csökkenti a metilénecsoporthoz kapcsolódó aminocsoport bázicitását, de lényegében nem befolyásolja a kapcsolódó aminosav terminális aminocsoportjának sav-bázis folyamatait.

5.2.2. Az egyszerű bisz(piridin-2-il) származékok komplexképző sajátságai^{D16}

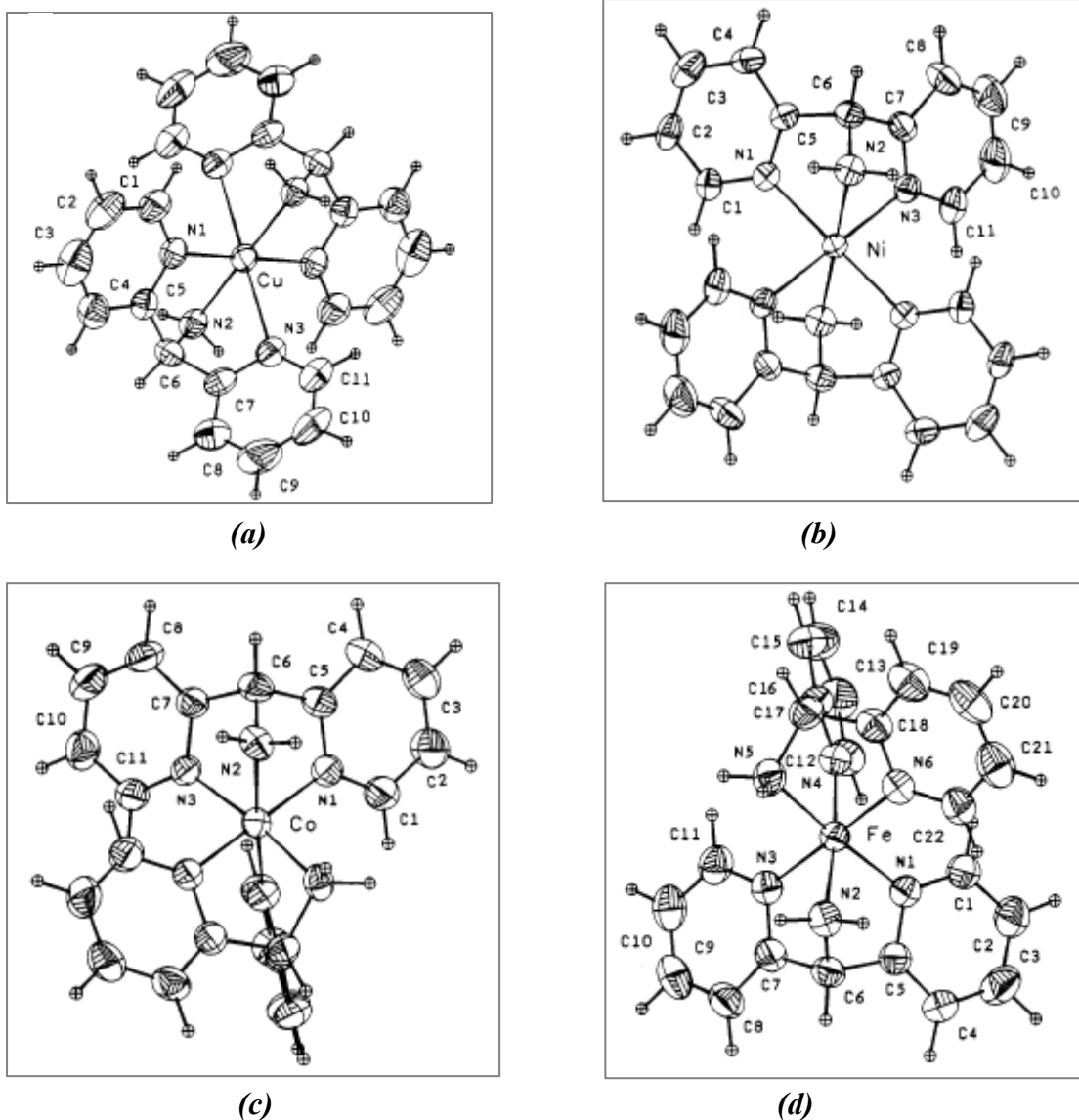
A BPM és a BIM koordinációs sajátságaiban jó egyezés figyelhető meg a réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ion tekintetében. Mono- és bisz-komplexek képződnek 2 és 4 piridin-nitrogén koordinációjával, a keletkező komplexek stabilitása a $\text{Cu(II)} > \text{Ni(II)} > \text{Zn(II)}$ sorrendben csökken (Melléklet, M10. táblázat), ami megfelel az Irving-Williams sornak. A keletkező komplexek stabilitása ugyanakkor kisebb, mint megfelelő BIM komplexeké. Különbség azonban a komplexképződési folyamatokban, hogy a BPM egyfogú koordinációja

feltételezhető az MHL összetételű komplexekben, és vegyes hidroxó-komplex (MH_2L) képződése is kimutatható lúgosabb pH tartományban, bár ezt a folyamatot minden esetben csapadékképződés kíséri, tehát a bisz(imidazol-2-il)-csoporthoz hasonlóan ez a koordináció sem képes oldatban tartani a fémiont a lúgos pH tartományban. Jelentősebb eltérés figyelhető meg a VO(IV)-ion esetén tapasztalt komplexképződési folyamatokban.^{D18} A keletkező bisz(piridin-2-il) koordinációjú monokomplex stabilitása jóval nagyobb mértékben csökken a BIM ligandum komplexéhez képest, mint a többi vizsgált fémion esetén ($VO(IV) + HL \rightleftharpoons VOL + H^+$ folyamatra vonatkozó képezett állandó $-1,38$ a BPM és $0,33$ a BIM esetén, Cu(II)-re vonatkozó értékek $1,56$ (BPM) és $2,71$ (BIM)). Így bisz-komplex képződése pH-potenciometriásan nem is mutatható ki még nagy ligandumfelesleg jelenlétében sem. Ugyanakkor a fémion hidrolízisre való erős hajlama következtében itt is jellemző a vegyes hidroxó-komplex képződése, ami azonban kétmagvú $(VO)_2H_2L_2$ komplexek képződését eredményezi. Az ESR vizsgálatok emellett egy bisz(ligandumú) vegyes hidroxó-komplex képződését is igazolták.

A BPMA ligandum aminosavcsoportja a BIMA-hoz hasonlóan mind a réz(II)-, mind a nikkel(II)-komplexekben részt vesz a fémionhoz való kötődésben, ML és ML_2 komplexek képződnek. A komplexekre vonatkozó $\lg(K_1/K_2)$ értékekben ((37) egyenlet) azonban csökkenést figyelhetünk meg, ami különösen a réz(II) esetén figyelemre méltó ($\lg(K_1/K_2) = 0,95$ (BPMA), $2,89$ (BIMA)). Ez alapján ugyanis feltételezhető, hogy ellentétben a BIMA ligandummal a BPMA háromfogú koordinációja alakul ki az ML és ML_2 komplexekben is, ahol az aminosavcsoport is kötődik a réz(II)ionhoz, egy meglehetősen ritka torzult oktaéderes geometriájú komplexet eredményezve.^{D16} A feltételezést az előállított szilárd *rac*-izomer komplex röntgenszerkezeti vizsgálata egyértelműen alátámasztotta (35.a ábra). Ugyancsak sikerült előállítani a Ni(II)-, Fe(II)- és Co(II)-BPMA ML_2 komplexét egykristály formájában. A röntgenszerkezeti vizsgálatok a Ni(II) esetén *mezo*-, a Co(II) és Fe(II) esetén *rac*-izomer szerkezetet mutattak ki (35.b,c,d ábra) oktaéderes geometriával és közel azonos M–N távolsággal (7. táblázat). (A szilárd komplexeket külföldi tanulmányutam során *Prof. Peter Comba* kutatócsoportjában állítottuk elő.)

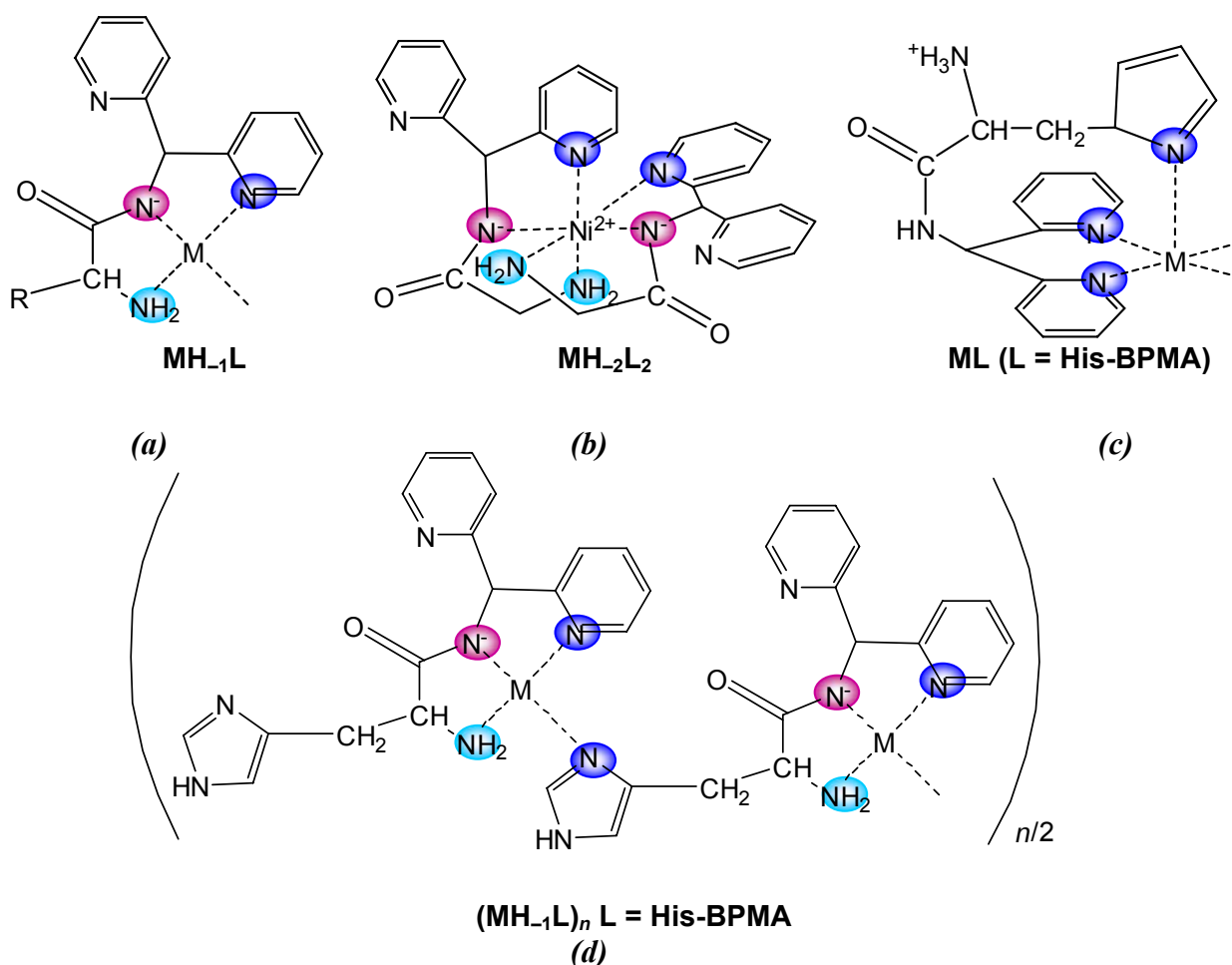
7. táblázat A BPMA ligandum ML_2 komplexében meghatározott M–N távolság adatok

	<i>rac</i> -CuL ₂	<i>rac</i> -NiL ₂	<i>mezo</i> -CoL ₂	<i>mezo</i> -FeL ₂
M–N (piridin) [Å]	2,02	2,11	1,95	2,00
M–N(amin) [Å]	2,54	2,10	1,93	1,95



A bisz(piridin-2-il)-csoport gyengébb fémionkötő képessége miatt savas tartományban a réz(II) és VO(IV) mindhárom ligandummal csak monokomplexeket képez a két aromás nitrogén kötődésével. Az oktaédres geometria a nikkel(II) és cink(II) esetén azonban kedvezőbbé teszi a két ligandum koordinálódását, így ezekben a rendszerekben kimutatható a négy piridin-nitrogén koordinációjú komplexek megjelenése. Ez a cink(II)-Gly-BPMA rendszer kivételével valamennyi fémion-Gly-BPMA és -His-BPMA rendszerben protonált komplexek képződéséhez vezet, míg a cink(II) esetén a Gly-BPMA-hoz való kötődés csak a ligandum aromás nitrogénatomjai deprotonálódását követően mutatható ki.

Az oldalláncbeli donorcsoportok deprotonálódása a koordinációs mód megváltozásához vezet. A Gly-BPMA esetében a terminális aminocsoport koordinálódása elősegíti az amidnitrogén deprotonálódását mind a négy vizsgált fémion esetén. Ez azonban továbbra is egymagvú komplexek jelenlétét eredményezi (36.a,b ábra), vagyis a koordinációs szférából kiszoruló piridin-gyűrű – ellentétben az imidazolgyűrűvel – nem képes hidat képezve kötődni egy másik fémionhoz.



36. ábra Az aminosav-BPMA ligandumokkal képződő komplexek lehetséges szerkezetei

A deprotonálódás a monokomplexekben kisebb pH-n játszódik le, mint a bisz-komplexekben, és minden esetben a dipeptidekhez képest kisebb pK érték jellemzi a folyamatot. A 8. táblázat a deprotonálódási folyamatokra jellemző pK értékek összevetését teszi lehetővé. Az adatok azt tükrözik, hogy a piridin-N koordinálódása a vizsgált fémionok komplexeiben elősegíti az amidnitrogén deprotonálódását, az értékek a GlyGly peptidnél mért értékeknél kisebbek. Nem ilyen egységes a kép a bisz(imidazol-2-il) származékok esetén. Bár az $(NH_2, N^-, Im(N))$ koordináció kedvezményezettségét mutatja az, hogy nemcsak a réz(II)- és nikkel(II)ion, hanem a vanádium(IV) és cink(II)ion esetében is megjelennek ilyen koordinációjú komplexek, a réz(II)-komplexekben kompetíció alakul ki a bisz(imidazol-2-il)- és GlyHis-szerű kötődés között, és ez a monokomplexek esetén kismértékben, bisz-komplexek esetén jelentősebb mértékben akadályozza az amidnitrogén deprotonálódási folyamatokat.

8. táblázat Az (NH_2, N^-, X) koordinációs módú komplexek ($X = Pyr(N), Im(N), COO^-$) képződését jellemző pK értékek különböző ligandumok esetén

	Gly-BPMA	Pro-BPMA	Gly-BIMA	GlyGly ^{20,149}	GlyHis ^{c,47}
Cu(II)	3,84 ^a	3,52 ^a	4,6 ^b	4,23 ^c	4,15 ^c
Ni(II)	6,22 ^d	6,44 ^d	7,18 ^b	8,87 ^c	6,03 ^c
	7,25 ^e	7,33 ^e		9,58 ^e	
Zn(II)	7,89 ^e	8,09 ^f	6,80 ^b	—	6,73 ^c

^a $\lg\beta(MHL) - \lg\beta(ML)$; ^b eloszlási görbéről leolvastva ($2 MHL \rightleftharpoons M_2H_2L_2 + 4 H^+$)

^c $\lg\beta(ML) - \lg\beta(MH_1L)$; ^d $(\lg\beta(MHL) - \lg\beta(MH_1L))/2$

^e $(\lg\beta(ML_2) - \lg\beta(MH_2L_2))/2$; ^f $\lg\beta(MH_1L_2) - \lg\beta(MH_2L_2)$

Az $(NH_2, N^-, Pyr(N))$ koordinációt a réz(II) és vanádium(IV) esetén az UV-látható, illetve ESR spektroszkópiás adatok (9. táblázat), míg a cink(II) esetén a 1H NMR spektroszkópiás adatok (10. táblázat) igazolják.

A cink(II)-Gly-BPMA rendszerben a peptidszerű koordináció kialakulását az amidcsoport melletti CH-csoport jelének változása mutatja legjobban. A 10. táblázat adataiból látható, hogy a $pD = 7,85$ -nél felvett NMR spektrumban a CH-csoport kémiai eltolódás értéke csökken a szabad liganduméhoz képest, és ez a kb. 70 %-ban megjelenő $(NH_2, N^-, Pyr(N))$ koordinációjú ZnH_1L komplexnek köszönhető.

A nikkel(II)-komplexek esetén az amidnitrogén deprotonálódásával kialakuló NiH_1L és NiH_2L_2 összetételű komplexek oktaéderes geometriájúak, így ez jelentős változást nem eredményez a látható spektrumban. Azonban az ekvimoláris oldatban keletkező NiH_2L

vegyes hidroxó-komplex esetén megjelenő síknégyszetes geometria, valamint az a tény, hogy lúgos tartományban hidrolízis és csapadékképződés nem figyelhető meg, alátámasztja a peptidszerű koordinációt.

9. táblázat A bisz(piridin-2-il) ligandumok réz(II)- és vanádium(IV)-komplexeit jellemző spektrális paraméterek ($\lambda_{\max}$ [nm] (ϵ [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]), $g_{\parallel}$ [Hz], $A_{\parallel}$ [$\times 10^4 \text{ cm}^{-1}$])

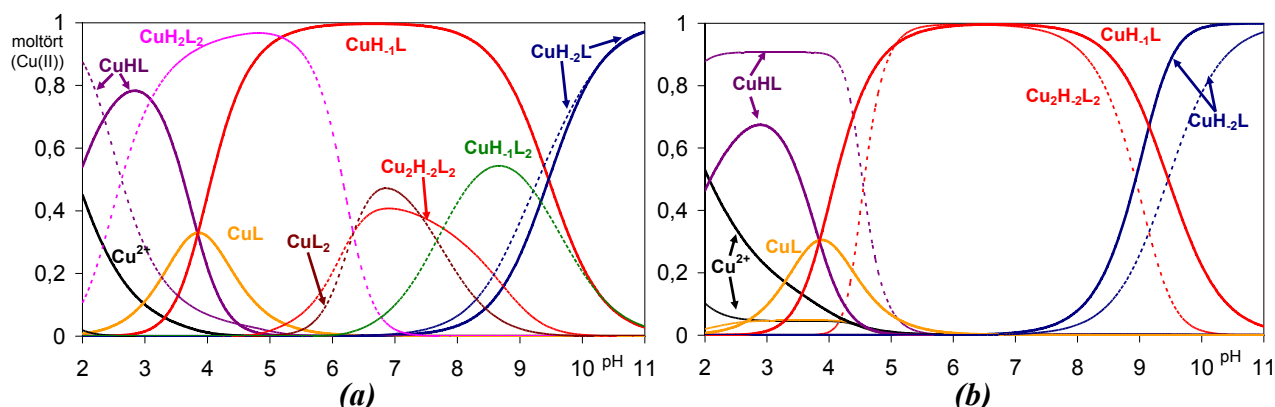
Komplex összetétele Koordinációs mód	Gly-BPMA			Pro-BPMA			His-BPMA		
	$\lambda_{\max}$ (ϵ)	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$	$\lambda_{\max}$ (ϵ)	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$	$\lambda_{\max}$ (ϵ)	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$
CuHL (Pyr(N),Pyr(N)) + NH_3^+	633 (65)	2,295	172	632 (46)	2,285	183	645 (78)	2,278	172
CuL (Pyr(N),Pyr(N),Im(N) _{ax})							625 (108)	2,220	187
CuL ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{Pyr(N)}$) + NH_3^+	610 (154)	—	—	—	—	—			
CuH₁L ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{Pyr(N)}$)	602 (133)	2,225	197	598 (129)	2,225	196	—	—	—
Cu₂H₂L₂ ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{Pyr(N)}$) + Im(N)	—	—	—	—	—	—	590 (133)	—	—
CuH₂L ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{Pyr(N)}, \text{OH}^-$)	595 (116)	2,225	174	598 (107)	2,225	181	—	2,213	175
VOHL (Pyr(N),Pyr(N)) + NH_3^+	—	1,944	167				—	1,944	169
VOH₁L ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{Pyr(N)}$)	—	1,950	163				—	1,946	164
VOH₂L ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{Pyr(N)}, \text{OH}^-$)	—	1,952	159				—	1,950	159

10. táblázat A Gly-BPMA és a cink(II)–Gly-BPMA 1:1 rendszerben mért ^1H NMR paraméterei [ppm] a pH függvényében

		CH ₂ (a)	CH (b)	aromás protonok		
$\text{pH}_L = 2,35$	H ₂ L	4,010	6,610	7,805	8,253	8,622
$\text{pH}_L = 4,44$	HL	3,983	6,289	7,463	7,908	8,483
$\text{pH}_L = 11,8$	L	3,474	6,244	7,463	7,896	8,471
$\text{pH}_{\text{Zn(II)/L}} = 3,55$	L + Zn(II)	3,992	6,395	7,572	8,020	8,528
$\text{pH}_{\text{Zn(II)/L}} = 7,45$	ZnH ₁ L	3,272	5,977	7,403	7,863	8,468
$\text{pH}_{\text{Zn(II)/L}} = 9,00$	ZnH ₂ L	3,247 3,338	5,856 6,131	7,384 7,478	7,632 7,829	8,371 8,435

A His-BPMA terminális része a hisztaminszerű koordináció lehetőséget is megteremti, ezt a koordinációt azonban a réz(II)-komplexekben nem mutattuk ki. A bisz(piridin-2-il)-szerű koordináció kedvezőbb a savas tartományban, az N-terminális donorcsoportok deprotonálódását követően pedig nem ligandumhidas komplexek képződnek a molekula mindkét végének kötődésével, hanem az UV-látható és ESR paraméterek (9. táblázat) alapján a hisztidin imidazol-N axiális koordinációja feltételezhető (35.c ábra). A nikkel(II) és cink(II) MH_xL_2 ($x = 2$ vagy 3) összetételű komplexekben azonban mind a $2x(\text{Pyr}(\text{N}), \text{Pyr}(\text{N}))$, mind a vegyes $(\text{Pyr}(\text{N}), \text{Pyr}(\text{N})) + (\text{NH}_2, \text{Im}(\text{N}))$ koordinációs mód megvalósulhat. Így a képződő protonált mono- és bisz-komplexekben a hisztidin imidazolgyűrűje stabilizáló hatású, amely mind a réz(II), mind a nikkel(II) esetén akadályozza az amidnitrogén deprotonálódását és koordinálódását, a folyamat a nagyobb pH tartományban játszódik csak le. Hasonló hatás a cink(II)-His-BPMA rendszerben is megfigyelhető, ennek következtében azonban a nagyobb pH tartományban már a hidrolízis és csapadékképződés miatt le sem játszódik ez a folyamat. Ugyanakkor a réz(II) és nikkel(II) esetén az oldalláncbeli imidazolgyűrű a piridin-nitrogénnel ellentétben hídként kapcsolódik egy másik fémionhoz polimer szerkezetű komplexek képződése közben (35.d ábra). A VO(IV) komplexképződési folyamataira viszont gyakorlatilag nincs hatással az oldalláncbeli hisztidin imidazolgyűrűje.

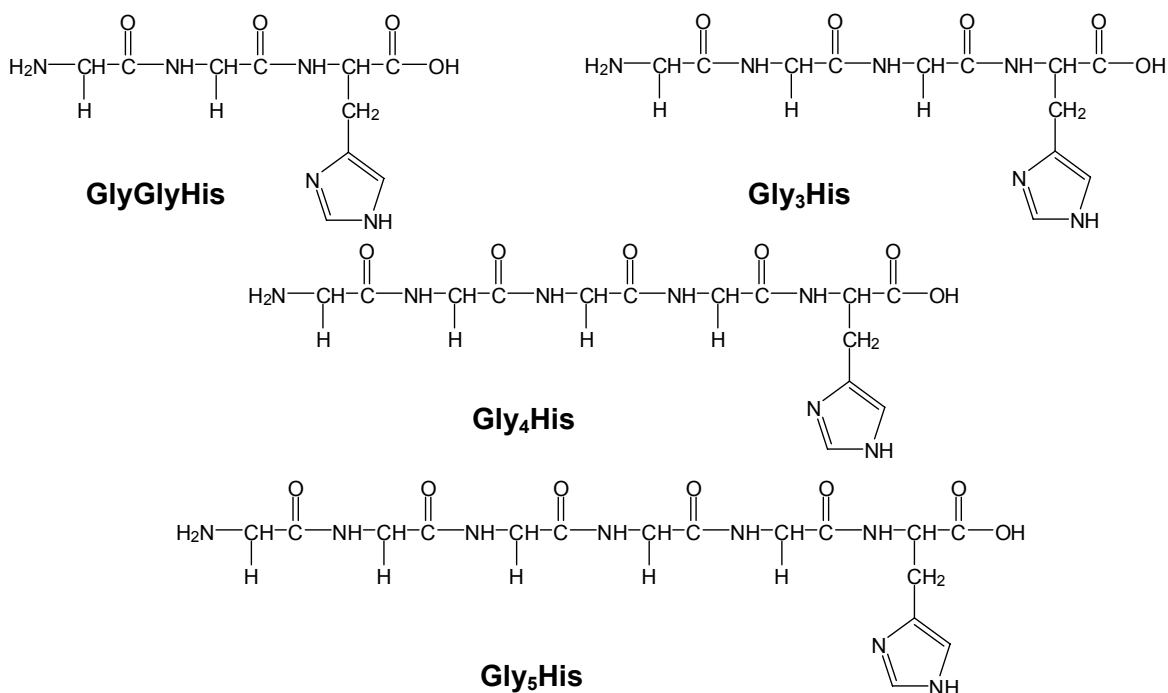
Összességében megállapíthatjuk, hogy a bisz(piridin-2-il)-csoport jelenléte a molekulában a bisz(imidazol-2-il)-csoporthoz képest csekélyebb mértékben, de hatással van a komplexképződési folyamatokra. Savas tartományban a fémionok kötődése a kelátképző helyzetben levő két piridin-nitrogénhez történik. Ez azonban gyengébb kötődést eredményez, mint a bisz(imidazol-2-il) csoport, így míg az aminosav-BIMA származékok esetén pH 5 alatt a bisz(imidazol-2-il) koordinációjú mono-, illetve bisz-komplexek uralkodnak, addig az aminosav-BPMA-származékok esetén az aminosav rész részvételével létrejövő peptidszerű koordináció a meghatározó a gyengén savas és fiziológiás pH tartományban. Ez általában kisebb számú és egymagvú komplexek képződését eredményezi. Ezt szemlélteti a következő ábra, ahol a Cu(II)-Gly-BIMA és Cu(II)-Gly-BPMA 1:2 (37.a ábra) és 1:1 arányú (37.b ábra) rendszerében képződő komplexek eloszlását együtt mutatja be egy-egy ábra.



37. ábra A Cu(II)-Gly-BIMA (szaggatott vonal) és a Cu(II)-Gly-BPMA (folytonos vonal) rendszerben képződő komplexek eloszlása a pH függvényében 1:2 fémion-ligandum aránynál **(a)** és ekvimoláris oldatban **(b)** ($c(L) = 4,00 \text{ mmol/dm}^3$)

5.3. A C-terminális hisztidin hatása a peptidek komplexképző sajátosságaira^{D8,D19,D20}

A harmadik helyen hisztidint tartalmazó peptideknek különös nagy figyelmet szenteltek, mivel számos réz(II)- és nikkel(II)-kötő fehérje ún. ATCUN motivumot tartalmaz (Amino Terminal Cu(II)-Ni(II)-binding), amelynek szekvenciáját (AspAlaHis) modellezzik ezek a peptidek. Ennek megfelelően ezeknek a ligandumoknak a komplexképző sajátosságait már nagyon széles körben tanulmányozták. A GlyGlyHis (38. ábra) peptid komplexeivel végzett kutatásaink ezekhez az eredményekhez néhány kiegészítéssel járultak hozzá.

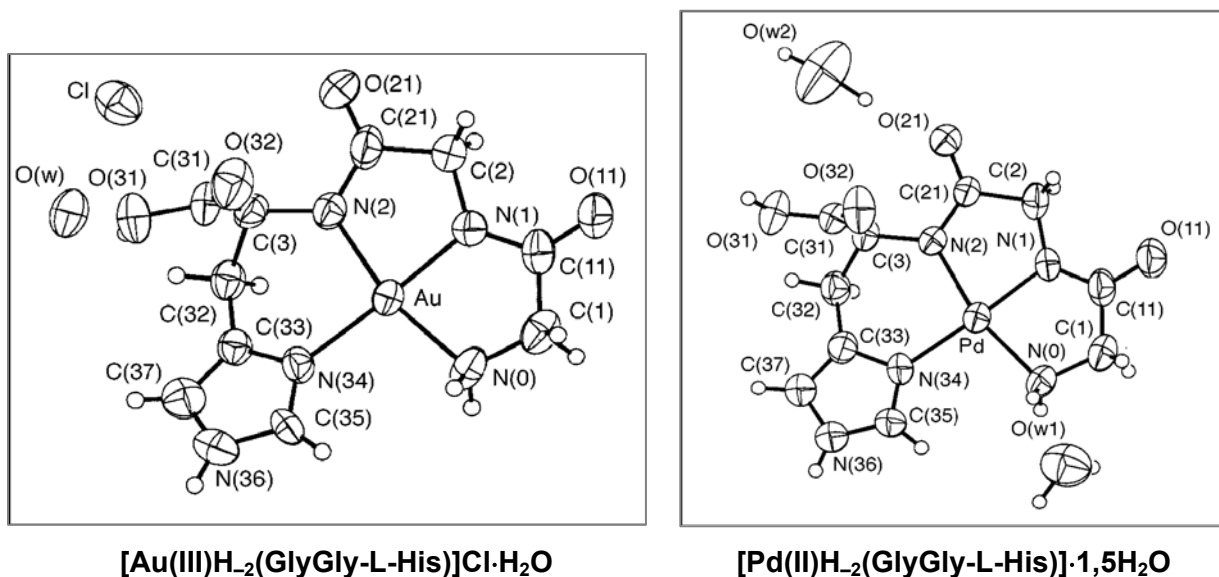


38. ábra C-terminális hisztidint tartalmazó peptidek szerkezeti képlete

Ugyanakkor felmerült a kérdés, hogy ha a peptidben a hisztidin a negyedik, ötödik, illetve hatodik helyen található, ez hogyan hat a komplexképződésre. Ehhez a Gly₃His, Gly₄His és Gly₅His peptidok (38. ábra) szintézisét és oldategyensúlyi vizsgálatát végeztük el.

5.3.1. Harmadik helyen hisztidint tartalmazó tripeptid átmenetifém-komplexei^{D19}

A harmadik helyen hisztidint tartalmazó peptidok kiugróan nagy stabilitású komplexeket képeznek a réz(II)-, nikkel(II)-, illetve a palládium(II)ionnal. Ezt nemcsak az oldategyensúlyi vizsgálatok támasztják alá, hanem az előállított szilárd komplexek röntgenszerkezeti adatai is. Prof. Peter Sadler kutatócsoportjával együttműködésben az arany(III) és palládium(II) GlyGlyHis peptiddal alkotott MH₂L összetételű komplexét állítottuk elő szilárd formában és szerkezetét röntgendiffrakciós vizsgálatokkal meghatároztuk (39. ábra).



39. ábra Az Au(III)- és Pd(II)-GlyGlyHis rendszerben képződő MH₂L komplex röntgenszerkezete

Az előállított szilárd komplexek pH-potenciometriás és ¹H NMR vizsgálata ugyanakkor azt is lehetővé tette, hogy meghatározzuk az (NH₂,N⁺,N⁻,Im(N)) koordinációjú komplexekben lezajló további sav-bázis folyamatokat. Az arany(III)-komplexben savas tartományban is lejátszódik egy deprotonálódási folyamat, ami pK = 2,58 értékkel jellemezhető. Ez a nem koordinálódott karboxilcsoport protonvesztéséhez rendelhető, ami egyúttal azt is bizonyítja, hogy már erősen savas tartományban a GlyGlyHis-szerű kötődés valósul meg a komplexben. Az egyensúlyi vizsgálatok azt is bizonyították, hogy mind az arany(III)-, mind a palládium(II)-komplexben lezajlik az imidazol-N(1)H csoportjának deprotonálódása. Ezt a folyamatot a Cu(II)-GlyGlyHis rendszerben erősen lúgos tartományban szintén kimutatták.¹⁵⁰

Ez a Pd(II) esetén hasonlóan csak erősen lúgos tartományban játszódik le, míg az arany(III)-komplexben jelentősen kisebb pK érték jellemzi ezt a folyamatot, mint a másik két fémion esetén (11. táblázat). Az N(1)H csoport fémion indukálta deprotonálódását számos különböző fémiont és (hisztidin) imidazolgyűrűt tartalmazó komplexben kimutatták, ezeket a 11. táblázat szintén tartalmazza. Ezek az értékek tükrözik, hogy a hisztidin imidazol-N(1)H csoportjának deprotonálódása az eddig vizsgált rendszerek közül az arany(III) esetén a legkedvezményezettebb. Emellett az Au(III) koordinálódása a terminális aminocsoporthoz $pH > 11$ felett még ezen koordinálódott csoport deprotonálódását is elősegíti. Ilyen jellegű folyamatra kevés példa akad az irodalomban, de érdekes megemlíteni, hogy a réz(III) esetén ezt kimutatták, míg az N(1)H deprotonálódására nem találtak bizonyítékot.¹⁵¹

11. táblázat A GlyGlyHis MH_2L komplexében lezajló deprotonálódási folyamat(ok) jellemző pK értéke(i) összehasonlítva más hisztidin/imidazol tartalmú komplexekre jellemző pK értékekkel

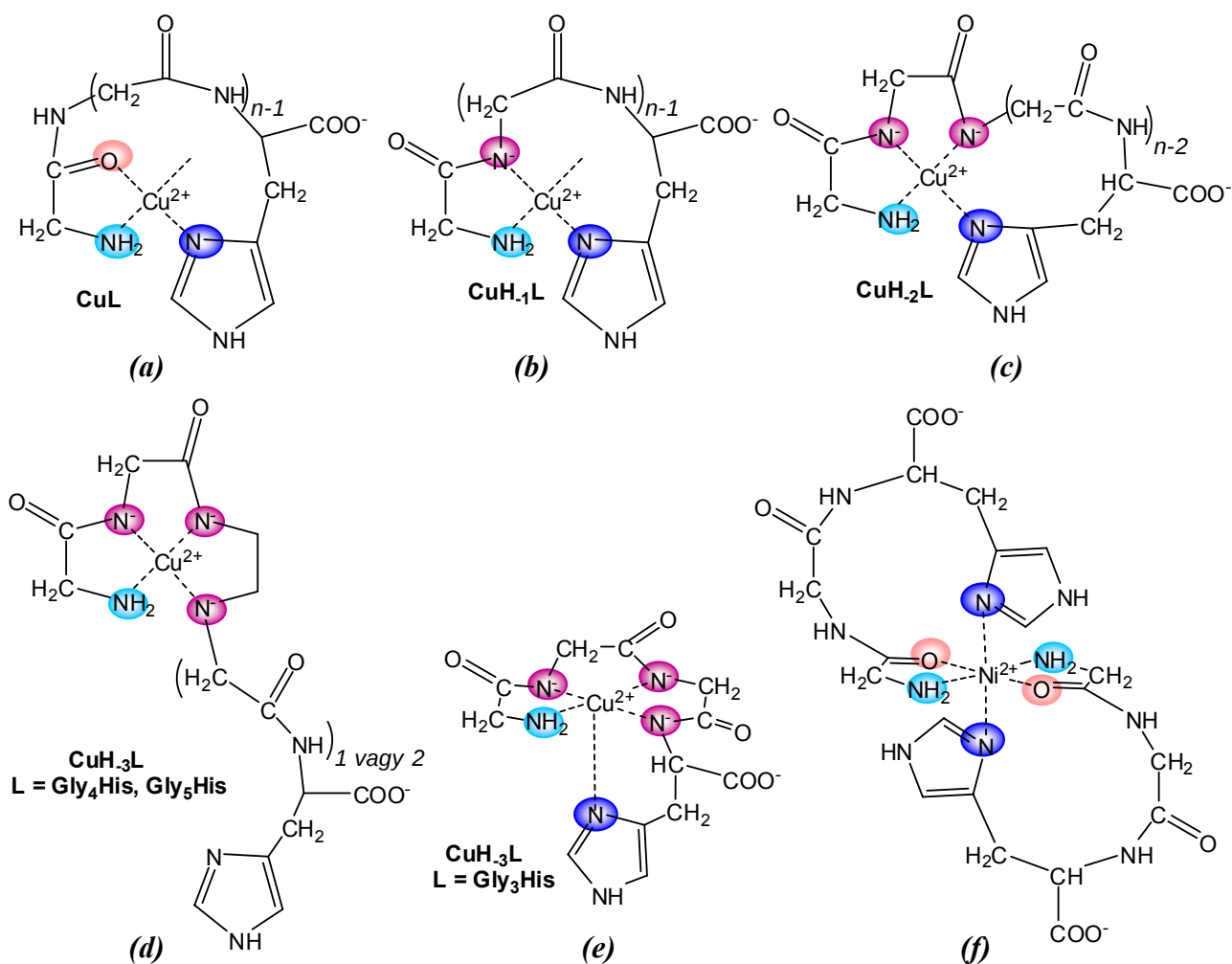
fémion	komplex	$pK_{N(1)H}$	hivatkozás
Co(III)	aquocobalamin	9,6	152
Ru(III)	Pentaamminruténium(III)-imidazol	8,9	153
Ru(III)	Pentaamminruténium(III)-hisztidin	8,7	154
Hg(II)	Metilhigany(II)-imidazol	9,6	155
Pd(II)	Pd(II)etiléndiammin-hisztidin	10,83	156
Cu(II)	Cu(II)H ₂ (GlyGlyHis)	10,7	150
Pd(II)	Pd(II)H ₂ (GlyGlyHis)	11,3	D19
Au(III)	Au(III)H ₂ (GlyGlyHis)	8,63	D19
		$pK_{koordinált-NH_2}$	
Au(III)	Au(III)H ₃ (GlyGlyHis)	11,50	D19
Cu(III)	Cu(III)H ₂ (GlyGlyHis)	8,2	151

5.3.2. Negyedik-, ötödik- és hatodik helyen hisztidint tartalmazó oligopeptidek réz(II)- és nikkel(II)-komplexei^{D8,D20}

A vizsgálatainkat megelőzően már több olyan közleményt publikáltak, amelyben különböző a negyedik, ötödik vagy hatodik helyen hisztidint tartalmazó oligopeptid komplexeiről számoltak be,¹⁵⁷⁻¹⁶³ de az eredmények néhány részletben ellentmondásosak. Azt általánosan megállapították, hogy az imidazol-N donoratom elsődleges kötőhely, és savas tartományban makrokelátot tartalmazó komplexek képződnek. A fő részecske pedig egy 4N koordinációjú

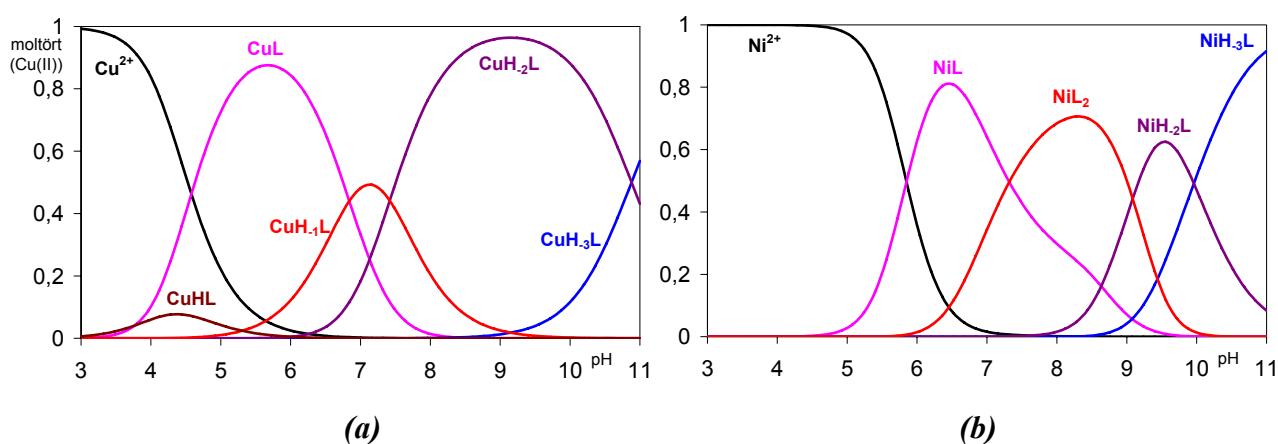
komplex, amely azonban jelentheti az ($N^-, N^-, N^-, Im(N)$) donorcsoport kötődését és a terminális aminocsoport kiszorulását a réz(II) koordinációs szférájából¹⁵⁹ vagy a peptidszerű koordinációt a terminális amino- és az azt követő három amidnitrogén részvételével.¹⁶³ Miután a peptid szekvenciája is befolyásolja a komplexképződési folyamatokat, a legegyszerűbb negyedik, ötödik és hatodik helyen hisztidint tartalmazó peptidok vizsgálata segíthet az ellentmondás feloldására és választ adhat a láncvégi hisztidin szerepére a komplexképződési folyamatokban.

A Gly₃His, Gly₄His és Gly₅His peptidok (38. ábra) réz(II)- és nikkel(II)-komplexeinek vizsgálata (Melléklet, M12. táblázat) egyértelműen mutatta, hogy savas tartományban a fémion a molekula N-terminális részén kötődik, de a C-terminális hisztidin is részt vesz a koordinációban. Ez a réz(II)-Gly₃His, -Gly₄His, -Gly₅His rendszerben az egyszerű peptidkéhez képest nagyobb stabilitású CuL komplexek (39.a ábra) képződéséhez vezet, amelyekben egy 14, 17, illetve 20-tagú makrokelát stabilizálja a szerkezetet.



39. ábra A Gly_nHis ($n = 3-5$) peptidok Cu(II)- és Ni(II)-komplexeinek lehetséges szerkezetei

Ez a stabilizáló hatás a makroelát méretének növekedésével egyre kisebb, így a CuL komplexek stabilitása $\text{Gly}_3\text{His} > \text{Gly}_4\text{His} > \text{Gly}_5\text{His}$ sorrendben csökken. A CuL komplex mennyisége jelentős a gyengén savas tartományban – ezt a 40. ábrán bemutatott eloszlás is jól szemlélteti –, és akadályozza a peptidnitrogének deprotonálódását. Ezek a folyamatok lépcsőzetesen játszódnak le ellentétben a GlyGlyHis esetén lezajló kooperatív deprotonálódással (12. táblázat). A C-terminális hisztidin kötődése a fémionhoz továbbra is megmarad, így az $(\text{NH}_2, \text{N}^-)$, illetve $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-)$ donorcsoportok mellett kimutatható az imidazolgyűrű koordinálódása az ekvatoriális síkban, egy meglehetősen torzult geometriát eredményezve (39.b,c ábra).



40. ábra A Cu(II)-Gly₃His ekvimoláris oldatában **(a)** és a Ni(II)-Gly₃His 1:2 fémion-ligandum arányú rendszerében **(b)** képződő komplexek eloszlása a pH függvényében ($c(\text{L}) = 4,00 \text{ mmol/dm}^3$)

12. táblázat A peptidnitrogének deprotonálódását jellemző pK értékek különböző peptidek esetén ((2)-(4) egyenletek)

		GlyGlyHis ⁷⁰	Gly ₃ His	Gly ₄ His	Gly ₅ His	GlyGlyGly ^{K2,20}	Gly ₅
Cu(II)	pK_1 (amid)	4,58	6,84	6,09	5,46	5,41	5,60
	pK_2 (amid)		7,42	7,80	7,69	6,86	6,81
	pK_3 (amid)		10,88	10,32	10,61		7,89
Ni(II)	$pK_{1,2}$ (amid)	5,84	8,64	8,59	8,11	8,27	
	pK_3 (amid)		9,96	9,62	9,62		

A képződő részecskék szerkezetét a spektrális adatok támasztják alá (13. táblázat), igazolva a Cu(II)-pentaglicin rendszerben képződő komplexektől eltérő 2N, 3N és 4N koordinációt és a torzult geometriát. A harmadik amidnitrogén kötődésével telítődik a fémion koordinációs szférája, aminek következtében az imidazol-N kiszorul az ekvatoriális síkból. Ez a Gly₄His és

Gly₅His peptidek esetében a pentaglicinhez (Gly₅) hasonló szabályos peptidszerű koordinációjú CuH₃L komplexek kialakulásához vezet (39.d ábra), ugyanakkor a Gly₃His CuH₃L komplexében az imidazol-N axiális kölcsönhatására utalnak az ESR és UV-látható spektrális paraméterek (39.e ábra).

13. táblázat A Gly_nHis ($n = 3-5$) ligandumok réz(II)-komplexeit jellemző spektrális paraméterek ($A_{||}$ [$\times 10^4$ cm⁻¹], $g_{||}$ [Hz], λ_{max} [nm], ϵ [dm³·mol⁻¹·cm⁻¹])

Komplex	Koordinációs mód	Gly ₃ His		Gly ₄ His		Gly ₅ His		Gly ₅	
		$g_{ }$	$A_{ }$	$g_{ }$	$A_{ }$	$g_{ }$	$A_{ }$	$g_{ }$	$A_{ }$
CuL	(NH ₂ ,CO)							2,331	151
	(NH ₂ ,CO) + Im(N)	2,299	139	2,298	137	a	a		
CuH₁L	(NH ₂ ,N ⁻)							2,251	175
	(NH ₂ ,N ⁻) + Im(N)	a	a	2,230	156	2,227	156		
CuH₂L	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻)							2,219	191
	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻) + Im(N)	2,194	200	2,199	200	2,196	199		
CuH₃L	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,N ⁻)			2,171	206	2,172	206	2,171	206
	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,N ⁻) + Im(N) _{ax}	a	a						
		λ_{max}	ϵ	λ_{max}	ϵ	λ_{max}	ϵ	λ_{max}	ϵ
CuL	(NH ₂ ,CO) + Im(N)	697	60	681	48	652	34		
CuH₁L	(NH ₂ ,N ⁻) + Im(N)	605	78	617	79	628	78		
CuH₂L	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻)							581 ^b	93 ^b
	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻) + Im(N)	561	131	560	125	560	115		
CuH₃L	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,N ⁻)			522	142	517	180	514 ^b	150 ^b
	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,N ⁻) + Im(N) _{ax}	550	140						
NiH₂L	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻) + Im(N)	441	180	438	161	441	151		
NiH₃L	(NH ₂ ,N ⁻ ,N ⁻ ,N ⁻)	423	230	414	217	410	215	410	218

^a Detektálható a jel, de az értékek nem adhatók meg a kis koncentrációk vagy a több részecske jelének átfedése miatt

^b A Gly₄ réz(II)-komplexeire vonatkozó adatok^{K2}

Nikkel(II)ion jelenlétében a ligandum N-terminális részének koordinációjával együtt szintén kötődik a láncvégi imidazolgyűrű is, de a réz(II)-ionnal ellentétben a nikkel(II) oktaéderes geometriája két ligandum kötődését is lehetővé teszi.

Így 1:2 fémion-ligandum aránynál nemcsak NiL, hanem NiL₂ komplex is keletkezik és ez utóbbi az uralkodó részecske a fiziológiás tartományban (39.b ábra). A ligandumok háromfogú koordinációja a NiL₂ komplexek esetén is jelentős stabilitásnövekedést eredményez, ami gátolja a peptidnitrogének deprotonálódását. Ez csak pH > 8 felett játszódik

le, viszont hasonlóan a GlyGlyGly-hez, illetve GlyGlyHis-hez és ellentétben a réz(II)-Gly_nHis ($n = 3-5$) rendszerrel a két amidnitrogén deprotonálódása egy lépésben, kooperatív módon történik. Ezzel párhuzamosan geometriaváltás is megfigyelhető, a keletkező NiH₂L síknégyszetes, diamágneses komplex, amire a $\lambda_{\max} = 440$ nm-nél megjelenő intenzív sáv ($\epsilon = 150 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) is utal. A komplexben azonban a CuH₂L részecskéhez hasonlóan az (NH₂, N⁻, N⁻) donorumok mellett az imidazol-N is kötődik a fémionhoz. Ez magyarázza azt a tényt, hogy a harmadik amidnitrogén deprotonálódása csak pH > 9 felett játszódik le. A képződő NiH₃L komplex szerkezete azonban mind a három ligandum esetén megfelel az oligoglicinek 4N-es komplexének, tehát (NH₂, N⁻, N⁻, N⁻) koordinációjú, síknégyszetes, diamágneses komplexek jelen az erősen lúgos pH tartományban.

Zn(II)-Gly₃His rendszer vizsgálatából ZnL és ZnL₂ komplexek keletkezését mutattuk ki a nikkel(II)-komplexekhez hasonló oktaéderes geometriával. Bár a ligandum háromfogú koordinációja ebben az esetben is növeli a komplexek stabilitását, pH > 8 felett nem tudja megakadályozni a fémion hidrolízisét és a csapadék kiválását.

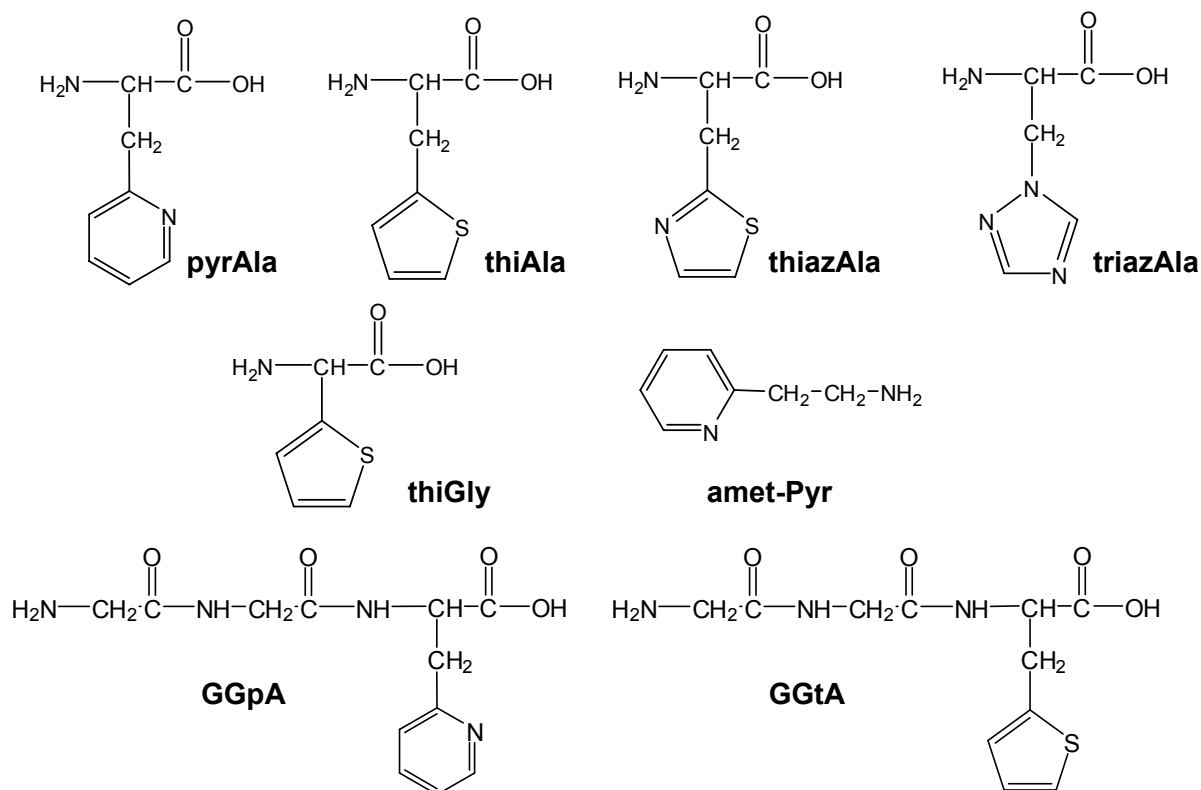
Összegzésként megállapíthatjuk, hogy a C-terminális hisztidin jelenléte a kistagszámú peptidekben jelentős hatással van a komplexképződési folyamatokra és a kialakuló komplexek szerkezetére, de a terminális aminos csoport az elsődleges fémionkötőhely. A láncvégi imidazolgyűrű kötődése a fémionokhoz szinte minden komplexben kimutatható, de a terminális aminos csoport kiszorítására nem képes. Ugyanakkor a ligandumok háromfogú koordinációja növeli az ML komplexek stabilitását, és a stabilitás az Irving-Williams sornak megfelelően a Cu(II) > Ni(II) > Zn(II) sorrendben csökken.

5.4. Hisztidin analóg aminosavak hatása a peptidek komplexképző sajátosságaira^{D21}

A természetben nem előforduló α -aminosavak és származékaik szintézise és vizsgálata iránti növekvő érdeklődés egyik oka a biológiai hatásoknak köszönhető. Ha egy peptidben, proteinben valamely természetben előforduló aminosavat vele szerkezetileg hasonló, de nem természetes aminosavval helyettesítik, akkor ez a peptid, protein biológiai aktivitásában számottevő változást eredményezhet. Így például, ha a vérnyomás szabályozásában szerepet játszó angiotenzin II szekvenciájában a hisztidint piridil- α -alaninnal helyettesítjük, ez jelentősen csökkenti a peptid aktivitását.¹⁶⁴ Hasonlóan a hisztidin-dekarboxiláz enzim specifikusan kötődik a hisztidinhez, ugyanakkor a hisztidinnel szerkezetileg analóg β -piridin-2-il-alanin, β -tiazol-2-il-alanin és β -(1,2,4)-triazol-2-il-alanin sem szubsztrát, sem enzim

inhibitor hatást nem mutat.^{165,166} Emellett ezeknek az említett vegyületeknek szabad aminosavként gyulladáscsökkentő,¹⁶⁷ illetve antitumor és antibiotikus^{165,166} hatást is tulajdonítanak. Számos a hisztidinnel, fenilalaninnel vagy tirozinnal analóg aminosavat állítottak már elő, de elsősorban biológia szempontból vizsgálták ezeket a vegyületeket,¹⁶⁸ illetve hatásukat a peptidekbe beépítve. Ugyanakkor a hisztidin helyettesítése más aminosavval a peptid fémionmegkötő képességében is jelentős változást hozhat. Ehhez ezen aminosavak, illetve peptidjeik komplexképző sajátságait is meg kell ismerni, amely alapján következtetést vonhatunk le a különböző heteroaromás gyűrűk komplexképződésben betöltött szerepéről, illetve egyúttal a hisztidin imidazolról, mint kötőhelyről is további információkat nyerhetünk.

Ennek megfelelően négy hisztidinnel analóg aminosav (a piridingyűrűt tartalmazó pyrAla, a tienilgyűrűt tartalmazó thiAla, a tiazolilgyűrűt tartalmazó thiazAla, a triazolilgyűrűt tartalmazó triazAla) és két egyéb származék (glicin származék: thiGly és a 2-(2-aminoetil)piridin: amet-Pyr) réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)-komplexeit tanulmányoztuk, és két aminosav – a pyrAla és a thiAla – esetén a GlyGlyHis tripeptiddel analóg ligandum (GGpA, GGtA) szintézisére és réz(II)- és nikkel(II)-komplexeik vizsgálatára is sor került. A vizsgált vegyületek képletét a 41. ábra mutatja be.



41. ábra A különböző heteroaromás gyűrűket tartalmazó ligandumok szerkezeti képlete

5.4.1. A különböző heteroaromás gyűrűt tartalmazó aminosavak sav-bázis és komplexképző sajátosságai

A vizsgált öt aminosavban elméletileg három protonálódásra képes csoport van, de pH-potenciometriásan csak két deprotonálódási lépcső tanulmányozható (Melléklet, M13. táblázat). A heteroaromás gyűrűhöz kapcsolódó aminosav rész lecsökkenti az aromás gyűrű proton-akceptor jellegét, így az aromás gyűrűkre jellemző pK érték csak a pyrAla (és az amet-Pyr) esetén határozható meg. Ugyanakkor az aromás gyűrű elektronszívó hatása az aminosav két donorcsoportjára is hatással van, az alifás aminosavakhoz képest mind az amino-, mind a karboxilcsoport savassága növekszik, hasonlóan a hisztidinhez vagy a fenilalaninhoz. Ennek következtében a karboxilcsoportra jellemző pK érték ≤ 2 , és pyrAla esetén pH-potenciometriásan nem is határozható meg.

A réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)-tartalmú rendszerek vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a keletkező komplexekben az aminosavszerű ($\text{NH}_2, \text{COO}^-$) koordináció jellemző, de a piridil-N, illetve triazolil-N gyenge kötődését és ezáltal stabilitásnövelő hatását kimutattuk. A bisz-komplexekben a fenilalaninhoz hasonlóan az aromás gyűrűk között kialakuló ún. „stacking” kölcsönhatás jön létre, amely abban is tükröződik, hogy a $\lg(K_1/K_2)$ értékek ((37) egyenlet) hasonlóak a Cu(II)-Phe komplexekre vonatkozó értékekkel, és kisebbek, mint az aminosavakra jellemző értékek (1,29 (ThiGly), 0,99 (ThiAla), 1,20 (ThiazAla), 1,05 (PyrAla), 0,95 (Phe), 1,35 (Ala)). Az ESR és UV-látható spektroszkópiás adatok alapján a PyrAla és a TriazAla ligandum mindhárom donorcsoportján keresztül koordinálja a fémiont, ami a TriazAla esetén polimer szerkezet kialakulását eredményezi.

14. táblázat A Gly_nHis (*n* = 3-5) ligandumok réz(II)-komplexeit jellemző spektrális paraméterek (*A*_{||} [x10⁴ cm⁻¹], *g*_{||} [Hz], λ_{max} [nm], ε [dm³·mol⁻¹·cm⁻¹])

ligandum	komplex	<i>g</i>	<i>A</i>	λ _{max}	ε	Koordinációs mód
thiGly	CuL			700	34	(NH ₂ ,COO ⁻)
	CuL₂			628	68	2x(NH ₂ ,COO ⁻)
thiAla	CuL	2,312	164	690	35	(NH ₂ ,COO ⁻)
	CuL₂	2,253	180	620	61	2x(NH ₂ ,COO ⁻)
thiazAla	CuL	2,296	164	709	45	(NH ₂ ,COO ⁻)
	CuL₂	2,239	180	639	94	2x(NH ₂ ,COO ⁻)
Ala¹⁶⁹	CuL	2,308	165			(NH ₂ ,COO ⁻)
	CuL₂	2,251	179	620	60	2x(NH ₂ ,COO ⁻)
triazAla	CuHL	2,367	143	782	18	Triaz(N)
	CuH₂L₂	2,330	149			2xTriaz(N)
	CuL₂	2,254	184	630	65	2x(NH ₂ ,COO ⁻)
pyrAla	CuHL	~2,38	~137	743	27	Pyr(N)
	CuL	2,304	170	662	45	(NH ₂ ,Pyr(N))
	CuL₂	2,235	189	612	89	(NH ₂ ,Pyr(N)) / (NH ₂ ,COO ⁻)
amet-Pyr	CuL	2,290	169	637	66	(NH ₂ ,Pyr(N))
	CuL₂	2,215	190	597	93	2x(NH ₂ ,Pyr(N))
His^{169,170}	CuHL	2,305	177	750		(NH ₂ ,COO ⁻)
	CuL			670		(NH ₂ ,Im(N))
	CuL₂	2,230	191	640		(NH ₂ ,Im(N)) / (NH ₂ ,COO ⁻)
Hisztamin¹⁶⁹	CuL	2,292	179	669		(NH ₂ ,Im(N))
	CuL₂	2,223	200	594		2x(NH ₂ ,Im(N))

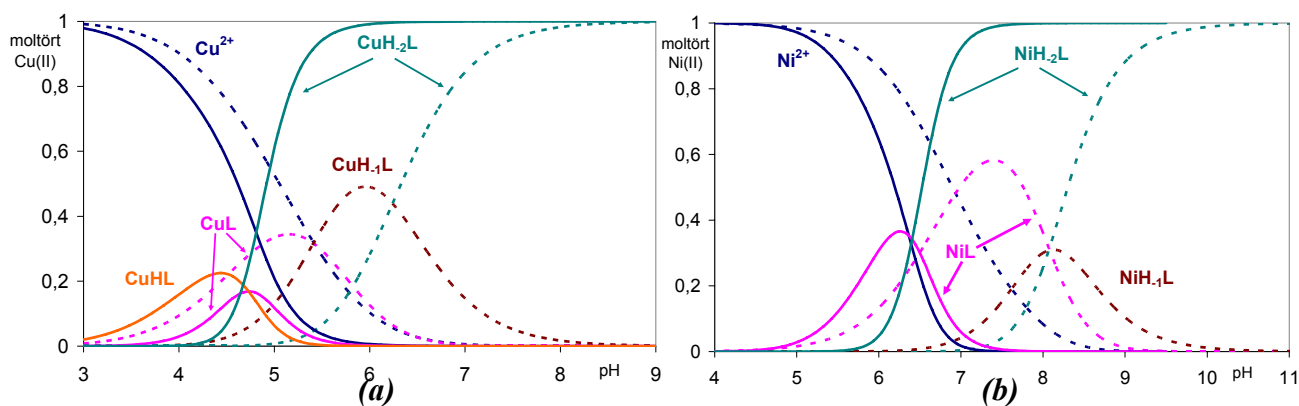
Általánosan a különböző aromás gyűrűk komplexképződésre gyakorolt hatásának mértékére az alábbi sorrend állapítható meg:

imidazol > piridin ~ triazol > tiazol ~ tienil

5.4.2. A C-terminális hisztidin analóg aminosav hatása a tripeptidek komplexképző sajátságaira

A két vizsgált tripeptid a GlyGlyHis ligandummal analóg vegyületek. Mindkét ligandumra a peptidszerű koordinációs kémiai viselkedés jellemző. Ez azt jelenti, hogy réz(II)- és nikkel(II)ionok hatására lejátszódik az amidnitrogének deprotonálódása és az MH₂L

összetételű komplexek uralkodóak a fiziológiai tartományban. Ugyanakkor a piridingyűrű jelenléte nagymértékben elősegíti a peptidnitrogének deprotonálódását és koordinálódását, ezek a folyamatok a GlyGlyHis ligandumhoz hasonlóan kooperatív módon mennek végbe. Ehhez képest eltérő komplexképződési folyamatok jellemzik a tienilgyűrűt tartalmazó származékot abból a szempontból, hogy a megfelelő összetételű komplexek csak nagyobb pH-n alakulnak ki. Ezt jól tükrözi a 42. ábra, ami együtt mutatja a kétféle ligandum esetén keletkező komplexek eloszlását a pH függvényében.



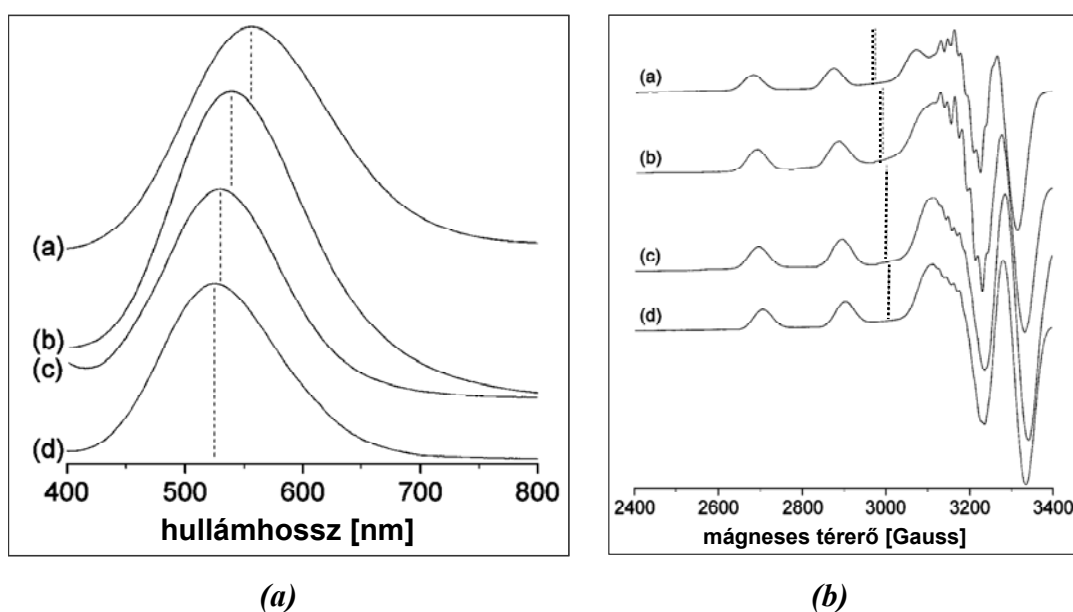
42. ábra A Cu(II)-GGpA (folytonos vonal) és Cu(II)-GGtA (szaggatott vonal) **(a)** és Ni(II)-GGpA (folytonos vonal) és Ni(II)-GGtA (szaggatott vonal) **(b)** ekvimoláris oldatában képződő komplexek koncentrációeloszlása a pH függvényében ($c(L) = c(M) = 4,00 \text{ mmol/dm}^3$)

A 15. táblázat adatai is jól tükrözik, hogy az amidnitrogénekre jellemző deprotonálódási állandók a GGpA esetén a GlyGlyHis, a GGtA esetén a GlyGlyGly adataihoz hasonlóak.

15. táblázat A Cu(II)-GGpA, GGtA és Ni(II)-GGpA, GGtA rendszerekben képződő komplexek stabilitási ($\lg\beta$) és képezett állandói kiegészítve a GlyGlyGly és GlyGlyHis adataival

	Cu(II)				Ni(II)			
	GGpA	GGH ⁷⁰	GGtA	GGG ^{K2}	GGpA	GGH ⁷⁰	GGtA	GGG ²⁰
MHL	10,82(6)	12,4		9,51	10,58(4)	11,33		
ML	6,09(3)	7,6	5,36(3)	5,25	4,47(4)	4,76	3,6(1)	3,75
MH ₁ L		2,5	-0,05 (2)	-0,16			-4,49(9)	-5,45
MH ₂ L	-3,20(2)	-1,55	-6,29(2)	-7,02	-8,26(3)	-6,93	-12,56(7)	-12,85
pK ₁ (amid)		5,10	5,41	5,41			8,08	9,20
pK ₂ (amid)		4,05	6,24	6,86			8,07	7,40
pK _{1,2} (amid)	4,65	4,58			6,37	5,84	8,07	8,30

Ezek alapján a GGpA esetén a GlyGlyHis-szerű ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{Pyr}(\text{N})$) koordinációjú, míg a GGtA esetén tripeptidszerű ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{COO}^-$) koordinációjú MH_2L komplexek képződését feltételezhetjük. A spektrális adatok azonban más képet mutatnak. A réz(II)-komplexek esetén az UV-látható spektrumokban mért abszorpciós maximumokhoz tartozó hullámhossz értékek és ESR paraméterek a három aromás gyűrűt tartalmazó ligandum esetén mutatnak hasonlóságot (43. ábra, 16. táblázat), ami mindkét esetben arra utal, hogy az aromás gyűrű részt vesz a koordinációban.



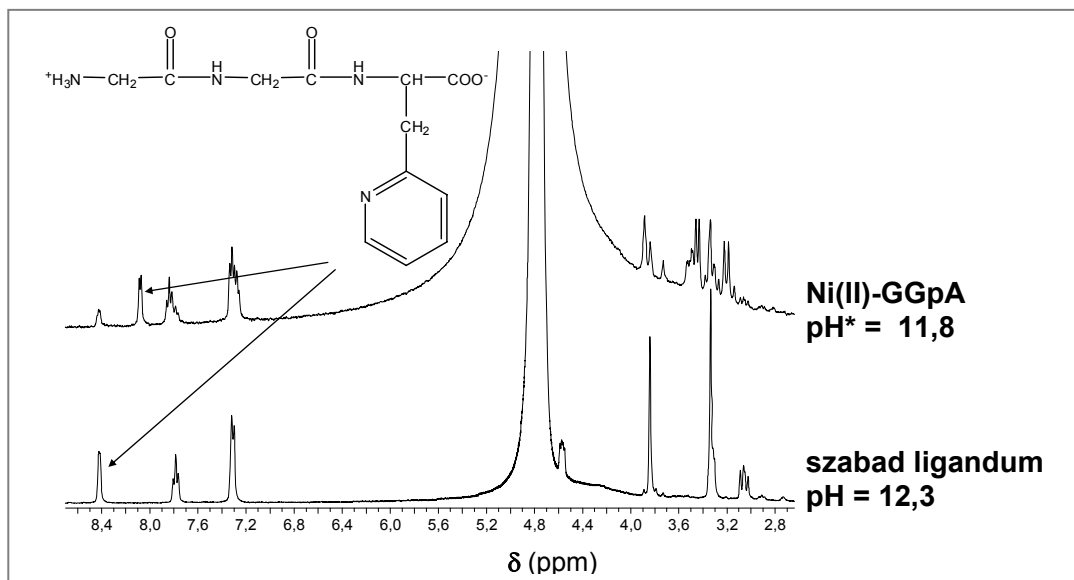
43. ábra Az MH_2L komplexekre jellemző UV-látható **(a)** és ESR spektrumok **(b)** (ekvimoláris oldat: Cu(II)-GlyGlyGly, pH = 8,9 (a), Cu(II)-GGtA, pH = 8,8 (b), Cu(II)-GGpA, pH = 9,10 (c), Cu(II)-GlyGlyHis, pH = 6,8 (d)).
A pontozott vonal az egyes spektrumok λ_{max} , illetve g_z értékét jelzi.

16. táblázat Az MH_2L komplexekre jellemző UV-látható és ESR spektrális paraméterek a különböző tripeptidek esetén

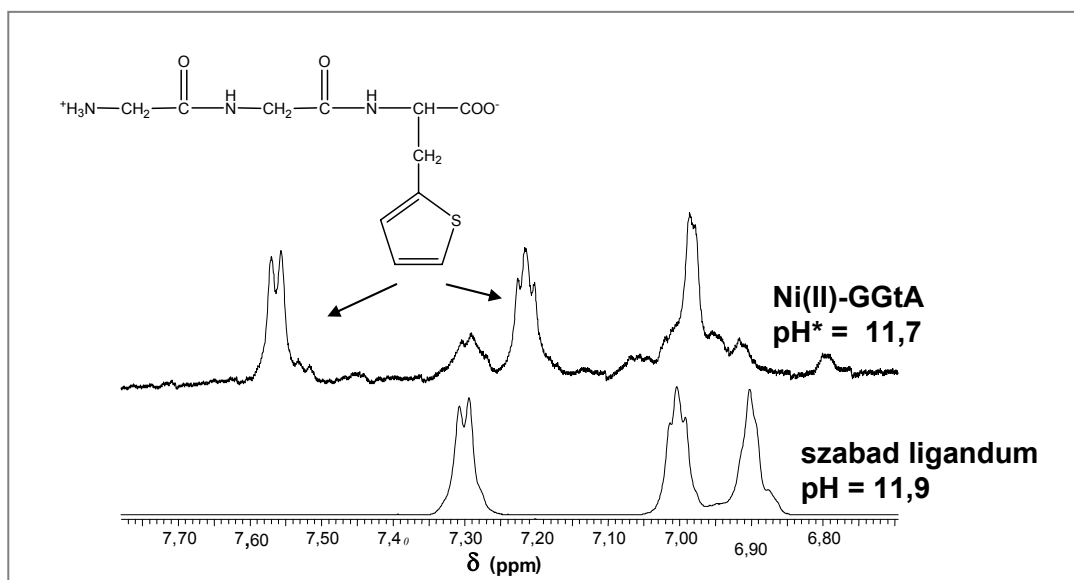
	GGpA	GGtA	GlyGlyHis	GlyGlyGly ^{K2}
λ_{max} [nm]	532	540	525	553
$A_{\parallel}$ [$\times 10^4 \text{ cm}^{-1}$]	211	208	210	201
$g_{\parallel}$ [Hz]	2,183	2,190	2,177	2,202

Hasonló következtetésre juthatunk a Ni(II)-GGpA és Ni(II)-GGtA rendszerek ^1H NMR spektrumának elemzéséből is. Az NiH_2L komplex mindkét vizsgált ligandum esetén síknégyszetes, diamágneses komplexet képez, ami lehetővé tette az NMR vizsgálatokat. A 44. ábra a teljesen deprotonált ligandumra, illetve a NiH_2L komplexre jellemző spektrumok

aromás tartományát mutatja be. A nyilak minden esetben a heteroatom melletti proton jelét mutatják. Ni(II) hatására az aromás protonokhoz tartozó jelek eltolódnak, és a legnagyobb eltolódás a heteroatom melletti proton jelében figyelhető meg. Ez mindkét esetben a heteroatom koordinációban való részvételére utal.



(a)



(b)

44. ábra A GGpA (a), GGtA (b) szabad ligandum és a Ni(II)-t tartalmazó rendszer lúgos tartományban felvett NMR spektrumainak aromás tartománya

A spektroszkópiás vizsgálatok alapján tehát arra következtethetünk, hogy nemcsak a piridin-N–fémion, hanem a tienil-S–fémion kölcsönhatás is kialakul mindkét vizsgált fémion

jelenlétében. Ez utóbbi esetben a komplexképződési folyamatokra gyakorolt hatás azonban sokkal csekélyebb mértékű, mint az imidazol-, illetve piridingyűrű esetén, összhangban a aminosavaknál megállapított sorrenddel.

A Zn(II)-ionokkal végzett vizsgálatok más tripeptidekhez hasonló komplexképződési folyamatokat igazoltak. Bár a pH-potenciometriás mérés alapján $ZnH_{-1}L$ komplex jelenléte is kimutatható, de az NMR spektroszkópiás vizsgálatok azt igazolták, hogy ez vegyes hidroxó komplex, tehát mind az alifás tripeptidekhez, mind a GlyGlyHis ligandumhoz hasonlóan nem játszódik le a peptidnitrogén(ek) deprotonálódása és koordinálódása. Összegzésként megállapíthatjuk, hogy a hisztidinnel analóg aminosavak és ezeket tartalmazó tripeptidek esetén az aminosavszerű, illetve tripeptidszerű koordináció a meghatározó, bár az aromás gyűrűk hatása kimutatható, ezek mértéke a hisztidin imidazolgyűrűkhöz képest kisebb mértékű.

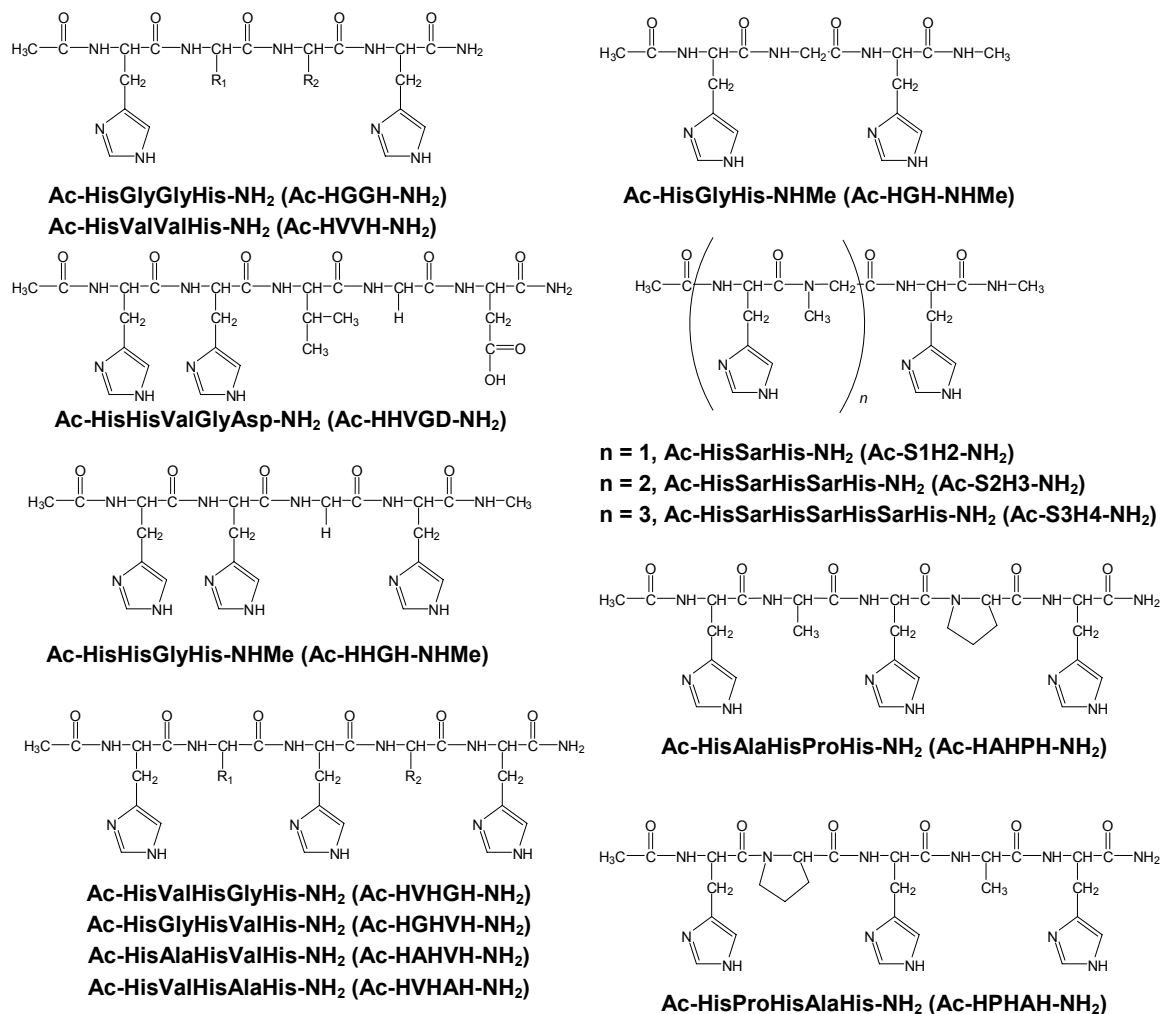
5.5. Több hisztidin hatása a terminálisan védett peptidok komplexképző sajátosságaira^{D1,D2,D22-D25}

A hisztidint tartalmazó peptidok vizsgálata – akár a nagyszámú irodalmi adatot, akár a fenti eredményeket tekintjük – egyértelműen tükrözi, hogy az N-terminális aminocsoportot tartalmazó peptidok fiziológiás pH tartományban keletkező fémkomplexeiben a peptidváz koordinációja a meghatározó, az imidazol-N kötődése az amidnitrogénekkel együtt valósul meg. Ugyanakkor azon metalloproteinekben, metalloenzimekben, ahol az aktív centrumban levő fémion megkötésében a szekvenciában levő hisztidin szerepet játszik, a koordináció általában egy vagy több hisztidin oldalláncon keresztül történik, és az adott molekularész nem tartalmaz terminális aminocsoportot. Ez azt jelenti, az N-terminálisan vagy N- és C-terminálisan védett peptidok komplexeinek szerkezete várhatóan jobban hasonlít egy adott enzim aktív centrumához, és akár enzimaktivitást is mutathat. A kutatócsoportunk együttműködése a Ioannina-i Egyetem (Görögország) Kémiai Tanszékén működő, *Prof. Nick Hadjiliadis* által vezetett kutatócsoportjával megteremtette a lehetőséget arra, hogy néhány peptidet én (Gly₃His, Gly₄His, Gly₅His) és számos további védett peptidet csoportunk tagjai állítsanak elő, ezzel megismerve és alkalmazva a szilárdfázisú peptidszintézist. Miután vizsgálataink elsősorban a CuZnSOD enzim aktív centrumának réz(II) és cink(II) kötőhelye (12. ábra) megismerésére irányultak, az előállított peptidok szekvenciáját ez alapján terveztük meg.

A legegyszerűbb, a Cu(II)-kötőhelynek megfelelő Ac-HisValHis-NH₂ (Ac-HVH-NH₂),¹⁷¹ Ac-HisGlyHis-NHMe (Ac-HGH-NHMe)¹⁷² peptidek és a Zn(II)-kötőhelynek megfelelő Ac-HisValGlyAsp-NH₂ (Ac-HVGD-NH₂)⁶¹ peptidek vizsgálata alapján azt állapították meg, hogy a hisztidinek imidazolgyűrűi szolgálnak elsődleges kötőhelyként és horgonycsoportként képesek elősegíteni az amidnitrogének deprotonálódását és koordinálódását. Ez azt jelenti, hogy a Cu(II)-Ac-HXH-NH₂ (X = V vagy G) rendszerben kialakul egy torzult szerkezetű, makrokelátot tartalmazó CuL komplex. Ennek az (Im(N),Im(N)) koordinációjú CuL komplexnek megnő a stabilitása, ami egyrészt kedvezőtlené teszi a bisz-komplexek képződését, másrészt gátolja az amidnitrogének deprotonálódását. Ez a folyamat Cu(II)-ion jelenlétében csak pH 6 felett játszódik le, és CuH₂L komplex uralkodik a fiziológiás pH tartományban, amelyben az (Im(N),N⁻,N⁻,Im(N)) donorcsoportokon keresztül kötődik a fémion szintén torzult geometriát eredményezve.

A cink(II)-kötőhelyet modellező peptid Zn(II)-komplexeiben az (Im(N),COO⁻) kötődésével makrokelátot tartalmazó komplex képződik a gyengén savas tartományban, ami azonban nem képes oldatban tartani a fémiont a fiziológiás és lúgos pH tartományban.

Ezek az előzmények jól tükrözték, hogy a két hisztidint tartalmazó peptidek fémkomplexei esetén megnő az oldalláncokon keresztül koordinálódó komplexek jelentősége, és gyengén savas tartományban döntő mennyiségben vannak jelen az oldatban. Ugyanakkor a fiziológiás pH tartományban réz(II)ion jelenlétében a peptidvázhhoz koordinálódott komplexek kerülnek előtérbe, míg cink(II)ion jelenlétében hidrolízis tapasztalható. A további cél tehát olyan peptidek szintézise volt, ahol az oldalláncan keresztül koordinálódó komplexek a fiziológiás pH tartományban (pH 6-8) is jelentős mennyiségben vannak jelen. Ha a CuZnSOD réz(II)- és cink(II)-kötőhelyét vizsgáljuk, az egyértelmű, hogy a kötődésben még egy hisztidin imidazol, illetve egy imidazolato-gyűrű N donoratomjai is részt vesznek, bár ezek a szekvenciában egymástól távol vannak (12. ábra). A fent vizsgált peptidekhez kapcsolt további hisztidinek azonban az enzimből kialakulóhoz hasonló koordinációs környezetet teremthetnek. Így, néhány két hisztidint tartalmazó peptid mellett további három vagy négy, különböző pozícióban hisztidint tartalmazó peptid szintézise történt meg, amelyek Cu(II)-, Ni(II)-, Cd(II)- és Co(II)-komplexeit tanulmányoztuk, de az eredmények bemutatását kiegészítem a Zn(II)-re kapott eredményekkel is.¹⁷³ A vizsgált peptidek szerkezeti képletét a 45. ábra mutatja be.

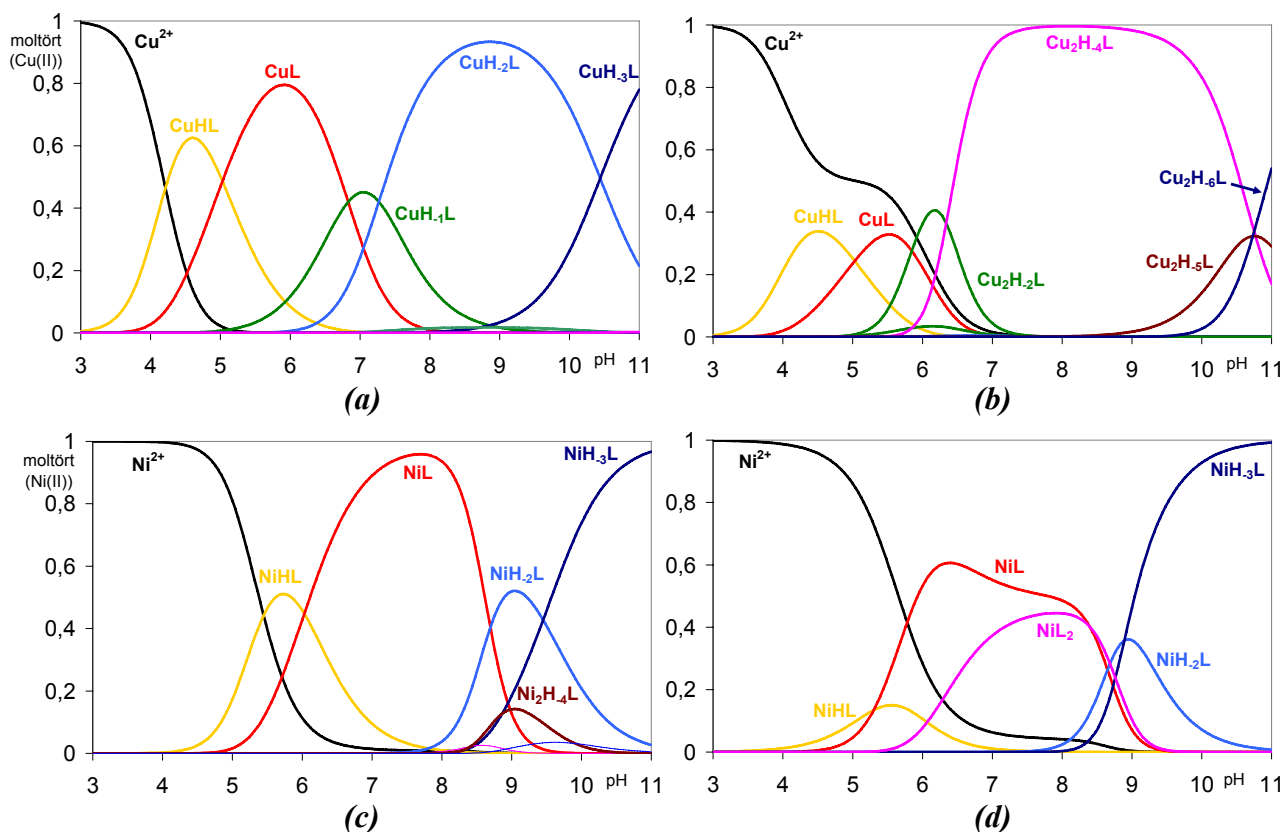


45. ábra A különböző két, három és négy hisztidint tartalmazó peptidek szerkezeti képlete

5.5.1. Két, három vagy négy hisztidint tartalmazó védett peptidek sav-bázis és komplexképző sajátságai

A tanulmányozott peptidek deprotonálódási állandóit a Melléklet M16. táblázata tartalmazza. Valamennyi peptid N- és C-terminálisan is védett, ennek megfelelően az oldalláncbeli donorcsoportokra jellemző állandók határozhatóak meg. Így az Ac-HHVGD-NH₂ peptidet leszámítva a pK értékek az imidazolcsoportokhoz rendelhetők. Ezek valamennyi vizsgált peptid esetén hasonló és egymáshoz közeli értékek, különbségük a statisztikai értéknek megfelelő 0,6 lg egység körül van. Ez arra utal, hogy az imidazolnitrogének deprotonálódása egymással átfedő lépésekben játszódik le. Az Ac-HHVGD-NH₂ ligandum esetén a legkisebb deprotonálódási állandó az oldalláncbeli karboxilátcsoportokhoz rendelhető, és ennek a csoportnak a deprotonálódása a savas tartományban, a hisztidin imidazolgyűrűk sav-bázis folyamataitól elkülönülő lépésben zajlik le.

A tanulmányozott multihisztidin peptidek különböző fémionokkal alkotott komplexeire vonatkozó stabilitási állandókat a Melléklet M17-M19. táblázatai tartalmazzák. A réz(II)- és nikkel(II)ionokat tartalmazó rendszerekben képződő komplexek összetételét és eloszlását a 46. ábrán levő eloszlások jól szemléltetik.

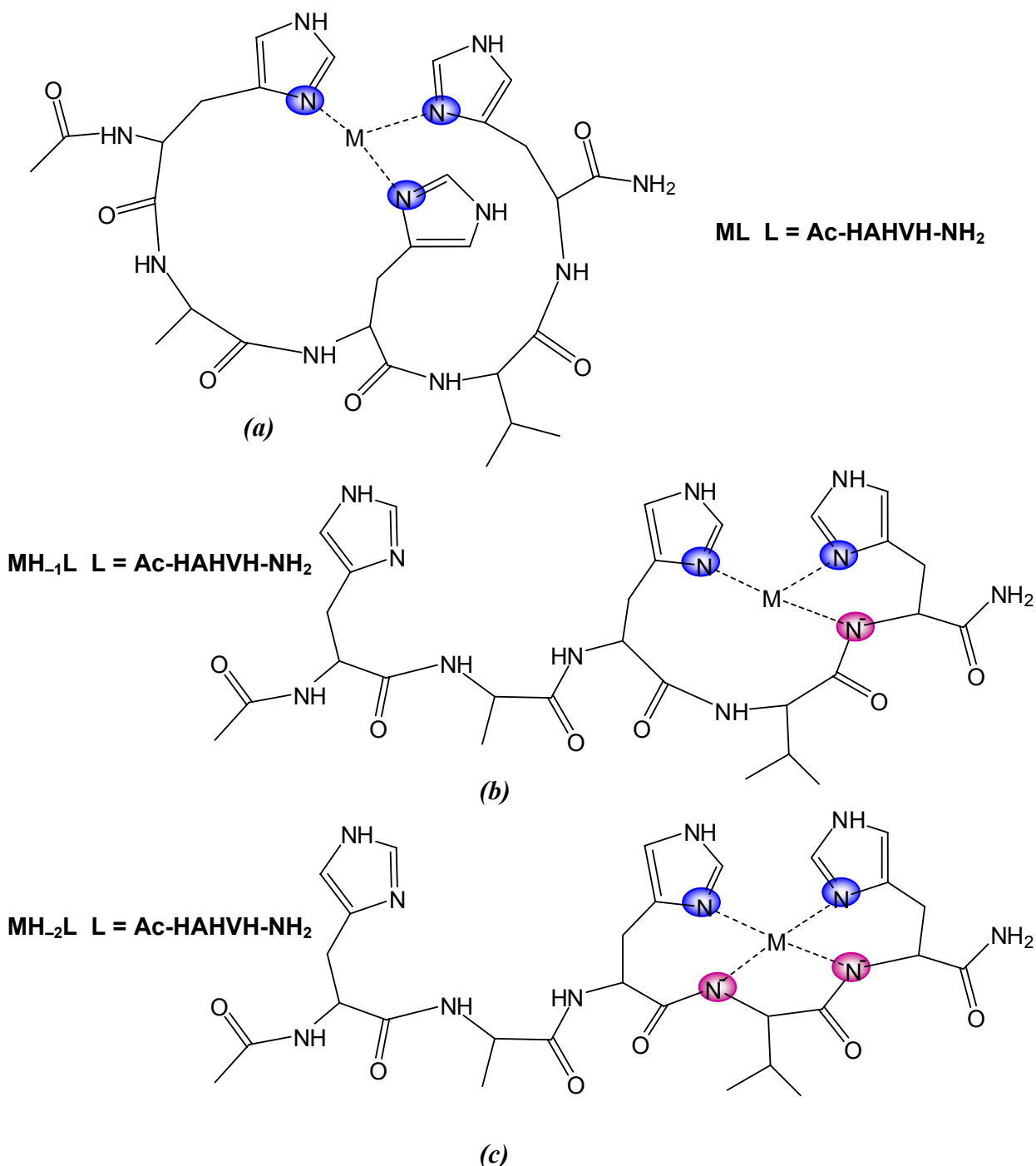


46. ábra A Cu(II)-Ac-HGHVH-NH₂ rendszerben 1:2 fémion-ligandum arányánál **(a)** és 2:1 fémion-ligandum arányánál **(b)**, valamint a Ni(II)-Ac-HGHVH-NH₂ rendszerben 1:2 fémion-ligandum arányánál **(c)** és a Ni(II)-Ac-HGH-NHMe rendszerben 1:2 fémion-ligandum arányánál **(d)** képződő komplexek eloszlása a pH függvényében ($c(L) = 4,00 \text{ mmol/dm}^3$)

Valamennyi vizsgált fémion esetén gyengén savas, illetve fiziológiás pH tartományban ML komplex van jelen. A komplexekben az oldalláncban jelenlevő valamennyi hisztidin imidazol-N kötődik a fémionhoz, a hisztidinek számától függően egy, két vagy három makroelátot létrehozva (46.a ábra). Ez a szerkezet stabilizálja az ML komplexet, így a Ni(II), Zn(II) és Co(II) lehetséges oktaéderes geometriája ellenére sem kedvező a bisz-komplexek képződése, ezt csak néhány két hisztidint tartalmazó peptid (46.d ábra), valamint a szarkozint tartalmazó Ac-S2H3-NH₂ peptid esetén figyeltük meg.

Az oldalláncbeli imidazolgyűrű azonban ezekben a peptidekben is képes horgonycsoportként elősegíteni a peptidnitrogének deprotonálódását és koordinálódását és MH₁L (47.b ábra)

(csak Cu(II)-ion esetén mutatható ki), MH_2L (47.c ábra), illetve erősen lúgos tartományban MH_3L komplexek képződnek.

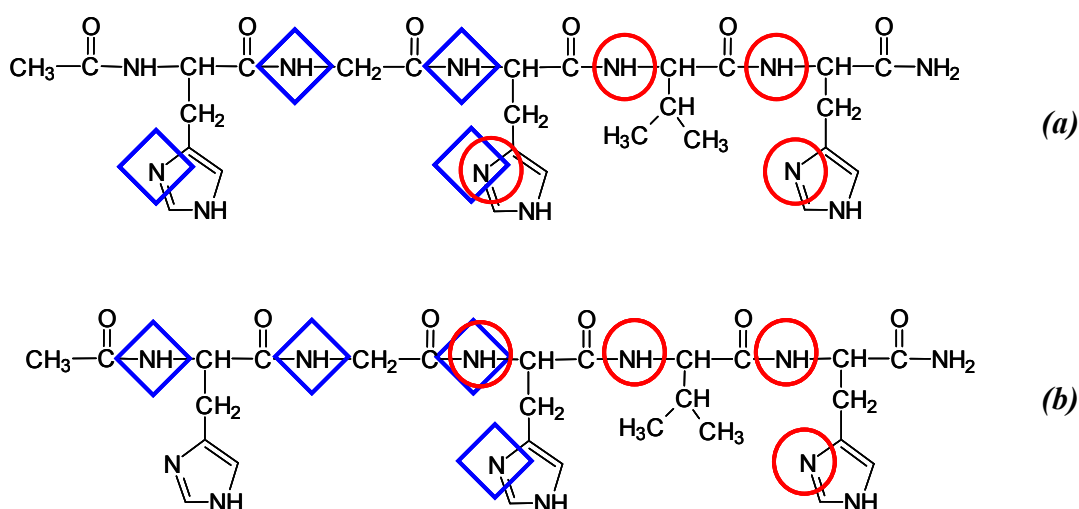


47. ábra Az Ac-HXHZH-NH₂ szekvenciájú peptidek esetén kialakuló komplexek egy-egy lehetséges szerkezetének sematikus ábrája

Az UV-látható, CD- és ESR-spektroszkópiás vizsgálatok alapján ezekben a komplexekben az imidazol-N és az azt megelőző egy, kettő vagy három amidnitrogén koordinálja a fémiont. Így

öttagú kelát, illetve (5,6)- és (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer alakul ki. Az MH_2L és MH_3L komplexekben azonban a szabadon maradt imidazol koordinációja is általában kimutatható (a HXXH szekvencia esetén nem minden esetben), ami egyrészt torzult geometriákhoz vezet, ugyanakkor stabilizáló hatása révén akadályozza a harmadik amidnitrogén deprotonálódását és koordinálódását.

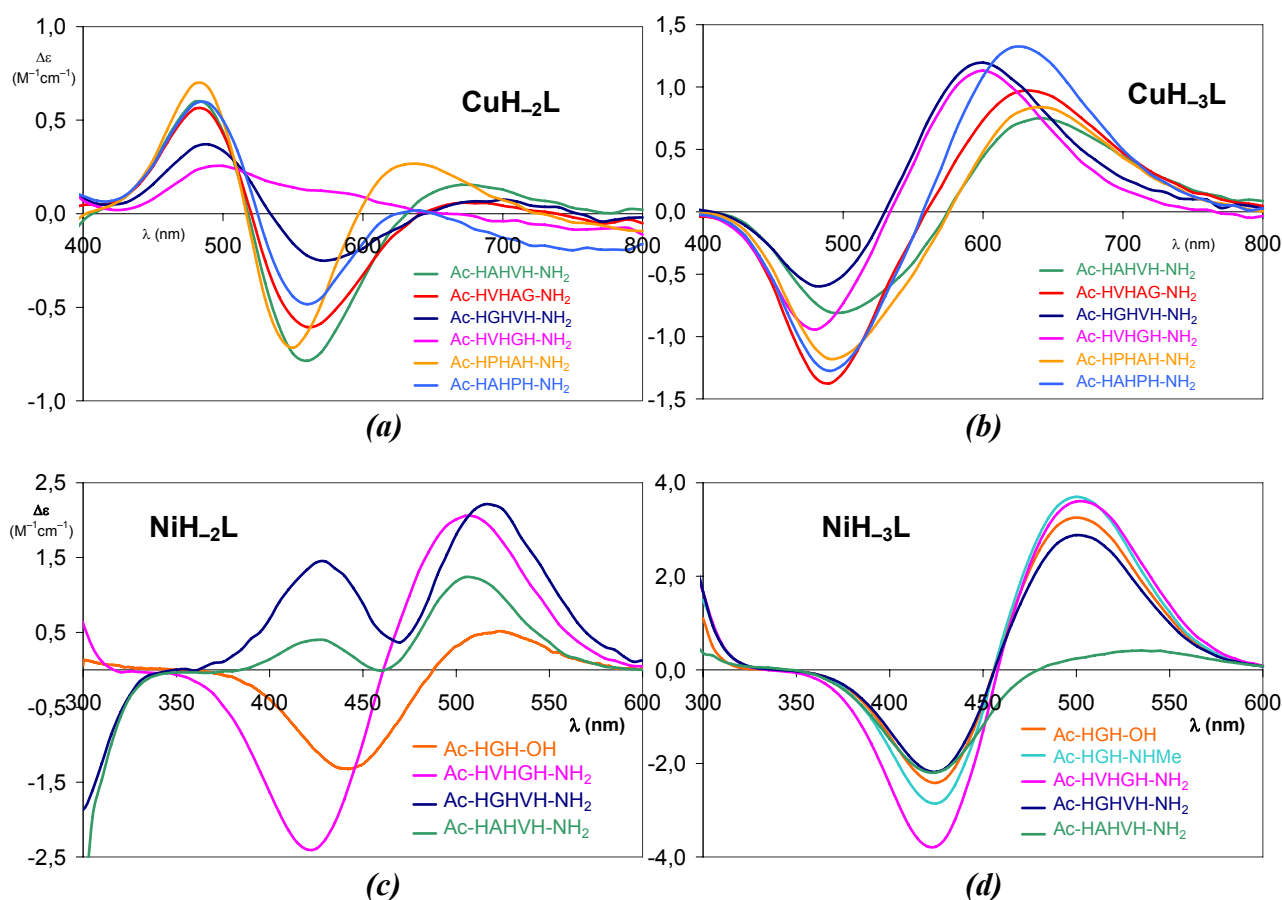
A molekulák szerkezete lehetővé teszi izomer komplexek képződését, a lehetséges kötőhelyeket szemlélteti a 48. ábra.



48. ábra A pentapeptidek lehetséges donorcsoportjai az MH_2L (a) és az MH_3L (b) komplexekben az Ac-HGHVH-NH₂ ligandumon szemléltetve

Ezt részletesen az Ac-HXHZZH-NH₂ (X, Z = Gly, Ala, Val, Pro, Sar) szekvenciájú peptidek réz(II)- és nikkel(II)-komplexeinél tanulmányoztuk. Az MH_2L komplexek számított egyedi CD spektrumainak összehasonlítása (49. ábra) alapján arra következtettünk, hogy annak az MH_2L izomer komplexnek a képződése kedvezőbb, ahol a fémion a molekula C-terminális részén kötődik, és legnagyobb arányú ez az izomer az Ac-HXHGH-NH₂ szekvencia esetén. Erre a C-terminálisan prolint, illetve glicint tartalmazó peptidek eltérő CD spektrumából következtethetünk mind a réz(II)- (49.a ábra), mind a nikkel(II)iont (49.c ábra) tartalmazó komplexek esetén, mivel az Ac-HAHPH-NH₂ peptidben ilyen izomer nem képződhet, míg a Ac-HVHGH-NH₂ ezen izomerje más CD-spektrummal jellemezhető.

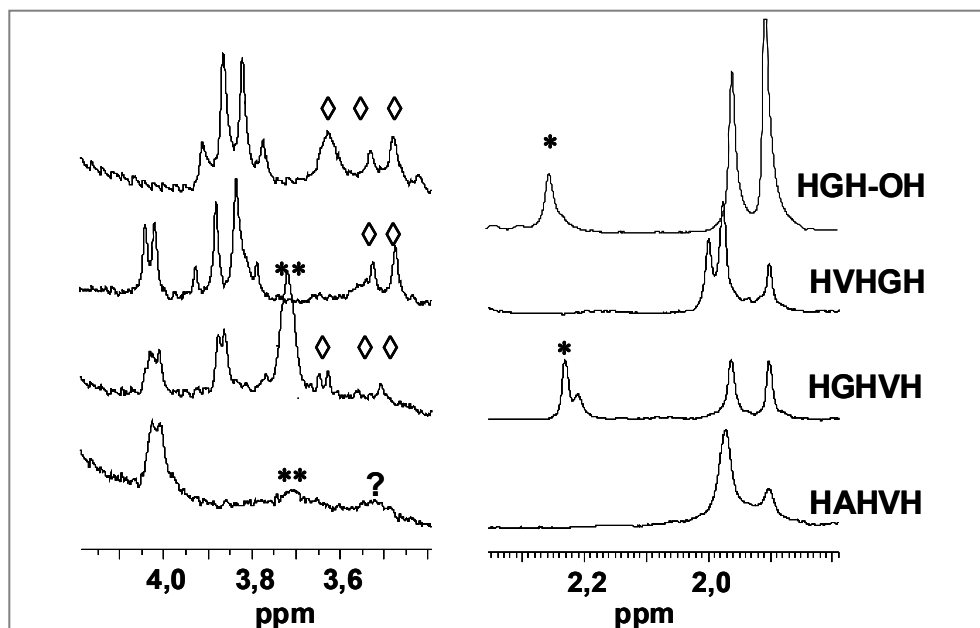
Az MH_3L komplexek esetén gyakorlatilag nincs különbség a kétféle izomer CD spektruma között (49.b,d ábra), így az izomerek aránya nem becsülhető meg.



49. ábra A CuH_2L (a), CuH_3L (b), NiH_2L (c), NiH_3L (d) komplexekre jellemző számított egyedi spektrumok a különböző pentapeptidek esetén

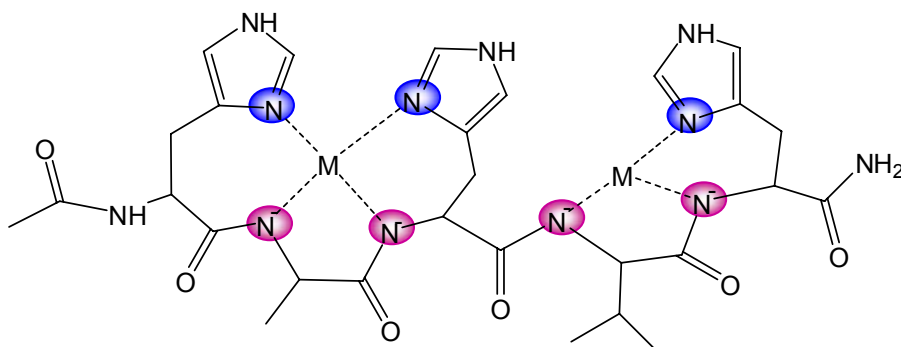
A NiH_3L komplex síknégyszetes geometriája ugyanakkor lehetővé teszi a különböző koordinációjú komplexek azonosítását. A szabad ligandum és a nikkel(II)-ligandum 1:2 arányú erősen lúgos oldatában ($\text{pH} > 11$) felvett ^1H NMR spektrumok azt igazolták, hogy valamennyi imidazol részt vesz a koordinációban, mivel az aromás tartományban a Ni(II) hozzáadására újabb jelek jelentek meg mindhárom hisztidin proton jelei mellett. Ez alátámasztja az izomerek keletkezését. A ligandumok alifás részeit jellemző jelcsoportok változása is ezt igazolja. Az 50. ábrán bemutatott spektrumrészleteken a „ $\diamond$ ” szimbólum a kisebb ppm értékek fél tolódott glicin proton jeleit, a „*” szimbólum az eltolódott acetamidocsoport metil protonjainak eltolódott jeleit, míg „**” szimbólum a valinrész metinprotonjainak eltolódott jeleit mutatják. Az Ac-HVHGH-NH_2 nikkel(II)-komplexei esetén csak a glicin jeleinek eltolódása figyelhető meg, az Ac-HGHVH-NH_2 peptidnél ugyanakkor a valin, a glicin, illetve az acetamidocsoport protonjaihoz tartozó jelek is eltolódnak. Ez összhangban van azzal az MH_2L komplexeknél tett megállapítással, hogy az

Ac-HXHGH-NH₂ szekvenciánál gyakorlatilag csak egyféle izomer komplex van jelen. Ha azonban a nagyobb térkitöltésű valin található a C-terminális részen, akkor mindkét izomer megjelenik. A valin-, glicin és acetamido metilprotonok integráljai alapján a C-terminális és az N-terminális részen koordinálódó izomerek arányára becslés is tehető, az adatok alapján ez 83 : 17 %-nak adódott. Hasonló következtetésre jutottunk az Ac-HAHVH-NH₂ peptid esetén is, de ott a számszerű becslést a spektrumok rossz felbontása nem tette lehetővé.



50. ábra A Ni(II)-ligandum rendszerek 1:2 aránynál felvett ¹H NMR spektrumai (c(L) = 0,010 mol/dm³)

A több hisztidin jelenléte a molekulában az izomerek képződése mellett több fémion megkötésére is lehetőséget ad. A fémionfeleslegnél végzett pH-potenciometriás, ESR és CD-spektroszkópiás mérések igazolják azt, hogy lúgos tartományban a kétmagvú komplexek az uralkodóak (46.b ábra).



51. ábra A pentapeptidek esetén keletkező M₂H₄L komplex sematikus szerkezete

A ligandum mind a C-terminális, mind a közbenső hisztidin révén képes egy-egy fémiont megkötni, az 51. ábra a lúgos tartományban uralkodó komplex sematikus szerkezetét mutatja be.

A másik négy vizsgált fémion esetén az amidnitrogének deprotonálódása és koordinálódása egyik esetben sem figyelhető meg, a pH emelésével hidrolízis és csapadékképződés tapasztalható.

5.5.2. Az oldalláncon keresztül koordinálódó komplexek stabilitását befolyásoló tényezők

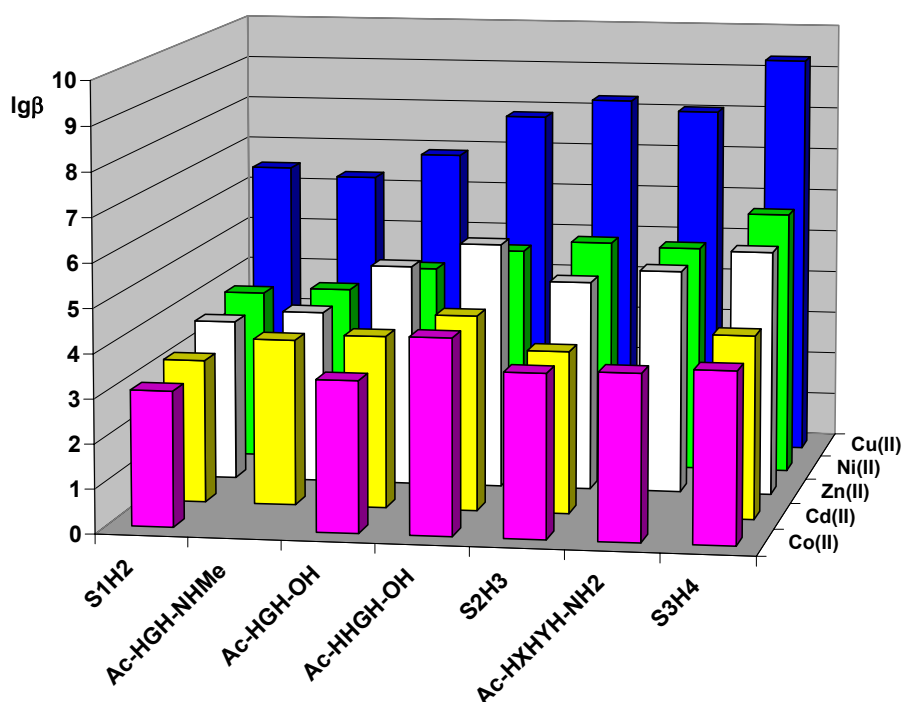
A fenti eredmények egyértelműen tükrözik, hogy bár az oldalláncon keresztül koordinálódó komplexek stabilitása növekszik, és jelenlétük meghatározó a komplexképződési folyamatokban, a hisztidin imidazolcsoportja horgonycsoportként képes elősegíteni a peptidnitrogének deprotonálódását és koordinálódását, és lúgos tartományban a peptidváz koordinációja a meghatározó. Miután a CuZnSOD enzim modellezése szempontjából az oldalláncbeli imidazolgyűrűk kötődésével képződő komplexek a jelentősek, ezért ezek a komplexek külön figyelmet érdemelnek abban a tekintetben is, hogy milyen tényezők és hogyan befolyásolják a komplexek képződését és stabilitását.

- *A fémion minősége*

Valamennyi vizsgált fémion esetén megjelennek a csak hisztidin oldalláncon keresztül koordinálódó komplexek a fémiontól függően a gyengén savas vagy fiziológiás tartományban. A 46.a és c ábra jól szemlélteti, hogy míg a CuL komplex a pH 5-7 tartományban uralkodó, addig a NiL a pH 6,5-8,5 tartományban van nagy mennyiségben jelen. A különböző fémkomplexek stabilitásában mutatkozó tendenciát jól szemlélteti az 52. ábra, amely a különböző peptidek ML komplexeinek stabilitását ábrázolja a vizsgált fémionok esetén. A keletkező komplexek stabilitása a Cu(II) > Ni(II) > Zn(II) > Co(II) ~ Cd(II) sorrendben csökken, ami a 3d átmenetifém-ionok tekintetében megfelel az Irving-Williams sornak.

- *A C-terminális karboxilátcsoport jelenléte*

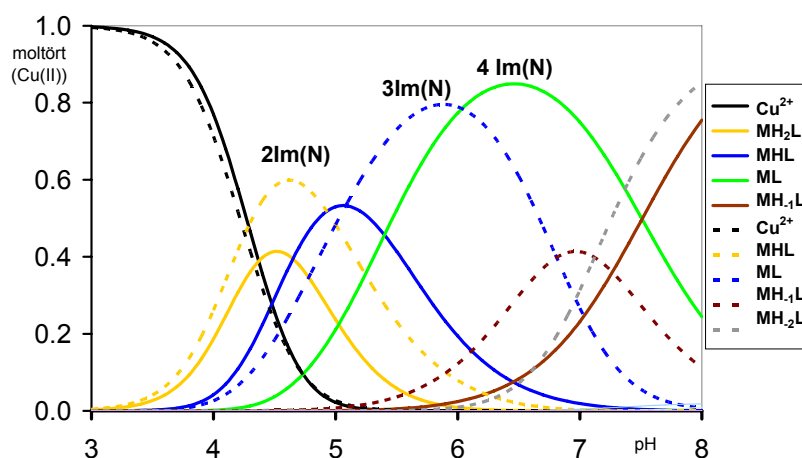
A két C-terminális karboxilcsoportot tartalmazó peptid (Ac-HGH-OH és Ac-HHGH-OH) Zn(II) és Ni(II) komplexének stabilitása esetén megfordul a fenti sorrend (52. ábra), ami arra utal, hogy a C-terminális karboxilátcsoport szerepe a fémion megkötésében¹⁷³ nagyobb mértékű a cink(II) esetén.



52. ábra A védett hisztidintartalmú peptidek ML komplexének stabilitása ($\lg\beta$) a vizsgált fémionok esetén (Zn(II) adatok: [173] hivatkozás)

- A peptidben levő hisztidinek száma*

A peptidben levő hisztidinek, azaz a koordinációban résztvevő imidazol-N donatoratomok számának növekedése minden fémion esetén növeli az ML komplex stabilitását. Ez a tendencia szintén jól tükröződik az 51. ábrán. A fémionhoz koordinálódó imidazol-N atomok számának növekedésével egyúttal a komplex képződése egyre nagyobb pH tartományba tolódik (53. ábra), így az Ac-S3H4-NH₂ peptid 4 Im(N) koordinációjú réz(II) komplexe már a fiziológiás pH tartományban uralkodó komplex.



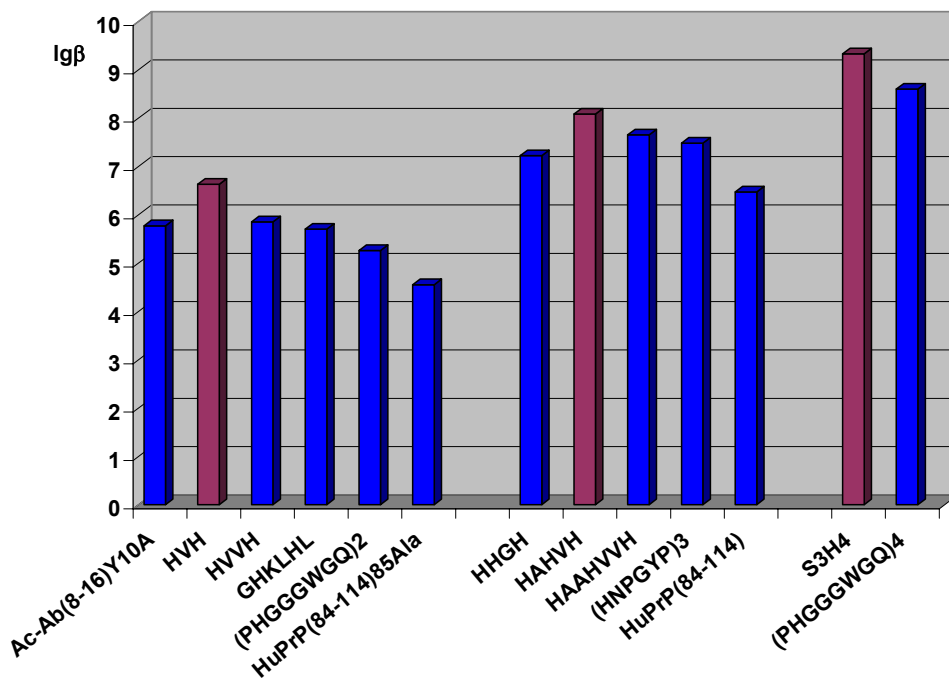
53. ábra A Cu(II)-Ac-S3H4-NH₂ (folytonos vonal) és a Cu(II)-Ac-HAHVH-NH₂ (szaggatott vonal) ekvimoláris oldatában keletkező komplexek eloszlása a pH függvényében

- *A hisztidinek közötti aminosav minősége*

Az imidazol koordinációjú komplexek a pH emelésével átalakulnak, vagy lejátszódik az amidnitrogének deprotonálódása és koordinálódása vagy hidrolízis történik. Az amidnitrogének deprotonálódását azonban akadályozza a peptidláncba beépített prolin, illetve szarkozin. Ennek következtében réz(II) és nikkel(II) esetén a fenti átalakulások nagyobb pH tartományba tolódnak, az imidazol kötődésű komplexek stabilitása kismértékben nő és a komplexek szélesebb pH tartományban vannak jelen.

- *A hisztidinek közötti aminosavak száma*

A két, három, illetve négy imidazolgyűrű ugyanahhoz a fémionhoz kötődik, ami makrokelátok kialakulását eredményezi. Ezeknek a makrokelátoknak a mérete a hisztidinek közötti aminosavak számától függ. Az egymás melletti hisztidinek esetén a viszonylag kis tagszámú, a távollevő hisztidinek esetén pedig a túl nagy tagszámú makrokelát képződése sztérikusan kedvezőtlenebb. Ennek a hatását jól szemlélteti az 54. ábra, ami a két, három és négy hisztidint tartalmazó CuL komplexek stabilitását mutatja. Az ábráról az is jól látható, hogy a legkedvezőbb a makrokelát mérete és legnagyobb a keletkező komplex stabilitása a HXH szekvenciát tartalmazó peptidek esetén.



54. ábra Két, három és négy hisztidint tartalmazó védett peptidek CuL komplexeinek stabilitása ($\lg\beta$) (hivatkozott adatok: Ac-A β (8-16)Y10A: [174]; HVH: [171]; HVVH, HAAHVH: [175]; GHKLHL: [176]; (PHGGGWGQ)₂: [177]; HuPrP(84-114)85Ala, HuPrP(84-114): [65]; HHGH: [172]; (HNPGYP)₃: [178])

Összegezve a védett hisztidintartalmú peptidekkel kapott eredményeket, megállapítható, hogy az oldalláncbéli imidazolgyűrűk koordinálódásával kialakuló komplexek stabilitása nagy és mennyiségük a gyengén savas, illetve fiziológiás pH tartományban jelentős. A réz(II) és nikkel(II) ugyanakkor ezekben a peptidekben is indukálja a peptidnitrogének deprotonálódását és kötődését, de a peptidváz koordinálódásával kialakuló komplexek képződése a nagyobb pH tartományba tolódik. A két, három, illetve négy imidazol koordinált réz(II)-komplexek szerkezetükben hasonlóságot mutatnak a CuZnSOD enzim aktív centrumában levő réz(II) koordinációs módjához. Az enzimben a réz(II) kötőhelyeként megjelenő HVH fragmenshez hasonló HXH szekvenciát tartalmazó peptidek esetén pedig stabilitásnövekedés figyelhető meg a többi peptidhez képest. Annak eldöntésére, hogy ezek a Cu(II)-peptid komplexek a szerkezeti hasonlóság mellett funkcionálisan is mutatnak-e hasonlóságot a CuZnSOD enzimhez, további elektrokémiai és SOD aktivitás vizsgálatokat végeztünk.

5.6. Az imidazol koordinációjú réz(II)-komplexek elektrokémiai vizsgálata^{D26}

A réz(II)-komplexek ciklikus voltammetriás vizsgálata, a redoxi paraméterek meghatározása információt szolgáltat arra vonatkozóan, hogy az adott komplex megfelelően modellezheti a CuZnSOD enzimet, a jellemző redoxipotenciál érték beleesik-e a (8),(9) egyenletekre jellemző potenciáltartományba.

Számos réz(II)-komplex elektrokémiai vizsgálatát végezték el, néhány réz(II)-ligandum rendszer vizes oldatában mért értékét foglalja össze a 17. táblázat. A táblázat adatai alapján megállapítható, hogy a redoxipotenciál értékek széles tartományt fognak át. Általában a monodentát módon aromás nitrogéneken keresztül kapcsolódó egyszerű ligandumok (piridin, imidazol)¹⁷⁹ réz(II) komplexeire pozitív érték jellemző, ami a réz(II) könnyebb redukálhatóságára utal. Ugyancsak ez jellemzi azokat a peptid-komplexeket is, amelyekben a fémion az oldalláncbéli imidazolhoz kötődik (ciklo(GH)₄, ciklo(GHG)₂).¹⁸⁰ Ha a molekulában levő terminális aminocsoport vagy oldalláncbéli karboxilátcsoport is részt vesz a fémion koordinálásában, ez a redoxipotenciál értékek csökkenéséhez vezet (ciklo(L-aszpartil-L-aszpartil)-bisz-hisztamin).¹⁸¹ Jelentősen csökken a redoxipotenciál érték, ha Cu(II)-peptid komplexekben az amidnitrogén koordinálódása is megvalósul.

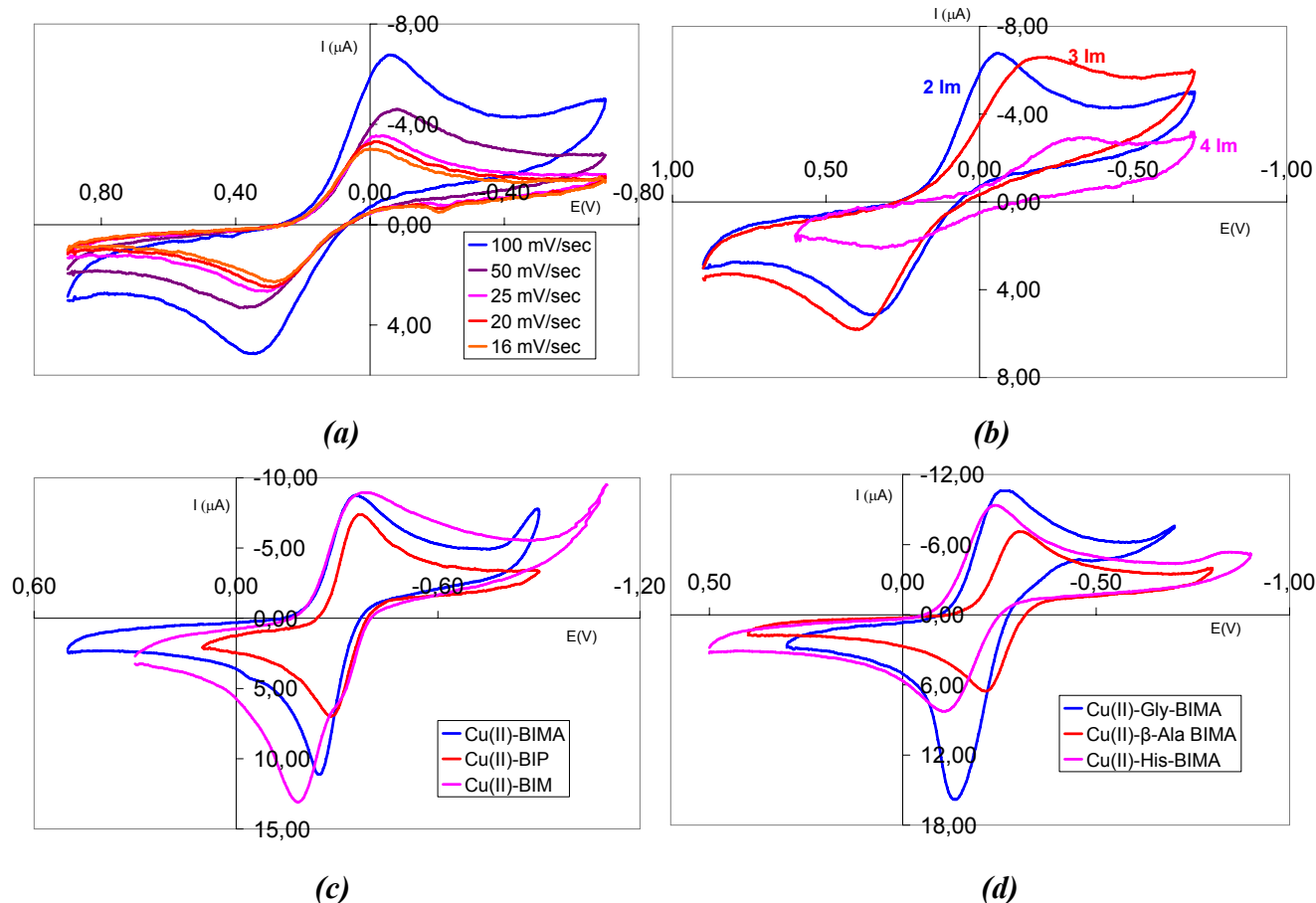
17. táblázat Különböző típusú ligandumok réz(II)-komplexeinek redoxipotenciál értékei

Ligandum	redoxipotenciál értékek	vonatkoztatási elektród	hivatkozás
Orto-hidroxi Schiff-bázis komplexek	-1,015 – (-0,875) V	SCE	182
Makrociklusos ligandumok	-0,850 – (-0,440) V	SCE	183-186
Benzimidazol-csoporttal szubsztituált ciklononán származékok	-0,150 – (+0,110) V	NHE	187
2,2'-bipiridil származékok	+0,200 – (+0,800) V	NHE	179
Egyszerű dipeptidek	-0,255 – (-0,190) V	SCE	188
Nem koordinálódó oldalláncot tartalmazó aminosavak	-0,170 – (-0,130) V	NHE	179
Ciklo(L-aszpartil-L-aszpartil)-bisz-hisztamin	-0,030 V	SCE	181
Ciklo(L-glutamil-L-glutamil)-bisz-hisztamin	+0,100 V	SCE	181
Ciklo(GH) ₄	+0,195 V	NHE	180
Ciklo(GHG) ₂	+0,219 V	NHE	180
Hisztidin	-0,170 V	NHE	179
Piridin	+0,240 V	NHE	179
Imidazol	+0,317 V	NHE	179
Hisztidintartalmú peptidek			
GH, GHG, GHL, GGH	-0,220 – (-0,120) V	SCE	189,190
Ac-HGGG-NH ₂	-0,299 – (-0,270) V	NHE	191
Ac-GGGTH-NH ₂	+0,040 V	Ag/AgCl	192
Ac-(PHGGGWGQ) _n -NH ₂ (n = 1,2,4)	-0,530 – (-0,299) V	NHE	186,191

Ezek az irodalmi adatok összhangban vannak azzal, hogy az általunk vizsgált réz(II)-komplexek közül az imidazol koordinációjú komplexek jöhetnek szóba, mint alkalmas modellkomplexek.

A CuZnSOD enzim aktív centrumában (12. ábra) levő Cu(II) koordinációs környezetéhez hasonlóan két, három, illetve négy imidazol-N kötődése valósul meg egyrészt a különböző bisz(imidazol-2-il) származékok bisz-komplexeiben, valamint a több hisztidint tartalmazó védett peptidek CuL komplexeiben. Az imidazolató gyűrű kötődését és imidazolató-hidas szerkezetet pedig néhány bisz(imidazol-2-il) származék réz(II)-komplexében mutattunk ki. A ciklikus voltammetriás vizsgálatok során viszont csak nagy ligandumfelesleg alkalmazásával kaptunk értékelhető görbéket, így a bisz-ligandumú bisz(imidazol-2-il) koordinációjú Cu(II)-

komplexek és a peptidek CuL komplexeinek elektrokémiai paramétereit határoztuk meg. Az 55. ábra a különböző pásztázási sebességnél, illetve különböző rendszerekben felvett ciklikus voltammogramokat mutatja be.



55. ábra A különböző réz(II)-ligandum rendszerekben felvett ciklikus voltammogramok:

Cu(II)-Ac-HHVGD-NH₂ (1:5 arány, pH = 5,3) rendszer voltammogramjai különböző pásztázási sebességnél **(a)**; 2 Im(N) (Cu(II)-Ac-HHVGD-NH₂, 1:5 arány, pH = 5,30), 3 Im(N) (Cu(II)-Ac-HVHGH-NH₂, 1:5 arány, pH = 5,11) és 4 Im(N) (Cu(II)-Ac-S3H4-NH₂, 1:7 arány, pH = 7,38) koordinációjú komplexek voltammogramja **(b)**; az egyszerű bisz(imidazol-2-il) származékok CuL₂ komplexeinek voltammogramjai **(c)**; az aminosav-BIMA származékok CuH₂L₂ komplexeinek voltammogramjai **(d)**

A kapott paraméterek alapján megállapítható volt, hogy valamennyi rendszerben egyelektronos, kvázireverzibilis folyamat játszódik le. A katódos és anódos csúcsáram aránya általában 1 körüli érték, bár a bisz(imidazol-2-il) származékoknál néhány kiugró értéket is kaptunk, de mind a többi származéknál kapott voltammogramban (55.c,d ábra), mind a meghatározott redoxipotenciál értékekben mutatkozó hasonlóság alapján ezekben az esetekben is kvázireverzibilis folyamatot feltételezünk. Az anódos és katódos csúcs távolsága 59 mV-nál nagyobb volt, ami a Cu(II) körüli geometria átrendeződésének lehet a

következménye, de általában megfelelt az irodalomban közölt eredményeknek (~180 mV). A nagyobb peptidek esetén azonban ennél nagyobb csúcscszeptaráció figyelhető meg, ami valószínűleg az elektród felületén lejátszódó lassú elektrontranszfer folyamatoknak köszönhető.¹⁹³ Ezt igazolja az, hogy a két csúcs közötti különbség csökken a pásztázási sebesség csökkentésével (55.a ábra), miközben a görbe alakja és a leolvasott értékek nem változnak.

A különböző ligandumokra kapott jellemző elektrokémiai paramétereket az alábbi táblázatok foglalják össze. A 18. táblázat a hisztidintartalmú peptidek CuL komplexeire, a 19. táblázat a peptidek, míg a 20. táblázat a bisz(imidazol-2-il) származékok bisz-komplexeire vonatkozó értékeket tartalmazza.

18. táblázat A védett hisztidintartalmú peptidek CuL komplexeire jellemző elektrokémiai

Ligandum	E_{pc} (V)	E_{pa} (V)	i_a/i_k	Koordinációs mód	E^0 (vs. NHE)
Ac-HVVH-NH ₂	+0,0741	+0,287	0,96	2 × Im(N)	+0,389(2) V
Ac-HGGH-NH ₂	+0,0786	+0,278	0,99	2 × Im(N)	+0,390(2) V
Ac-HHVGD-NH ₂	-0,0148	+0,292	0,94	2 × Im(N)	+0,346(5) V

paraméterek

Ac-HGH-NHMe	-0,0023	+0,273	0,96	2 × Im(N)	+0,351(7) V
Ac-HHGH-NHMe	-0,0554	+0,263	1,16	3 × Im(N)	+0,313(6) V
Ac-HVHGH-NH ₂	-0,137	+0,348	1,15	3 × Im(N)	+0,311(3) V
Ac-HAHPH-NH ₂	-0,273	+0,338	1,05	3 × Im(N)	+0,244(3) V
Ac-HAHVH-NH ₂	-0,0226	+0,189	0,96	3 × Im(N)	+0,295(3) V
Ac-S2H3-NH ₂	-0,0725	+0,241	1,22	3 × Im(N)	+0,293(10) V
Ac-HVHAH-NH ₂	-0,148	+0,258	1,06	3 × Im(N)	+0,253(9) V
Ac-S3H4-NH ₂	-0,365	+0,352	0,81	4 × Im(N)	+0,194(14) V

19. táblázat A védett hisztidin és hisztidintartalmú peptidek CuL_2 komplexeire jellemző elektrokémiai paraméterek

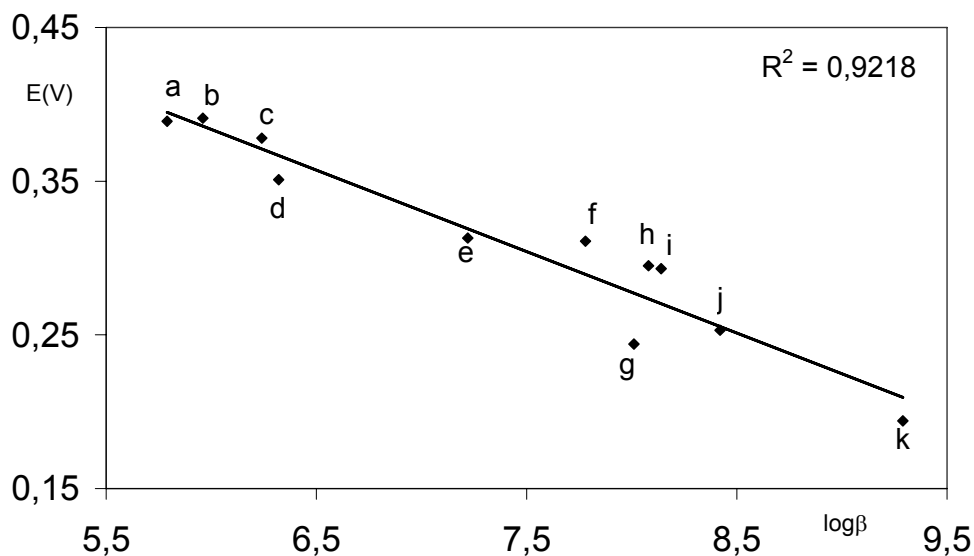
Ligandum	E_{pc} (V)	E_{pa} (V)	i_a/i_k	Koordinációs mód	E^0 (vs. NHE)
N-Ac-Histamine	+0,0169	+0,151	0,97	$2 \times \text{Im(N)}$	+0,296(3) V
N-Ac-Histidine	+0,0416	+0,217	0,89	$2 \times \text{Im(N)}$	+0,338(1) V
Ac-HVVH-NH ₂	-0,0443	+0,216	0,90	$2 \times (\text{Im(N)}, \text{Im(N)})$	+0,339(6) V
Ac-HGGH-NH ₂	+0,0302	+0,239	0,96	$2 \times (\text{Im(N)}, \text{Im(N)})$	+0,341(3) V
Ac-HGH-NHMe	-0,0454	+0,201	1,03	$2 \times (\text{Im(N)}, \text{Im(N)})$	+0,287(1) V
Ac-S1H2-NH ₂	-0,0389	+0,225	0,67	$2 \times (\text{Im(N)}, \text{Im(N)})$	+0,303(2) V

20. táblázat A bisz(imidazol-2-il) származékok bisz-komplexeire jellemző elektrokémiai paraméterek

ligandum	E_{pc} (V)	E_{pa} (V)	i_a/i_k	komplex	E^0 (vs. NHE)
BIM	-0,377	-0,183	0,68	CuL_2	-0,075(5) V
BIMA	-0,356	-0,246	1,40	CuL_2	-0,091(1) V
BIP	-0,372	-0,283	1,10	CuL_2	-0,118(3) V
Z-Gly-BIMA	-0,280	-0,016	0,61	CuL_2	+0,055(6) V
Z-Ala-BIMA	-0,449	-0,043	1,66	CuL_2	-0,037(9) V
Gly-BIMA	-0,267	-0,134	1,70	CuH_2L_2	+0,008(2) V
Gly-BIMA	-0,321	-0,212	1,40	CuL_2	-0,056(7) V
β -Ala-BIMA	-0,309	-0,213	1,03	CuH_2L_2	-0,051(2) V
β -Ala-BIMA	-0,342	-0,152	1,16	CuHL_2	-0,037(2) V
His-BIMA	-0,241	-0,101	0,99	CuH_2L_2	+0,038(2) V
His-BIMA	-0,282	-0,142	1,10	CuL_2	-0,002(2) V

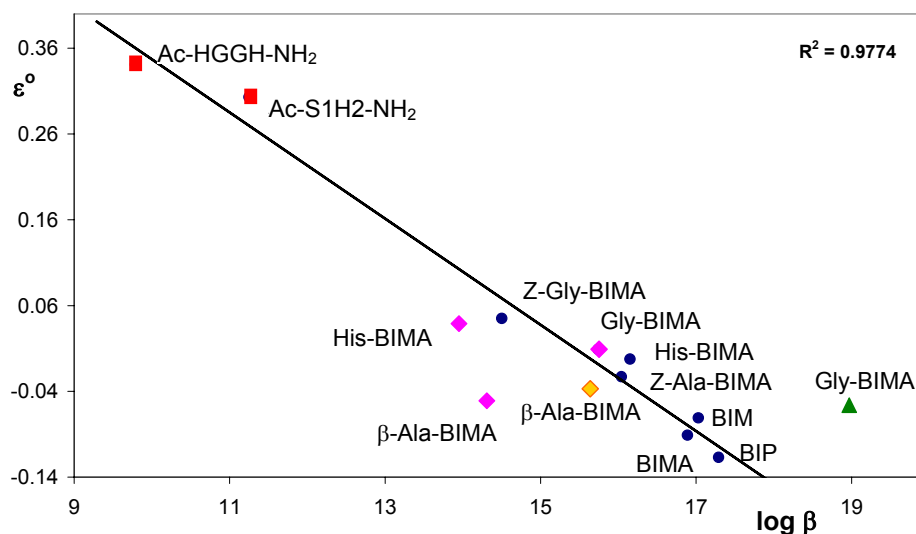
A meghatározott értékek a peptidek réz(II)-komplexei esetén a pozitív tartományba esnek, míg a bisz(imidazol-2-il) származékokra ~ 0 körüli értékek vonatkoznak. A hisztidintartalmú peptidek CuL komplexei esetén a koordinálódott imidazol-N donoratomok számának

növekedésével az értékek kismértékű csökkenését tapasztaljuk. Ezt jól szemlélteti az 55.b ábra is, ahol megfigyelhetjük a 2 Im(N), 3 Im(N) és 4 Im(N) koordinációjú komplexekre jellemző voltammogramok fokozatos eltolódását a negatívabb potenciáltartományba. Ez összhangban van azzal, hogy a stabilitás növekedése a réz(II) redukálhatóságát csökkenti. Ez a tendencia még inkább kifejezésre jut, ha a komplexek stabilitásának a függvényében ábrázoljuk a redoxipotenciál értékeket (56. ábra).



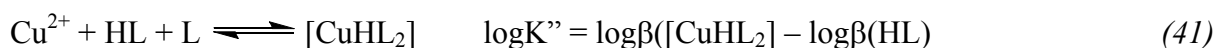
56. ábra A védett hisztidintartalmú peptidek CuL komplexeinek redoxipotenciál értéke a stabilitási állandóik ($\lg\beta$) függvényében: Ac-HVVH-NH₂ (a); Ac-HGGH-NH₂ (b); Ac-HHVGD-NH₂ (c); Ac-HGH-NHMe (d); Ac-HHGH-NHMe (e); Ac-HVHGH-NH₂ (f); Ac-HAHPH-NH₂ (g); Ac-HAHVH-NH₂ (h); Ac-S2H3-NH₂ (i); Ac-HVHAH-NH₂ (j); Ac-S3H4-NH₂ (k)

A peptidek bisz-komplexeinél ilyen egyértelmű tendenciát nem állapítottunk meg. A komplexekre 0,30 V körüli redoxipotenciál érték a jellemző. Ugyanakkor jelentős eltérés figyelhető meg a bisz(imidazol-2-il) származékok bisz-komplexeitől, holott minden esetben 4 imidazolgyűrű kötődik a réz(II)ionhoz. Ez a különbség a ciklikus voltammogramoknál is észrevehető (55.c,d ábra), a bisz(imidazol-2-il) rendszerek esetén kapott görbék jelentősen a negatívabb potenciáltartományba tolódnak. A peptidek komplexeiben kialakuló makrokelát jóval nagyobb flexibilitású szerkezetet eredményez, ami a központi fémion redukciójának kedvez, míg a bisz(imidazol-2-il)-szerű koordináció révén létrejövő két hattagú kelát merev, stabilis szerkezetet biztosít az adott részecskének. Így ezeknek a komplexeknek a redukálhatósága csökken. A stabilitás és a redoxipotenciál közötti összefüggés a két ligandumtípus esetén általánosan jellemző, amit az 57. ábra mutat be.



57. ábra A vizsgált ligandumok bisz-komplexeinek redoxipotenciál értéke a stabilitási állandó logaritmusában függvényében (♦ CuH_2L_2 , ♦ CuHL_2 , ■, ●, ▲ CuL_2)

A protonált komplexek esetén az alábbi képződési folyamatra vonatkozó állandóval számoltunk, ezt jelzik a rózsaszín és sárga jelek.



Általánosan megfigyelhető az a tendencia, hogy mindkét ligandum típus esetén a bisz-komplexek stabilitási állandója logaritmusának értékével egyenes arányban csökken a redoxipotenciál értéke. Elterést a protonált komplexek esetén tapasztalunk, ami a komplexek töltésbeli különbségével értelmezhető. Ugyanakkor a Gly-BIMA CuL_2 komplexére jellemző érték kívül esik ettől a tendenciától, amit egyértelműen az eltérő kötőmód magyaráz, mivel ebben a komplexben nem bisz(imidazol-2-il)-szerű koordináció valósul meg, a komplex összetétele valójában $\text{Cu}(\text{H}_1\text{L})\text{L}$ formában adható meg.

Összegezve az eredményeket, arra következtethetünk, hogy az imidazol-N koordinációjú komplexek a meghatározott elektrokémiai paraméterek alapján alkalmasak lehetnek a CuZnSOD enzim modellezésére, mivel valamennyi vizsgált esetben a (8), (9) egyenletekben szereplő értékek közé esnek a redoxipotenciál értékek. Ugyanakkor a komplexek redukálhatóságát jelentősen befolyásolja a komplex szerkezetének merevsége, illetve flexibilitása, így a nagyobb redoxipotenciállal jellemezhető peptid-komplexek ígéretesebbek az enzim modellezése szempontjából, mint a merev szerkezetű bisz(imidazol-2-il) komplexek, amelyekre jellemző redoxipotenciál érték az adott potenciáltartomány alsó határához esik közel. A biztos választ ezekre a feltételezésekre a komplexek SOD aktivitás vizsgálatai adták meg.

5.7. Szuperoxid-diszmutáz aktivitás vizsgálatok

A CuZnSOD enzim modellezésére az utóbbi években számos komplexet állítottak elő. A vizsgált enzimmodellek egyik csoportját jelentik azok a komplexek, amelyekben a fémionok körüli geometriát igyekeztek megvalósítani, az enzim szerkezetét és működését próbálták modellezni.

Ezen modellek egyik típusát jelentik azok a rendszerek, amelyekben a hangsúlyt a két fémiont hídként összekötő imidazolra helyezték, és ez a hídszerkezet az enzim működési pH tartományában stabilis. A legtöbb ilyen jellegű komplexben mindkét fémion réz(II), így a részecskék a $\text{Cu}_2\text{L}_n(\text{HL}_1\text{imidazol})$ ($n = 1,2$) általános képlettel jellemezhetők. A legegyszerűbb ilyen komplexekben az L ligandum valamilyen dipeptid¹⁹⁴ vagy poliamin,¹⁹⁵ de jelentősebb SOD aktivitást akkor tapasztaltak, amikor az L ligandum valamilyen makrociklus vagy makrobiciklus.¹⁹⁶⁻²⁰¹ Ezekben a szerkezetekben a réz(II)ion körül négy vagy öt donoratomb helyezkedik el, tetragonális, trigonális-bipiramisos vagy tetragonális-piramisos geometriával. Ez utóbbi megfelel a természetes enzimben található geometriai elrendeződésnek, így nem meglepő, hogy az ilyen elrendeződésű szerkezetek esetén mérték a legnagyobb SOD aktivitást.

Egy másik típust jelentenek azok a komplexek, amelyekben a ligandum tartalmazza az összekötő imidazolgyűrűt. Ezen ligandumokkal két réz(II)ionot tartalmazó homodinukleáris, valamint réz(II)- és cink(II)ionot tartalmazó heterodinukleáris komplexeket is előállítottak.²⁰² Az imidazolato-hidas, Cu(II),Zn(II) heterodinukleáris komplexek vizsgálata a cink(II)ion enzimbéli szerepéről is információt adhat. A cink(II)ion Lewis-savként gyorsítja a külső szférás elektronátadást a SOD oxidált formája és a szuperoxid gyökanion, valamint a Cu(I),Zn(II) forma és a szuperoxid gyökanion között. A cink(II)ion a réz(II)ion és a szuperoxid gyök redoxipotenciáljának szabályozása révén gyorsítja a szuperoxid oxidációját és redukcióját is a katalitikus ciklusban.²⁰²

A SOD enzim modelljei sokszor olyan réz(II)- vagy réz(I)ionot tartalmazó komplexek, melyeknek szerkezete egyáltalán nem hasonlít az enzim szerkezetéhez, de szintén képesek a szuperoxid gyök elbontására. Még az egyszerű dipeptid-réz(II) rendszerben keletkező CuL komplexeknek is van kismértékű SOD aktivitása,²⁰³ de hasonlóképpen katalitikus hatást mutat a réz(II)-Ac-HGHG²⁰⁴ vagy réz(II)-Ac-HVH-NH₂ rendszerben képződő CuH_2L komplex is,¹⁷¹ sőt maga a CuHPO_4 komplex²⁰⁵ is csekély mértékben SOD aktív.

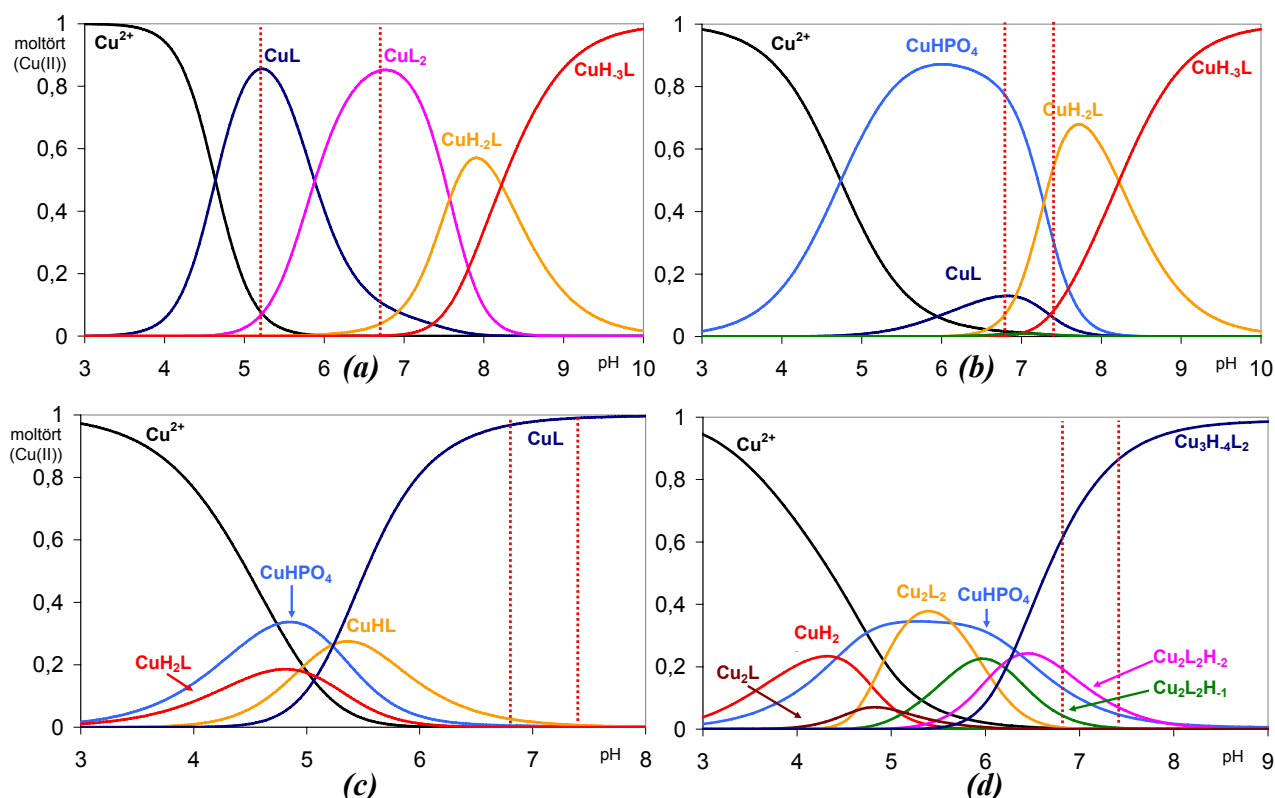
Vizsgáltak olyan komplexeket is, melyek dimer szerkezetűek ugyan, de imidazolgyűrű helyett egy viszonylag merev lánc köti össze a két fémiont koordináló molekulárszt. Ezen komplexekre is jelentős enzimaktivitást találtak.²⁰⁶

A SOD enzimet modellező komplexek tervezésénél egy másik megközelítési mód, hogy az enzimen a fémion megkötésében szerepet játszó fehérjeláncot modellezzik oligopeptidek segítségével. Valójában a fent említett két peptid (Ac-HGHG, Ac-HVH-NH₂) megfelel a SOD enzim 46-48 szekvenciája modelljének, de a fiziológiás pH tartományban kialakuló kötésmód már eltér az aktív centrumban kialakuló koordinációtól. A legegyszerűbb glicint és hisztidint tartalmazó peptideknél is végeztek enzimaktivitás vizsgálatokat. Ezek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a hisztidin jelenléte csökkenti a nem védett peptid-komplexek aktivitását, ugyanakkor a fémion körüli geometria torzulása megnövekedett aktivitást eredményez.²⁰⁴ Több két vagy három hisztidint tartalmazó védett peptidre vonatkozóan is történtek vizsgálatok,^{207,208} és a több hisztidint tartalmazó modellvegyületek közé sorolhatjuk a prionfehérje hexa- és okta"repeat" tartományának modellezésére előállított peptideket is. A mért IC₅₀ értékek a 0,10-0,40 μmol/dm³ tartományba esnek, a legnagyobb aktivitást a négy ismétlődő egységet tartalmazó ligandumok réz(II)-komplexeinél mérték. A mérések alapján arra az általános következtetésre jutottak, hogy a koordinálódott hisztidin imidazolgyűrűk számának növekedése növeli, viszont az amidnitrogének belépése a koordinációs szférába csökkenti az aktivitást.²⁰⁹ Az eredmények azt is tükrözik, hogy az imidazol-N donoratomokon koordinálódó réz(II)-komplexek általában igéretes SOD-modell vegyületek.

A pH-potenciometriás és elektrokémiai eredmények alapján mi a bisz(imidazol-2-il) koordinációjú bisz-komplexek, illetve imidazolátohidat tartalmazó hárommagvú komplexek, valamint a védett multihisztidin peptidek CuL komplexeinek SOD aktivitását tanulmányoztuk. Míg a réz(II)-peptid komplexek a fenti csoportosítás alapján leginkább az utolsó típushoz tartoznak, addig a bisz(imidazol-2-il) származékok réz(II)-komplexeit nehéz besorolni a fenti csoportok valamelyikébe, hiszen bár a koordinálódó atomok tekintetében hasonlóság van az aktív centrumban levő réz(II)ionhoz, de a geometriájukra a merev, szabályos szerkezet jellemző.

A vizsgálatokat a kísérleti részben leírtaknak megfelelően nagy feleslegben jelenlevő H₂PO₄⁻ - HPO₄²⁻ pufferoldatban végeztük, 6,80, illetve 7,40 pH értéken. A két tényező döntően meghatározta, hogy mely összetételű és szerkezetű komplexek SOD aktivitásának meghatározására volt lehetőségünk. A nagy koncentrációban jelenlevő HPO₄²⁻ ugyanis

alapvetően módosítja a keletkező komplexek eloszlását. Az 58.a ábrán a Cu(II)-Ac-HGGH-NH₂ rendszerben képződő komplexek eloszlása látható a ciklikus voltammetriás mérés körülményei között, míg az 58.b ábra ugyanennek, az 58.c és d ábra két további vizsgált rendszernek az eloszlását mutatja be a SOD aktivitás mérési körülményei között.



58. ábra A ciklikus voltammetriás mérés körülményei között a Cu(II)-Ac-HGGH-NH₂=1:5 rendszerben (a); a SOD aktivitás mérés körülményei között a Cu(II)-Ac-HGGH-NH₂ = 1:10 rendszerben (b); a Cu(II)-Ac-S3H4-NH₂ = 1:10 rendszerben (c); a Cu(II)-His-BIMA = 3:2 rendszerben (d) képződő komplexek eloszlása a pH függvényében

(a piros szaggatott vonal a mérésnél beállított pH-t jelzi, $\lg\beta(\text{CuHPO}_4)$: [210] hivatkozás)

ciklikus voltammetria: $c(\text{L}) = 5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, $c(\text{M}) = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$

SOD aktivitás: $c(\text{foszfát}) = 5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$, $c(\text{M}) = 2,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$,

$c(\text{peptid}) = 2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $c(\text{His-BIMA}) = 1,33 \cdot 10^{-6}$

A foszfátpuffert nagy koncentrációban tartalmazó három rendszer eloszlási ábrái jól tükrözik, hogy ahol a vizsgálandó komplex (CuL) a savas tartományban keletkezik és stabilitása nem túl nagy, ott a CuHPO₄ jelenléte miatt lecsökken a vizsgálandó komplex mennyisége (58.a,b ábra). A másik két rendszerben a CuL, illetve Cu₃H₄L₂ komplex a fiziológiás és lúgos pH tartományban keletkezik, ezek képződésére a CuHPO₄ jelenléte gyakorlatilag nincs hatással. Ezeket a tényezőket figyelembe véve számos rendszerben elvégeztük a SOD aktivitás méréseket, amelyek eredményeit a 21. táblázat összegzi.

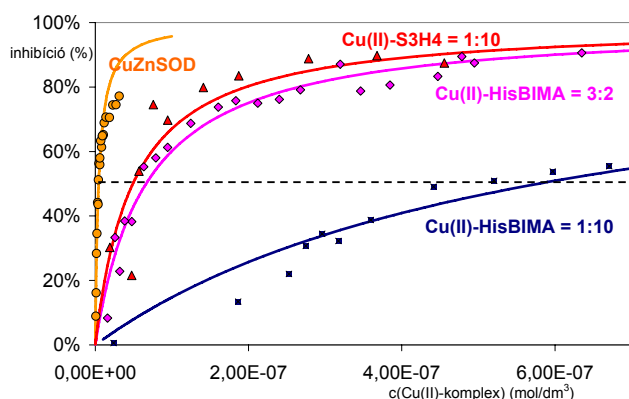
21. táblázat A különböző Cu(II)-komplexekre meghatározott IC₅₀ és relatív aktivitás értékek ((30), (32) egyenletek) kiegészítve néhány irodalmi adattal

pH = 6,8	IC ₅₀ [μM]	Relatív aktivitás (%)	Komplex	Koordinációs mód
CuZnSOD	0,0028	100	–	–
Cu(II)-(HPO ₄)	0,30	0,92	–	–
Cu(II)-Ac-HGGH-NH ₂	0,27	1,04	[CuL] ²⁺	2 × Im(N)
Cu(II)-Ac-HVVH-NH ₂	0,20	1,40	[CuL] ²⁺	2 × Im(N)
Cu(II)-Ac-S1H2-NH ₂	0,21	1,33	[CuL] ²⁺ ; [CuLH ₁] ⁺	2 × Im(N); 2 × Im(N), N ⁻
Cu(II)-Ac-HHGH-NH ₂	0,17	1,65	[CuL] ²⁺ ; [CuLH ₁] ⁺	3 × Im(N); 2 × Im(N), N ⁻
Cu(II)-Ac-HAHPH-NH ₂	0,12	2,33	[CuL] ²⁺ ; [CuLH ₁] ⁺	3 × Im(N); Im(N), N ⁻
Cu(II)-Ac-S2H3-NH ₂	0,24	1,17	[CuL] ²⁺ ; [CuLH ₁] ⁺	3 × N(Im); 3 × Im(N), OH ⁻
Cu(II)-Ac-S3H4-NH ₂	0,11	2,55	[CuL] ²⁺	4 × Im(N)
Cu(II)-Ac-HHGH-OH ²⁰⁷	0,13	3,46*	[CuL] ²⁺ ; [CuLH ₁] ⁺	3 × N(Im); 3 × Im(N), OH ⁻
Cu(II)-β-Ala-BIMA	0,12	2,39	[CuL ₂ H] ²⁺ ; [CuL ₂ H ₂] ⁴⁺	4 × Im(N)
Cu(II)-Gly-BIMA	0,27	1,04	[Cu ₂ L ₂ H ₂] ²⁺ ; [CuL ₂] ²⁺	2 × Im(N), N ⁻ , NH ₂ ; 3 × Im(N), N ⁻ , NH ₂
pH = 7,4				
CuZnSOD	0,0044	100	–	–
Cu(II)-(HPO ₄)	0,34	1,30	–	–
Cu(II)-Ac-HGGH-NH ₂	0,38	1,16	[CuLH ₂]; ([CuLH ₃])	2 × N(Im), 2 × N ⁻ ; N(Im), 3 × N ⁻
Cu(II)-Ac-HVVH-NH ₂	0,63	0,70	[CuL] ²⁺	2 × N(Im)
Cu(II)-Ac-S2H3-NH ₂	0,15	2,93	[CuLH ₁] ⁺ ; ([CuL] ²⁺)	3 × N(Im), N ⁻ ; 3 × N(Im)
Cu(II)-Ac-S3H4-NH₂	0,046	9,56	[CuL]²⁺	4 × N(Im)
Cu(II)-HVH ¹⁷¹	0,20	0,60	[CuLH ₁] ⁺ ; ([CuLH ₂])	2 × N ⁻ , N(Im), NH ₂
Cu(II)-Ac-HVH-NH ₂ ¹⁷¹	0,16	0,70*	[CuLH ₂]	2 × N(Im), 2 × N ⁻
Cu(II)-Ac-HPHH-NH ₂ ²⁰⁸	0,26	3,23*	[CuLH ₁] ⁺	2 × N ⁻ , N(Im)
Cu(II)-Ac-(HNPGYP) ₂ -NH ₂ ²⁰⁹	0,188	2,34*	[CuLH] ³⁺	
Cu(II)-Ac-(PHGGGWGQ) ₄ -NH ₂ ²⁰⁹	0,175	2,51*	[CuL] ²⁺	
Cu(II)-Gly-BIMA	4,2	0,10	[CuLH] ³⁺ ; [Cu ₂ L ₂ H ₂] ²⁺	2 × Im(N); 2 Im(N), N ⁻ , NH ₂
Cu(II)-His-BIMA (1:10)	0,64	0,69	[Cu ₂ L ₂ H ₂] ²⁺ ; [CuL ₂] ²⁺ ; [CuL ₂ H ₁] ⁺	2 × Im(N), N ⁻ , NH ₂
Cu(II)-His-BIMA (3:2)	0,070	6,27	[Cu₃L₂H₄]²⁺	4 × Im(N) + imidazolato-híd

* a relatív aktivitás meghatározása az adott közleményben megadott SOD aktivitás érték alapján történt

A pH = 6,8 értéknél meghatározott SOD aktivitás értékek mind a védett peptidek, mind a bisz(imidazol-2-il) származékok esetén elsősorban a csak imidazol-N koordinálta komplexekhez rendelhetők. Az IC_{50} adatokból és a natív SOD enzimre vonatkozó adatokból számított relatív aktivitás értékek 1-2 % körüliek, ami azt mutatja, hogy egyik komplex esetén sem figyelhetünk meg jelentős aktivitást. A 7,4 pH értéknél meghatározott SOD aktivitás értékek általában csökkennek a kisebb pH-n meghatározott értékekhez képest, ami mindkét ligandumtípus esetén az amidnitrogén deprotonálódásának és koordinálódásának a következménye. Figyelemre méltó, hogy a bisz(imidazol-2-il) származékok bisz-komplexeire meghatározott értékek mindkét pH esetén a legkisebb értékek közé tartoznak, a négy imidazol-N kötődésével kialakuló komplexek gyakorlatilag nem mutatnak SOD aktivitást. Ez a komplexek szerkezetét figyelembe véve nem meglepő, a merev szerkezet sztérikusan gátolja a szuperoxid gyökanion kötődését a fémcentrumhoz. Ez alátámasztja azt az irodalmi eredményt, hogy a komplexek SOD aktivitását döntően befolyásolja, hogy milyen gyors a fémcentrumhoz axiálisan kötődő ligandum cseréje, sztérikusan mennyire gátolt a szuperoxid gyökanion kötődése. A szuperoxid megkötődésének és a fémcentrum redoxi átalakulásának is kedvez a réz(II) körüli geometria torzulása.²¹¹⁻²¹³

Ugyanakkor a pH = 7,4 értéknél vizsgált komplexek közül kettő kiugróan jó aktivitást mutat: a négy hisztidint és szarkozint tartalmazó Ac-S3H4-NH₂ peptid CuL komplexe, valamint a His-BIMA imidazolato-hidat tartalmazó hárommagvú Cu₃H₄L₂ komplexe. Mint ahogy az az 58.c,d ábráról látható, ezen a pH-n a két komplex az uralkodó, a szarkozin tartalmú peptidben nem zajlik le amidnitrogén deprotonálódás, és a 4 imidazol-N kötődésével kialakuló torzult geometriájú komplex lehetővé teszi a szuperoxid gyökanion kötődését és átalakulását. A különböző komplexek aktivitása közötti különbséget jól szemlélteti az 59. ábra, ami a vizsgált komplexekre meghatározott inhibíciós görbéket mutatja be.



59. ábra Néhány Cu(II)-komplex és a SOD enzim inhibíciója a koncentráció függvényében

Az 59. ábra egyúttal azt is tükrözi, hogy bár a két komplexet a többi vizsgált komplexhez képest kiugró érték jellemzi, ez egy nagyságrenddel kisebb aktivitást jelent, mint a SOD enzim aktivitása.

Ezek az eredmények összhangban vannak az elektrokémiai paraméterekkel, a pozitív redoxipotenciálú peptid-komplexek aktivitása nagyobb, mint a ~ 0 V redoxipotenciállal jellemezhető bisz(imidazol-2-il) ligandum–réz(II) komplexek.

Összességében a SOD aktivitási vizsgálatok eredményei azt tükrözik, hogy bár a vizsgált komplexek szerkezetükben modellezik a CuZnSOD enzim réz(II)kötőhelyét, és az elektrokémiai paraméterek alapján is feltételezhető, hogy a komplexek potenciális CuZnSOD modellek, általában nem mutatnak jelentős mértékű SOD aktivitást. A négy hisztidint tartalmazó heptapeptid CuL komplexét és a His-BIMA imidazolato-hidas $\text{Cu}_3\text{H}_4\text{L}_2$ komplexét ugyanakkor kiemelkedő SOD aktivitás jellemzi. Bár ezek az értékek még mindig jelentősen elmaradnak a természetes enzim aktivitásától, a korábbi irodalmi adatokhoz képest ígéretesek. Így megállapíthatjuk, hogy ezek a ligandumok megfelelő kiindulópontot jelenthetnek olyan molekulák tervezéséhez, amelyek réz(II)-komplexei nemcsak koordinációs módban, hanem funkcionálisan is modellezik az enzim működését.

6. Összefoglalás

A biológiai rendszerekben szerepet játszó fémionok nagyon gyakran a fehérjék oldalláncbeli donorcsoportjaihoz kapcsolódnak. Ezek a molekulák a nyomelemek közül elsősorban a réz(II), nikkel(II) és cink(II) számára biztosítanak kötődési helyet. A leggyakoribb fémkötőhely a hisztidin oldalláncának imidazolgyűrűje, de gyakran szerepet játszanak egyéb oldalláncbeli donorcsoportok is a fémionok koordinálásában.

A CuZnSOD enzim aktív centrumában a réz(II)ion hisztidin imidazolnitrogénéhez és egy vízmolekulához koordinálódik, míg a cink(II)ion egy aszparaginsav karboxilát-csoportjához és három hisztidin imidazolgyűrűjéhez kötődik, a két fémiont egy imidazolátocsoport kapcsolja össze kétmagvú centrumot létrehozva. Ebben a metalloenzimben a cinknek elsősorban szerkezetalkotó szerepe van, míg a rézion redoxi folyamatot katalizál, amelynek során reverzibilis Cu(II)-Cu(I) átalakulás játszódik le.

A fémionok részvételével lejáró folyamatok vizsgálatakor a fő kérdés az, hogy hogyan kötődik a fémion az egyes proteinekhez, enzimekhez, és hogyan befolyásolja azok működését. A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában több évtizedes múltra tekintenek vissza azok a kutatások, amelyek célja a fémion-fehérje kölcsönhatások jellemzése különböző oldalláncbeli donorcsoportokat tartalmazó kismolekulák fémkomplexein keresztül. A kutatások a legegyszerűbb dipeptidektől kezdve az egyre nagyobb tagszámú és változatos aminosavszekvenciájú peptidek irányába folytatódottak; a vizsgálatok elsősorban a réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)-komplexekre terjedtek ki, de néhány esetben kiegészültek a kobalt(II), kadmium(II) és/vagy palládium(II) komplexeinek tanulmányozásával is. A molekula egyre nagyobb számú és változatos oldalláncbeli csoportjai azonban jelentős hatással vannak a peptidek komplexképző sajátságaira és előtérbe kerülhetnek az oldallánc koordinálódásával kialakuló komplexek. A legnagyobb hatást a hisztidin oldalláncbeli imidazolgyűrűje okozza, a vizsgált fémionokhoz erősen kötődő imidazolcsoport jelenléte alapvetően megváltoztathatja a molekula koordinációs sajátságait.

Így ahhoz, hogy az imidazolgyűrű szerepéről a komplexképződési folyamatokban további információkat nyerjünk egyre nagyobb tagszámú és egyre több oldalláncbeli donorcsoportot vagy funkcionizált donorcsoportot tartalmazó peptidek szintézisére és vizsgálatára került sor.

A kutatások során arra kerestük a választ, hogy a peptidben

- kelátképző helyzetben levő két imidazolgyűrű (bisz(imidazol-2-il)-csoport)
- a bisz(imidazol-2-il)-csoporttal analóg bisz(piridin-2-il)-csoport
- a C-terminális helyzetben levő hisztidin
- a C-terminális helyzetben levő hisztidinnel analóg aminosav
- a C- és N-terminálisan védett oligopeptidekben különböző helyen és számban elhelyezkedő hisztidin

hogyan hat az adott molekulák komplexképző sajátságaira; milyen tényezők befolyásolják egyrészt azt, hogy a fémion elősegítse az amidnitrogén deprotonálódását és koordinálódását, így a fémion peptidvázhoz való kötődését; másrészt azt, hogy az oldalláncbeli donorcsoportok kötődésével képződő fémkomplexek előtérbe kerüljenek, és meghatározóak legyenek a fiziológiás pH tartományban. Az eredményekből az alábbi következtetésekre jutottunk:

1) A kelátképző helyzetben levő két imidazolgyűrű szinte valamennyi 3d fémion számára stabilis kötődést biztosít a savas és számos esetben a fiziológiás pH tartományban. A VO(IV)-tól a Zn(II)-ionig valamennyi vizsgált fémionnal (VO(IV), Mn(II), Fe(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II)) ML és ML₂ összetételű komplexek keletkeznek két, illetve négy imidazolgyűrű koordinálódásával. A komplexek stabilitása megfelel az Irving-Williams sornak. A bisz(imidazol-2-il)-szerű koordináció azonban nem tudja megakadályozni a fémionok hidrolízisét a lúgos pH tartományban.

2) A bisz(imidazol-2-il)-csoport önmagában nem képes horgonycsoportként viselkedni és elősegíteni az amidnitrogének deprotonálódását még akkor sem, ha a molekulában egy oldalláncbeli hisztidin imidazolgyűrű is jelen van. A terminális aminocsoport jelenlétében azonban lejátszódik az amidnitrogén(ek) deprotonálódása és koordinálódása minden réz(II)-, és nikkell(II)tartalmú rendszerben, és ezt a folyamatot a GlyBIMA esetén Zn(II) és VO(IV) jelenlétében is kimutattuk.

3) Az imidazolrész és a kapcsolódó lánc együttes koordinációja ugyanakkor változatos összetételű egy- és többmagvú komplexek képződéséhez vezet. Ez néhány aminosav- és dipeptid-származék esetén a fémion-ligandum aránytól függően fiziológiás vagy lúgos tartományban kedvezményezetté teszi a koordinálódó imidazolgyűrű N(1)H csoportjának deprotonálódását és imidazolátohidas komplexek képződését.

4) A bisz(imidazol-2-il)-csoportot tartalmazó ligandumokban a peptidlánc hosszának növelése és különösen az oldalláncbeli hisztidin imidazolgyűrű jelenléte a peptidszerű koordináció

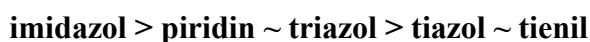
kialakulásához és dominanciájához vezet. Bár jelentős kompetíció alakul ki a peptidszerű és bisz(imidazol-2-il)-szerű koordináció között, a bisz(imidazol-2-il)-részt csak a GlyGlyHis-szerű koordináció és csak lúgos pH tartományban képes teljesen kiszorítani a koordinációs szférából.

5) A bisz(piridin-2-il)-csoport jelenléte a molekulában a bisz(imidazol-2-il)-csoporthoz képest csekélyebb mértékben, de hatással van a komplexképződési folyamatokra. Savas tartományban a fémionok kötődése a kelátképző helyzetben levő két piridin-nitrogénhez történik. Ez azonban gyengébb kötődést eredményez, mint a bisz(imidazol-2-il)-csoport, így az aminosav-BPMA-származékok réz(II)- és nikkel(II)-komplexeiben az aminosav rész részvételével létrejövő peptidszerű koordináció a meghatározó a gyengén savas és fiziológiás pH tartományban. Ez általában kisebb számú és egymagvú komplexek képződését eredményezi.

6) A C-terminális hisztidin jelenléte a kistagszámú peptidekben jelentős hatással van a komplexképződési folyamatokra és a kialakuló komplexek szerkezetére, de a terminális aminocsoport az elsődleges fémkötőhely. A láncvégi imidazolgyűrű kötődése a fémionokhoz szinte minden komplexben kimutatható, de a terminális aminocsoport kiszorítására nem képes. Ugyanakkor a ligandumok háromfogú koordinációja növeli az ML komplexek stabilitását, és a stabilitás az Irving-Williams sornak megfelelően a $\text{Cu(II)} > \text{Ni(II)} > \text{Zn(II)}$ sorrendben csökken.

7) A hisztidinnel analóg aminosavak esetén az aminosavszerű koordináció a meghatározó, de a piridin-, triazol- és tienilcsoport részvétele a fémion megkötésében kimutatható. A piridin- és tienilgyűrűt tartalmazó hisztidin analóg aminosavak jelenléte a tripeptidek C-terminális pozíciójában (GGtA, GGpA) alapvetően nem változtatja meg a ligandumok komplexképző sajátosságait, a komplexekre a tripeptidekhez hasonló (GlyGlyGly-, illetve GlyGlyHis-szerű) koordináció a jellemző. Az aromás gyűrűk hatása kimutatható, de ez a hatás a hisztidin imidazolgyűrűkhöz képest kisebb mértékű.

Általánosan a különböző aromás gyűrűk komplexképződésre gyakorolt hatásának mértékére az alábbi sorrendet állapítottuk meg:



8) A védett hisztidintartalmú peptidek esetén az oldalláncbeli imidazolgyűrűk koordinálódásával kialakuló komplexek stabilitása nagy és mennyiségük a gyengén savas, illetve fiziológiás pH tartományban jelentős. A réz(II) és nikkel(II) ugyanakkor ezekben a

peptidekben is indukálja a peptidnitrogének deprotonálódását és kötődését, de a peptidváz koordinálódásával kialakuló komplexek képződése a nagyobb pH tartományba tolódik.

9) A két, három, illetve négy imidazol koordinálta réz(II)-komplexek szerkezetükben hasonlóságot mutatnak a CuZnSOD enzim aktív centrumában levő réz(II) koordinációs módjához. Ezeknek a komplexeknek a stabilitását több tényező befolyásolja:

- a *fémion minősége*: az ML komplexek stabilitása a $\text{Cu(II)} > \text{Ni(II)} > \text{Zn(II)} > \text{Co(II)} \sim \text{Cd(II)}$ sorrendben csökken
- a *C-terminális karboxilátcsoporthoz való kötődés*: a karboxilátcsoporthoz való kötődés szerepet játszik a komplexképzésben, ennek hatása a cink(II) esetén a legnagyobb, így a NiL és ZnL komplexek stabilitásában a fenti a sorrend megfordul: $\text{Zn(II)} > \text{Ni(II)}$
- a *peptidben levő hisztidinek számának* növelésével nő a koordinálódó imidazol-N donortomok száma és ezzel együtt a keletkező komplexek stabilitása is
- a *hisztidinek közötti aminosav minősége*: a peptidláncba beépített prolin, illetve szarkozin aminosav akadályozza az amidnitrogének deprotonálódását és ezáltal kismértékben növekszik az ML komplexek stabilitása
- a *hisztidinek közötti aminosavak számának* növekedésével nő a komplexekben kialakuló makrokelátgyűrűk tagszáma és csökken a képződő komplexek stabilitása. A CuZnSOD enzimben a réz(II) kötőhelyeként megjelenő HVH fragmenshez hasonló HXH szekvenciát tartalmazó peptidek esetén mutattuk ki a legnagyobb stabilitásnövekedést a többi peptidhez képest.

Általánosan megállapíthatjuk, hogy a peptidek és peptidszármazékok esetén a fémionok által indukált amidnitrogén deprotonálódását és koordinálódását, és így a peptidvázhoz történő kötődést elősegíti:

- a terminális aminocsoport jelenléte
- a második vagy harmadik helyen levő hisztidin vagy azzal analóg piridinggyűrűt tartalmazó aminosav
- az aminosavhoz amidkötéssel keresztül kapcsolódó bisz(piridin-2-il) csoport

A fenti folyamatot gátolja és növeli a C-terminális csoporton vagy az oldalláncokon keresztül koordinálódó komplexek stabilitását, és mennyiségét a fiziológiás pH tartományban:

- a tetra-, penta és hexapeptidek C-terminális részén levő hisztidin oldallánc
- a C-terminális helyzetben levő bisz(imidazol-2-il) csoport
- N-terminálisan vagy mindkét végén védett peptidekben a két vagy több hisztidin jelenléte

Ez utóbbi két ligandumtípusnál megjelenő, csak az imidazolgyűrűn keresztül koordinálódó réz(II)-komplexekben a fémion körüli koordinációs környezet hasonló néhány metalloenzim, így például a CuZnSOD enzim aktív centrumának fémkötő helyéhez. Így a kutatások folytatásában az volt a fő kérdés, hogy ezek a komplexek funkcionálisan is mutatnak-e hasonlóságot a CuZnSOD enzimhez. A komplexek elektrokémiai és SOD aktivitás vizsgálatából az alábbi következtetéseket vontuk le:

- 1) Az imidazol-N koordinációjú komplexek a meghatározott elektrokémiai paraméterek alapján alkalmasak lehetnek a CuZnSOD enzim modellezésére, mivel valamennyi vizsgált esetben a redoxipotenciál értékek abba a potenciáltartományba esnek, amit a szuperoxid gyökkanion oxidációjára és redukciójára vonatkozó potenciálértékek határoznak meg.
- 2) A komplexek redukálhatóságát jelentősen befolyásolja a komplex szerkezetének merevsége, illetve flexibilitása: nagyobb redoxipotenciál és könnyebb redukálhatóság jellemzi a peptid-komplexek makrokelátot tartalmazó, torzult geometriájú imidazol koordinációjú komplexeit, és kisebb, ~ 0 V körüli érték, és nehezebb redukálhatóság állapítható meg a merev szerkezetű bisz(imidazol-2-il) komplexekre. Ennek megfelelően a makrokelátot tartalmazó a peptid-komplexek ígéretesebbek az enzim modellezése szempontjából. Ugyancsak potenciális CuZnSOD modellkomplex a His-BIMA elektrokémiai szempontból nem vizsgálható imidazolato-hidat tartalmazó hárommagvú komplexe.
- 3) A vizsgált komplexek, amelyek szerkezetükben modellezik a CuZnSOD enzim réz(II)kötőhelyét, általában nem mutatnak jelentős mértékű SOD aktivitást. A négy hisztidint tartalmazó heptapeptid CuL komplexe és a His-BIMA imidazolato-hidas hárommagvú komplexét ugyanakkor kiemelkedő SOD aktivitás jellemzi.

7. Az eredmények hasznosítási lehetőségei

A nagyszámú, változatos szekvenciájú peptid és peptidszármazék komplexeinek vizsgálatában elért eredményeink általánosan elősegíthetik a fémion-protein kölcsönhatás modellezésére alkalmas peptidek tervezését. Így az általunk vizsgált réz(II)-komplexek közül a legnagyobb SOD aktivitást mutató komplexek megfelelő kiindulópontot jelenthetnek olyan molekulák tervezéséhez, amelyek réz(II)-komplexei nemcsak koordinációs módban, hanem funkcionálisan is modellezik a CuZnSOD enzim működését.

A vizsgált ligandumok szekvenciájában modellezik a biológiai rendszerek fémionkötőhelyeit, és a komplexképződés során előtérbe kerül az oldalláncokon keresztüli koordináció. Így ezeknek az egyre nagyobb tagszámú, oldalláncban koordinálódó donorcsoportokat tartalmazó peptideknek a komplexképző sajátságai területén végzett kutatásaink egyúttal hozzájárulhatnak a biológiai rendszerekben kialakuló fémion-protein kölcsönhatások megértéséhez is.

Emellett annak ismeretében, hogy a különböző donorcsoportot tartalmazó oldalláncok hogyan hatnak a peptidek komplexképző tulajdonságaira, a különböző peptidek fémmegkötő képessége megbecsülhető az aminosav szekvencia ismeretében.

Az eredmények alapján a különböző fémionokhoz szelektíven koordinálódó peptidek tervezhetők és szintetizálhatók: a réz(II)ion szelektív megkötésére leginkább a hisztidintartalmú peptidek lehetnek alkalmasak, a nikkel(II)iont nagy stabilitással és szelektíven köthetik a különböző oldalláncbeli imidazolt és kéndonoratomot tartalmazó peptidek, míg a cink(II)iont szelektíven kötő ligandumok tervezésénél a bisz(imidazolil)-csoportot tartalmazó származékok jelenthetnek egy lehetséges irányt.

A réz(II)-peptidek és -peptidszármazékok komplexeire meghatározott jellemző redoxi, illetve SOD aktivitási adatok (IC_{50} értékek) azontúl, hogy információt adnak a komplexekről, mint lehetséges enzimmodellekről, bővítik a fémkomplexekre vizes oldatban meghatározott elektrokémiai paraméterek körét, és jól hasznosíthatók más réz(II)-ligandum rendszerek elektrokémiai vizsgálata és redoxi sajátságainak elemzése során is.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálás szívvel köszönöm **Prof. Sóvágó Imre** egyetemi tanárnak, egykori témavezetőmnek, kutatócsoportunk vezetőjének, hogy pályámon elindított, munkámat irányította, önzetlenül és sokoldalúan segítette és mind a mai napig bátran fordulhatok hozzá tanácsért, útmutatásért, segítségért. Nagyon sokat tanultam tőle a kutatómunka szépségéről, kihívásairól, a kitűzött célok megvalósításáról, későbbiekben pedig a kutatómunka irányításáról.

Végig tekintve eddigi tudományos pályámat számtalan embernek köszönhetem, hogy idáig eljutottam. **Prof. Tóth Imre** egyetemi tanár évfolyamfelelősként terelgetett a kutatómunka irányába, ösztönzése sokat jelentett abban, hogy már hallgatóként bekapcsolódtam a kutatásba és a továbbiakban is ez maradt a választott hivatásom, amiért köszönetet mondok. Kezdetektől fogva olyan tanszéken és olyan tanszékvezetők – **Prof. Brücher Ernő** egyetemi tanár, **Prof. Sóvágó Imre** egyetemi tanár, **Prof. Fábián István** egyetemi tanár – és munkatársak mellett dolgoztam, ami a munkámhoz nagyon emberi légkört, jó munkatársi közösséget biztosított.

Nagyon örülök, hogy a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport tagja vagyok, hiszen a kutatócsoportunk volt és jelenlegi tagjai emberként és kutatóként is a legkiválóbbak közé tartoznak. Köszönöm **Dr. Buglyó Péter** egyetemi docensnek, **Prof. Farkas Etelka** egyetemi tanárnak és **Prof. Kiss Tamás** egyetemi tanárnak, hogy az együtt töltött évek alatt munkámat mindig figyelemmel kísérték, tanácsaikkal segítették. Köszönöm **Hüse Ilona** és **Dr. Gönczy Árpádné** technikusoknak, hogy hozzáértő munkájukkal biztosították a kísérleti munka eredményességét, és egyéb feladatokban is készségesen segítettek. Csoportunk tagjaira nemcsak munkatársként, hanem barátknént is mindig számíthattam és számíthatok.

Szerencsésnek tartom magam, hogy azontúl, hogy a hallgatókkal való munka, a fiatalok tudományos munkájának irányítása mind a mai napig nagy örömet okoz, emberileg és szakmailag kiváló PhD hallgatókkal dolgozhattam és dolgozhatok együtt. Külön köszönöm **Dr. Ósz Katalinnak**, **Dr. Kállay Csillának** és **Dr. Timári Saroltának** a közös kutatómunka során végzett lelkiismeretes munkájukat, amelyek nagyban hozzájárultak az értekezésben összefoglalt eredmények megszületéséhez, és amely munka során én is sok mindent megtanultam a kitartás, a sokoldalúság és a barátság terén.

Csoportunk tagjaiként hosszabb-rövidebb ideig együtt dolgoztam **Dr. Nagy Zoltánnal**, **Dr. Ágoston Csaba Gáborral**, **Dr. Bóka Beátával** és **Dr. Jósai Viktóriával**, akik munkáját szintén nagyon köszönöm.

Meg kell említenem jelenlegi PhD hallgatómat, **Dávid Ágnes** és a csoportunk PhD hallgatóit, **Turi Ildikó Margitot**, **Grenács Ágnes**, **Bíró Lindát** és **Szabó Orsolyát**, valamint munkatársunkat, **Godó Attilát**, akiknek köszönöm, hogy a napi munka során mindig segítőkészek és kellemes, vidám, baráti légkört teremtenek.

Az elmúlt évek alatt számos hallgató tudományos diákköri, szakdolgozati és diplomamunka témáját irányítottam. Köszönöm **Ágoston Károly**, **Bertalan Csilla**, **Danyi Péter**, **Szabó Julianna**, **Csorba Tímea**, **Szilágyi Olga**, **Tarcsa Tamás**, **Takács Imre**, **Kiss Dóra**, **Balogh Gábor**, **Cerea Riccardo**, **Serfőző Dóra** volt hallgatóimnak, valamint **Csire Gizella** és **Lihi Norbert** jelenlegi hallgatóimnak az eredményes munkáját.

A tudományos együttműködések szintén jelentősen hozzájárultak a tudományos eredményeinkhez. Külön köszönöm **Prof. Süli-Vargha Helgának** és munkatársainak, az MTA Peptidkémiai Kutatócsoportja tagjainak, hogy nagyszerű szintetikus munkájuk révén nagyon sok molekula megtervezésére és vizsgálatára volt módunk. Külföldi együttműködés keretében lehetőségünk volt a közös kutatómunkára **Prof. Peter Comba**-val és munkatársaival a Heidelberg-i Egyetemről (Németország), **Prof. Nick Hadjiladis**-sal és munkatársaival a Ioannina-i Egyetemről (Görögország), valamint **Dr. Eugenio Garribba**-val, **Dr. Daniele Sanna**-val és **Prof. Giovanni Micera**-val a Sassari Egyetemről (Olaszország), a munkájukat nagyon köszönöm.

Köszönettel tartozom az Országos Tudományos Kutatási Alapnak az OTKA pályázatok keretében (OTKA 1646, F007512, T019337, K72956) nyújtott, valamint az MKM-176, FKFP-0575, TÁMOP (4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007) és TAMOP (4.2.2.B-10/1-2010-0024) projektek anyagi támogatásáért.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm **szüleim** és **Péter bátyám és családja** folyamatos támogatását és szeretét.

Az értekezést édesanyám emlékének ajánlom.

MELLÉKLETEK

M1. táblázat A bisz(imidazol-2-il) származékok deprotonálódási állandói

	pK(COOH)	pK ₁ (Im)	pK ₂ (Im)	pK(His)	pK(NH ₂)
BIM ^{D3}		4,74	6,93		
BIP ^{D3}	2,79	4,69	6,90		
BIMA ^{D3}			4,07		6,49
Z-Gly-BIMA ^{D15}		3,37	5,82		
Z-Ala-BIMA ^{D15}		3,21	5,65		
Ac-ProLeuGly-BIMA ^{D3}		3,31	5,67		
BIP-IleAlaGly-OEt ^{D3}		3,82	5,99		
BOC-ProLeuHis-BIMA ^{D6}		2,85	5,25	6,64	
BOC-ProHisGly-BIMA ^{D3}		3,11	5,42	6,38	
BOC-HisLeuGly-BIMA ^{D6}		2,78	5,24	6,65	
BIP-IleAlaHis-OMe ^{D6}		3,73	5,84	6,81	
BIP-IleHisGly-OEt ^{D3}		4,01	5,67	6,65	
BIP-HisAlaGly-OEt ^{D6}		3,73	5,77	6,77	
Gly-BIMA ^{D5}		3,22	5,51		7,95
Phe-BIMA ^{D7}		3,09	5,28		7,17
α-Asp-BIMA ^{D12}	2,32	3,32	5,49		7,48
α-Glu-BIMA ^{D12}	2,69	3,74	5,52		7,53
β-Ala-BIMA ^{D12}		3,13	5,51		9,23
γ-Glu-BIMA ^{D12}	1,79	3,41	5,83		9,05
His-BIMA ^{D7}		2,61	4,53	5,81	7,28
GlyLeu-BIMA ^{D9}		3,17	5,58		7,92
LeuGly-BIMA ^{D9}		3,18	5,59		7,76
PheGly-BIMA ^{D9}		3,19	5,61		7,33
AlaPro-BIMA ^{D9}		2,93	5,52		8,11
HisPhe-BIMA ^{D13}		2,89	4,84	5,78	7,35
PheHis-BIMA ^{D13}		2,83	5,07	6,31	7,27
GlyIleGly-BIMA ^{D14}		2,91	5,41		7,84
AlaPheGly-BIMA ^{D14}		3,19	5,60		7,78
GlyGlyHis-BIMA ^{D14}		3,11	5,23	6,46	7,86

M2. táblázat A legegyszerűbb bisz(imidazol-2-il) származékok átmenetifém-komplexeinek stabilitási állandói ($\lg\beta$) ($\text{Cu(II)}^{\text{D3}}$, $\text{Ni(II)}^{\text{D8}}$, $\text{Zn(II)}^{\text{D3}}$, $\text{VO(IV)}^{\text{D15}}$)

	BIM	BIP	BIMA	Ac-ProLeuGly-BIMA	BIP-IleAlaGly-OEt	Z-Gly-BIMA	Z-Ala-BIMA
CuH₂L₂			25,21				
CuHL₂		21,20	21,50				
CuL₂	17,64	17,29	16,89	15,24	15,52	14,50(3)	16,04(1)
CuHL		13,36	14,0				
CuL	9,64	10,13	9,89	8,65	8,92	8,00(2)	8,67(1)
Cu₂H₁L₂			18,43				
Cu₂H₂L₂			12,78				
NiH₂L₂			21,76				
NiHL₂			18,11				
NiL₂	13,46	13,64	13,33				
NiHL		10,84	11,95				
NiL	7,29	7,76	7,24				
NiH₁L			-0,79				
ZnH₂L₂			18,85				
ZnHL₂			14,25				
ZnL₂	10,22	10,10	9,92	8,58	8,90		
ZnHL			9,66				
ZnL	5,53	5,63	5,38	4,85	4,92		
ZnH₁L			-1,83				
VOH₂L₂		19,56					
VOL₂	12,94	12,07				11,28	10,95
VOH₁L₂	5,80	5,10					
VOHL		10,01					
VOL	7,26	6,75				6,22	6,15
(VO)₂H₂L₂	6,95	6,08				5,27	4,98

M3. táblázat A védett hisztidintartalmú tripeptid-bisz(imidazol-2-il) származékok komplexeinek stabilitási állandói ($\lg\beta$)

	BOC-ProLeuHis-BIMA	BOC-ProHisGly-BIMA	BOC-HisLeuGly-BIMA	BIP-IleAlaHis-OMe	BIP-IleHisGly-OEt	BIP-HisAlaGly-OEt
<i>Hivatkozás</i>	<i>D6</i>	<i>D3</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D3</i>	<i>D6</i>
CuH₂L₂	27,34	27,44	27,45	27,78	26,68	27,97
CuHL₂	21,85	21,88	23,01	21,88	21,08	22,44
CuL₂	15,89	15,69	16,67	15,34	14,74	16,03
CuHL	14,37	14,70	14,67	14,84	14,64	15,08
CuL	9,17	9,51	11,42	10,28	10,05	10,63
ZnH₂L₂		21,34			21,23	
ZnHL₂		15,83			15,82	
ZnL₂		9,84			9,70	
ZnHL		10,95			10,86	
ZnL		5,96			5,90	

M4. táblázat Az aminosav-bisz(imidazol-2-il) származékok réz(II)-komplexeinek stabilitási állandói ($\lg\beta$)

	Gly-BIMA	Phe-BIMA	α -Asp-BIMA	α -Glu-BIMA	γ -Glu-BIMA	β -Ala-BIMA	His-BIMA
<i>Hivatkozás</i>	<i>D5</i>	<i>D7</i>	<i>D12</i>	<i>D12</i>	<i>D12</i>	<i>D12</i>	<i>D7</i>
CuH_4L_2				37,46			37,20
CuH_3L_2				34,01			33,12
CuH_2L_2	31,64	28,89	29,04	29,84	32,54	32,73	28,51
CuHL_2			23,11				22,66
CuL_2	18,97						16,15
CuH_1L_2	11,12		8,7				8,81
CuH_2L				19,97			19,29
CuHL	17,11	15,44	15,63	16,38	17,18	17,28	
CuL						11,95	
CuH_2L	-0,92	-2,41				-3,52	
Cu_2L_2			25,25		29,09		25,68
$\text{Cu}_2\text{H}_1\text{L}_2$							19,75
$\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2$	18,43	14,94	15,46	16,70		13,93	13,58
$\text{Cu}_2\text{H}_3\text{L}_2$			6,66	8,26			5,45
$\text{Cu}_2\text{H}_4\text{L}_2$			-2,33	-0,71			-3,48
$\text{Cu}_3\text{H}_4\text{L}_2$			9,33	7,97		6,64	8,53
Cu_2L							15,36
$\text{Cu}_2\text{H}_1\text{L}$			9,92	10,06	10,45		

M5. táblázat Az aminosav-bisz(imidazol-2-il) származékok réz(II)-komplexeinek stabilitási állandói ($\lg\beta$)

	Gly-BIMA			Phe-BIMA			α -Glu-BIMA	His-BIMA		
	Ni(II)	Zn(II)	VO(IV)	Ni(II)	Zn(II)	VO(IV)		Ni(II)	Zn(II)	VO(IV)
<i>Hivatkozás</i>	<i>D8</i>	<i>D5</i>	<i>D15</i>	<i>D7</i>	<i>D7</i>	<i>D15</i>		<i>D7</i>	<i>D7</i>	<i>D15</i>
MH₄L₂						33,18		35,62		34,36
MH₃L₂						30,00		31,63	28,08	
MH₂L₂	27,82	24,04	25,49	26,04	22,60	25,49		26,79	22,79	24,88
MHL₂	21,51	17,17	19,17	20,33				20,83	16,85	
ML₂	13,47	10,28		13,70				13,90	9,97	
MH₁L₂	4,7			5,90				5,20		
MH₂L						17,09		18,42	16,84	17,99
MHL	14,21	12,40	13,56	13,48	11,78	13,51			12,16	13,31
ML			8,60			9,18			6,82	8,76
MH₁L			2,12	0,01		2,51		1,49	-0,52	2,96
MH₂L	-7,71		-4,93			-4,72		-7,70		-5,00
M₂L₂								21,77		
M₂H₂L₂	2,71	0,40								
M₂L								12,62		

M6. táblázat A dipeptid-bisz(imidazol-2-il) származékok réz(II)-komplexeinek stabilitási állandói ($\lg\beta$)

	GlyLeu- BIMA	LeuGly- BIMA	PheGly- BIMA	AlaPro- BIMA	HisPhe- BIMA	PheHis- BIMA
<i>Hivatkozás</i>	<i>D9</i>	<i>D9</i>	<i>D9</i>	<i>D12</i>	<i>D13</i>	<i>D13</i>
CuH₄L₂					40,05	40,92
CuH₃L₂					35,92	36,02
CuH₂L₂	30,13	30,02	30,11	32,17	30,36	29,99
CuHL₂	22,82	22,95	23,57	25,4	23,83	23,88
CuL₂					16,63	17,11
CuH₋₁L₂						9,59
CuH₂L					20,73	21,19
CuHL	15,76	15,77	16,13	17,45		
CuL				13,14		
CuH₋₂L	-3,63	-2,79	-1,45		-1,95	-1,60
CuH₋₃L	-14,46	-13,54	-11,96			
Cu₂L₂	24,96	24,62	25,37		29,22	
Cu₂H₋₂L₂	10,74	12,42	13,57			
Cu₂H₋₃L	-3,77	-2,55	-1,45			
Cu₄H₋₈L₂	-20,24	-16,52	-14,9			
Cu₃H₋₆L₂	-9,49	-7,38	-5,15			
Cu₂L					16,90	
Cu₃H₋₂L₂						26,00
Cu₂H₋₁L						13,86

M7. táblázat A dipeptid-bisz(imidazol-2-il) származékok nikkel(II)- és cink(II)-komplexeinek stabilitási állandói ($\lg\beta$)^{D9}

	GlyLeu-BIMA		LeuGly-BIMA		PheGly-BIMA	
	Ni(II)	Zn(II)	Ni(II)	Zn(II)	Ni(II)	Zn(II)
MH₂L₂	27,99	24,56	27,75	24,17	27,13	23,39
MHL₂	21,18	17,77	20,73	17,30	20,74	17,20
ML₂	13,59		13,51		14,13	
MHL	14,36	12,45	14,16	12,28	13,65	11,97
ML	8,22	5,1	8,12		8,48	
MH₁L	0,62		1,02		1,10	
MH₂L	-7,07		-6,55		-6,61	

M8. táblázat A tripeptid-bisz(imidazol-2-il) származékok réz(II)- és cink(II)-komplexeinek stabilitási állandói ($\lg\beta$)^{D14}

	AlaGlyLeu-BIMA	GlyLeuGly-BIMA	GlyGlyHis-BIMA	
	Cu(II)	Cu(II)	Cu(II)	Zn(II)
MH₄L₂			42,52	
MH₃L₂				32,09
MH₂L₂	30,47	30,42	31,11	26,2
MHL₂	23,39	24,54		20,17
ML₂	15,81	17,23	17,09	12,5
MH₂L			22,35	18,81
MHL	16,19	16,52	18,23	14,20
ML	11,69	13,15	12,88	8,18
MH₁L		5,42		-0,12
MH₂L	-4,10	-3,68	-0,97	
M₃H₄L₂	5,03	5,13	13,89	
M₂H₂L			8,17	

M9. táblázat A bisz(piridin-2-il) származékok deprotonálódási állandói

	BPM	BPMA	Gly-BPMA	Pro-BPMA	His-BPMA
Hivatkozás	D17	D18	D17	D5	D17
pK₁(Pyr)	2,61	~1,7	<1,5	3,22	<1,5
pK₂(Pyr)	5,11		3,34	5,51	2,91
pK(His)					5,43
pK(NH₂)		7,32	7,91	7,95	7,31

M10. táblázat Az egyszerű bisz(piridin-2-il) származékok átmenetifém-komplexeinek stabilitási állandói ($\lg\beta$)

	BPM				BPMA		
	Cu(II)	Ni(II)	Zn(II)	VO(IV)	Cu(II)	Ni(II)	Co(II)
Hivatkozás	D17	D17	D17	D18	D16	D16	D16
ML₂	11,61	9,57	6,39		16,83	16,80	14,20
MHL		7,63	7,35				
ML	6,67	4,72	3,20	3,73	8,89	8,55	7,63
MH₁L	0,10	-3,51					
M₂H₂L₂				1,23			

M11. táblázat Az aminosav-bisz(piridin-2-il) származékok átmenetifém-komplexeinek stabilitási állandói ($\lg\beta$)

	Gly-BPMA'			Pro-BPMA			His-BPMA'		
<i>Hivatkozás</i>	<i>D17</i>			<i>D5</i>			<i>D17</i>		
CuHL	11,96			13,21			14,64		
CuL	8,12			9,71			10,36		
CuH₁L	4,27			6,08					
CuH₂L	-5,19			-3,36			-4,47		
Cu₃H₄L₂	5,03								
Cu₂H₂L₂							12,58		
	Ni(II)	Zn(II)	VO(IV)	Ni(II)	Zn(II)	Co(II)	Ni(II)	Zn(II)	VO(IV)
<i>Hivatkozás</i>	<i>D17</i>	<i>D17</i>	<i>D18</i>	<i>D5</i>	<i>D5</i>	<i>D5</i>	<i>D17</i>	<i>D17</i>	<i>D18</i>
MH₄L₂							31,0		
MH₃L₂								25,62	
MH₂L₂	21,21						23,12	20,82	
MHL₂	15,88								
ML₂	9,46	6,66		9,66			12,64	9,98	
MH₁L₂		-0,7			-0,50	-0,47	-4,84		
MH₂L₂	-5,03	-9,12		-5,00	-8,59	-8,02			
MH₂L							15,7		15,49
MHL	10,97		10,96	11,85					11,95
ML				5,30		3,48	7,16	4,75	
MH₁L	-1,46	-3,23	1,57	-1,02	-2,68	-3,15		-2,33	2,51
MH₂L	-11,17	-11,94	-5,45						-3,93
M₂H₂L₂							3,92		

M12. táblázat C-terminális hisztidint tartalmazó tetra-, penta- és peptapeptidok deprotonálódási, valamint réz(II)-^{D20} és nikkel(II)-komplexeinek^{D8} stabilitási állandói ($\lg\beta$)

	Gly ₃ His		Gly ₄ His		Gly ₅ His	
pK(COOH)	2,66		2,90		2,86	
pK(His)	6,86		6,94		6,87	
pK(NH₂)	8,03		8,05		8,00	
	Cu(II)	Ni(II)	Cu(II)	Ni(II)	Cu(II)	Ni(II)
ML₂		9,65		9,54		9,06
MHL	12,24		12,16		12,29	
ML	8,47	5,76	8,50	5,82	8,11	5,46
MH₁L	1,63		2,41		2,63	
MH₂L	-5,79	-11,51	-5,39	-11,35	-5,06	-10,75
MH₃L	-16,67	-21,47	-15,71	-20,97	-15,67	-19,94

M13. táblázat A hisztidin analóg aminosavak és tripeptidszármazékaik deprotonálódási állandói^{D21}

	pyrAla	thiAla	triaz-Ala	thiaz-Ala	thiGly	Amet-pyr	GGpA	GGtA
pK(COOH)	<1	1,99	1,79	2,11	1,64		2,45(4)	2,69(3)
pK(Ar)	3,96					4,01	5,06(2)	
pK(NH₂)	8,86	8,82	7,63	8,38	8,38	9,63	7,93(1)	7,88(1)

M14. táblázat A hisztidin analóg aminosavak réz(II)-komplexeinek stabilitási állandói ($\lg\beta$)^{D21}

	pyrAla	thiAla	triaz-Ala	thiaz-Ala	thiGly	Amet-pyr
CuHL₂	19,72			15,20		
CuL₂	15,43	14,37	12,81		12,75	12,62
CuHL	11,91		10,28			
CuL	8,24	7,68		8,20	7,00	7,44
CuH₁L						0,00
CuH₂L						-11,54
Cu₂L₂			17,39			

M15. táblázat A hisztidin analóg aminosavat tartalmazó tripeptidek réz(II)- és nikkel(II) komplexeinek stabilitási állandói ($\lg\beta$)

	GGpA		GGtA	
	Cu(II)	Ni(II)	Cu(II)	Ni(II)
MHL	10,82(6)	10,58(4)		
ML	6,09(3)	4,47(4)	5,36(3)	3,6(1)
MH₁L			-0,05(2)	-4,49(9)
MH₂L	-3,20(2)	-8,26	-6,29(2)	-12,56(7)

M16. táblázat A védett multihisztidin peptidek deprotonálódási állandói

	pK(COOH)	pK ₁ (His)	pK ₂ (His)	pK ₃ (His)	pK ₄ (His)
Ac-HGH-OH ¹⁷³	2,68	6,30	7,18		
Ac-HGH-NHMe ¹⁷³		6,05	6,77		
Ac-S1H2-NH₂ ^{D24}		5,99	6,82		
Ac-HHVGd-NH₂ ^{D23}	3,43	6,06	6,91		
Ac-HGGH-NH₂ ¹⁷³		6,04(1)	6,84(1)		
Ac-HVVH-NH₂ ¹⁷⁵		6,01	6,73		
Ac-HHGH-OH ¹⁷³	2,80	6,02	6,64	7,32	
Ac-HHGH-NHMe ¹⁷³		5,71	6,28	7,04	
Ac-HGHVH-NH₂ ^{D22}		5,72	6,33	6,93	
Ac-HVHGH-NH₂ ^{D22}		5,72	6,31	6,92	
Ac-HAHVH-NH₂ ^{D22}		5,67	6,24	6,83	
Ac-HVHAH-NH₂ ^{D22}		5,75	6,31	6,94	
Ac-HPHAH-NH₂ ^{D22}		5,74	6,31	6,93	
Ac-HVPHH-NH₂ ^{D22}		5,78	6,32	6,93	
Ac-S2H3-NH₂ ^{D24}		5,68	6,31	7,00	
Ac-S3H4-NH₂ ^{D24}		5,51	6,15	6,45	7,12

M17. táblázat Két hisztidint tartalmazó peptidek átmenetifém-komplexeinek stabilitási állandói ($\lg\beta$)

	Ac-HGH-OH	Ac-HGH-NHME	Ac-HHVGD-NH₂	Ac-HGGH-NH₂	Ac-HVVH-NH₂
Hivatkozás	172	172	D23		175
CuL₂		10,62		9,79(3)	9,52
CuHL	10,89	10,69	10,87		
CuL	6,90	6,32	6,24	5,98(1)	5,79
CuH₁L	0,27	-0,11	-0,24		-1,05
CuH₂L	-6,54	-5,91	-7,70	-7,88(2)	-9,21
CuH₃L	-16,72	-16,01	-18,04	-16,10(3)	-17,60
Hivatkozás	D25	D25			
NiL₂	7,89	6,93			
NiHL	9,79	9,32			
NiL	4,57	4,02			
NiH₁L	-4,77				
NiH₂L	-13,60	-13,28			
NiH₃L	-23,53	-22,17			
CoL₂	5,85	6,93			
CoL	3,40	4,02			
CoH₁L	-5,54				
CoH₂L	-15,42	-13,28			
CdHL	9,76				
CdL	3,90	3,76			
CdH₁L		-5,9			

M18. táblázat Három hisztidint tartalmazó peptidek átmenetifém-komplexeinek stabilitási állandói ($\lg\beta$)

	Ac- HHGH- OH	Ac- HHGH- NHME	Ac- HGHVH -NH ₂	Ac- HVHGH -NH ₂	Ac- HAHVH- NH ₂	Ac- HVHAH- NH ₂	Ac- HPHAH- NH ₂	Ac- HAHPH- NH ₂
<i>Hivatkozás</i>	<i>172</i>	<i>172</i>	<i>D22</i>	<i>D22</i>	<i>D22</i>	<i>D22</i>	<i>D22</i>	<i>D22</i>
CuHL	13,13	12,79	13,10	13,09	13,08	13,33	13,07	13,02
CuL	7,87	7,22	8,07	7,78	8,08	8,42	7,91	8,01
CuH₁L	0,95	0,79	1,24	1,13	1,27	1,83	1,24	1,01
CuH₂L	-7,43	-6,12	-6,03	-6,25	-5,85	-5,57	-5,77	-6,57
CuH₃L	-17,29	-15,24	-16,47	-16,39	-15,81	-15,10	-15,46	-16,24
Cu₂H₂L			-1,37	-1,33	-1,08	-1,01		
Cu₂H₄L			-14,05	-14,46	-13,63	-13,52		
Cu₂H₅L			-24,82	-24,14	-23,82	-23,28		
Cu₂H₆L			-35,55	-35,78	-34,24	-34,21		
<i>Hivatkozás</i>	<i>D25</i>		<i>D25</i>	<i>D25</i>	<i>D25</i>			
NiL₂	8,32							
NiHL	11,48		10,80	10,83	11,04			
NiL	5,04		5,36	4,80	5,20			
NiH₁L	-3,89							
NiH₂L	-12,54		-13,17	-12,59	-12,62			
NiH₃L	-22,32		-22,46	-22,04	-22,49			
Ni₂H₂L			-9,75	-8,91	-9,24			
Ni₂H₄L			-26,60	-25,73	-26,55			
Ni₂H₅L				-35,64	-36,74			
CoHL			10,0	10,33	9,82			
CoL	4,40		3,9	4,16	3,74			
CoH₁L			-4,6	-5,64	5,64			
CdHL	10,86							
CdL	4,42							
CdH₁L	-3,27							

M19. táblázat Szarkozint tartalmazó multihisztidin peptidek átmenetifém-komplexeinek stabilitási állandói ($\lg\beta$) ($\text{Cu(II)}^{\text{D24}}$, Ni(II) , Zn(II) , $\text{Co(II)}^{\text{D25}}$)

	Ac-S1H2-NH ₂	Ac-S2H3-NH ₂	Ac-S3H4-NH ₂
CuL₂	11,25		
CuH₂L		17,19	19,46
CuHL	10,82	12,78	14,53
CuL	6,48	8,14	9,29
CuH₁L	-0,55	-1,33	
NiL₂	7,15	8,76	
NiH₂L			17,34
NiHL	9,40	10,84	11,95
NiL	3,89	5,28	6,04
ZnH₂L			16,85
ZnHL		10,19	11,38
ZnL	3,66	4,79	5,58
ZnH₁L	-3,61	-2,39	
CoHL			10,34
CoL	3,05	3,68	3,85
CdHL			10,65
CdL	3,24	3,67	4,14

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

- D1. Imre Sóvágó*, Csilla Kállay, Katalin Várnagy
Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes
Coord. Chem. Rev., **2012**, **256**, 2225– 2233.
- D2. Imre Sóvágó, Katalin Várnagy
Cadmium(II) Complexes of Amino Acids and Peptides in “*Cadmium: From Toxicity to Essentiality*” in “*Metal Ions in Life Sciences*” eds. A. Sigel, H. Sigel and K.O. Sigel, Springer Science + Business Media B.V., Dordrecht, **2013**, vol. 11, ch. 9, pp. 275-302.
- D3. Katalin Várnagy, Imre Sóvágó*, Károly Ágoston, Zsuzsanna Likó, Helga Süli-Vargha, Daniele Sanna, Giovanni Micera
Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) and zinc(II) complexes of peptides containing bis(imidazolyl) ligands
J. Chem. Soc., Dalton Trans., **1994**, 2939-2945.
- D4. Katalin Várnagy* and Helga Süli-Vargha
Copper(II) and zinc(II) complexes of peptides as models for collagenase inhibitors in "Molecular Modeling and Dynamics of Bioinorganic Systems", NATO ASI Series, ed. L. Banci and P. Comba, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, **1997**, p. 441-463.
- D5. Katalin Várnagy, Imre Sóvágó*, Wolfgang Goll, Helga Süli-Vargha, Giovanni Micera, Daniele Sanna
Potentiometric and spectroscopic studies on transition metal complexes of bis(imidazolyl) and bis(piridyl) derivatives of amino acids
Inorg. Chim. Acta, **1998**, **283**, 233-242.
- D6. Katalin Várnagy*, Imre Sóvágó, Helga Süli-Vargha, Daniele Sanna, Giovanni Micera
The effect of histidyl residues on the complexation of bis(imidazolyl) containing tripeptides with copper(II) ion
J. Inorg. Biochem., **2000**, **81**, 35-41.
- D7. Katalin Ösz, Katalin Várnagy, Helga Süli-Vargha, Daniele Sanna, Giovanni Micera, Imre Sóvágó*
Copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of amino acids containing bis(imidazol-2-yl)methyl residues
Inorg. Chim. Acta **2002**, **339**, 373-382.
- D8. Imre Sóvágó, Katalin Várnagy*, Katalin Ösz
Metal complexes of peptides containing monodentate or chelating imidazole nitrogen donors: Factors influencing the coordination of amide groups and imidazole side chains
Comments on Inorg. Chem., **2002**, **23**, 149-178.
- D9. Katalin Ösz, Katalin Várnagy, Helga Süli-Vargha, Daniele Sanna, Giovanni Micera, Imre Sóvágó*
Transition metal complexes of bis(imidazol-2-yl) derivatives of dipeptides
J. Chem. Soc., Dalton Trans., **2003**, 2009-2016.
- D10. Imre Sóvágó*, Katalin Ösz, Katalin Várnagy
Copper(II) complexes of amino acids and peptides containinig chelating bis(imidazolyl) residues

Bioinorg. Chem. Appl., **2003**, *1*, 123-139.

- D11. Katalin Várnagy*, Katalin Ósz, Csilla Kállay, Imre Sóvágó
The effect of side chain donor groups on the coordination ability of the bis(imidazol-2-yl) ligands
Progress in Coordination and Bioinorganic Chemistry, **2003**, *6*, 95-100.
- D12. Csilla Kállay, Manuela Cattari, Daniele Sanna, Katalin Várnagy*, Helga Süli-Vargha, Imre Sóvágó, Giovanni Micera
Copper(II) complexes of amino acid derivatives of bis(imidazol-2-yl)methyl residue
New J. Chem., **2004**, *28*, 727-734.
- D13. Katalin Ósz, Katalin Várnagy, Helga Süli-Vargha, Antal Csámpay, Daniele Sanna, Giovanni Micera, Imre Sóvágó*
Acid-base properties and copper(II) complexes of dipeptides containing histidine and additional chelating bis(imidazol-2-yl) residues
J. Inorg. Biochem., **2004**, *98*, 24-32.
- D14. Olga Szilágyi, Katalin Ósz, Daniele Sanna, Helga Süli-Vargha, Imre Sóvágó, Giovanni Micera, Katalin Várnagy*
Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) and zinc(II) complexes of bis(imidazol-2-yl) derivatives of tripeptides,
Polyhedron, **2006**, *25*, 3173-3182.
- D15. Katalin Várnagy, Timea Csorba, Dóra Kiss, Eugenio Garribba*, Giovanni Micera*, Daniele Sanna
V^{IV}O complexes of bis(imidazolyl) derivatives: a potentiometric, spectroscopic and dft study,
Eur. J. Inorg. Chem., **2007**, 4884-4896.
- D16. Paul V. Bernhardt, Peter Comba*, Anna Mahu-Rickenbach, Sandra Stebler, Silvio Steiner, Katalin Várnagy, Maragarea Zehnder
Transition metal complexes of the novel tridentate di-2-pyridylmethanamine (dipa)
Inorg. Chem., **1992**, *31*, 4194-4200.
- D17. Katalin Ósz, Katalin Várnagy*, Imre Sóvágó, Lídia Lennert, Helga Süli-Vargha, Daniele Sanna, Giovanni Micera
Equilibrium and structural studies on transition metal complexes of amino acid derivatives containing the bis(pyridin-2-yl)methyl residue
New J. Chem., **2001**, *25*, 700-706.
- D18. Luisa Pisano, Dóra Kiss, Katalin Várnagy, Daniele Sanna, Giovanni Micera*, Eugenio Garribba*
Potentiometric, spectroscopic and DFT study of the V^{IV}O complexes formed by bis(pyridin-2-yl) ligands
Eur. J. Inorg. Chem., **2009**, 2362-2374.
- D19. Sabine L. Best, Tapan K. Chattopadhyay, Milos I. Djuran, Rex A. Palmer, Peter J. Sadler*, Imre Sóvágó, Katalin Várnagy
Gold(II) and palladium(II) complexes of glycylglycyl-L-histidine: crystal structures of [AuIII(Gly-Gly-L-His-H-2)]Cl·H₂O and [PdII(Gly-Gly-L-His-H-2)·1.5H₂O and HisNH deprotonation
J. Chem. Soc., Dalton Trans., **1997**, 2587-2596.

- D20. Katalin Várnagy, Julianna Szabó, Imre Sóvágó*, Gerasimos Malandrinos, Nick Hadjiliadis, Daniele Sanna, Giovanni Micera
Equilibrium and structural studies on copper(II) complexes of tetra-, penta- and hexapeptides containing histidyl residues at the C-termini
J. Chem. Soc., Dalton Trans., **2000**, 467-472.
- D21. Katalin Várnagy*, Eugenio Garribba, Daniele Sanna, Imre Sóvágó, Giovanni Micera
Potentiometric and spectroscopic studies on copper(II) complexes of non-proteinogenic histidine analogues
Polyhedron, **2005**, 24, 799-806.
- D22. Csilla Kállay, Katalin Várnagy, Gerasimos Malandrinos, Nick Hadjiliadis, Daniele Sanna, Imre Sóvágó*
Copper(II) complexes of terminally protected pentapeptides containing three histidyl residues in alternating positions, Ac-His-Xaa-His-Yaa-His-NH₂
Dalton Trans., **2006**, 4545-4552.
- D23. Csilla Kállay, Zoltán Nagy, Katalin Várnagy, Gerasimos Malandrinos, Nick Hadjiliadis, Imre Sóvágó*
Thermodynamic and structural characterization of peptides containing both histidyl and aspartyl residues
Bioinorg. Chem. Appl., DOI: 10.1155/2007/30394, **2007**
- D24. Csilla Kállay, Katalin Várnagy, Gerasimos Malandrinos, Nick Hadjiliadis, Daniele Sanna, Imre Sóvágó*
Thermodynamic and structural characterization of the macrochelates formed in the reactions of copper(II) and zinc(II) with peptides of histidine
Inorg. Chim. Acta., **2009**, 362, 935-945.
- D25. Sarolta Timári, Csilla Kállay, Katalin Ósz, Imre Sóvágó, Katalin Várnagy*
Transition metal complexes of short multihistidine peptides
Dalton Trans., **2009**, 1962-1971.
- D26. Sarolta Timári, Riccardo Cerea, Katalin Várnagy*
Characterization of CuZnSOD model complexes from a redox point of view: redox properties of copper(II) complexes of imidazole containing ligands
J. Inorg. Biochem., **2011**, 109, 1009-1017.

AZ IRODALMI ÁTTEKINTÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK

- K1. I. Sóvágó and K. Várnagy
Metal binding selectivity of oligopeptides
in "Cytotoxic, Mutagenic and Carcinogenic Potential of Heavy Metals Related to Human Environment", NATO ASI Series, ed. N.D. Hadjiliadis, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, **1996**, 537-547.
- K2. I. Sóvágó, D. Sanna, A. Dessi, K. Várnagy and G. Micera
EPR and potentiometric reinvestigation of copper(II) complexation with simple oligopeptides and related compounds
J. Inorg. Biochem., **1996**, 63, 99-117.
- K3. Csilla Kállay, Katalin Várnagy, Giovanni Micera Daniele Sanna and Imre Sóvágó
Copper(II) complexes of oligopeptides containing aspartyl and glutamyl residues. Potentiometric and spectroscopic studies.
J. Inorg. Biochem., **2005**, 15, 1514-1525.
- K4. Csilla Kállay, Imre Sóvágó, and Katalin Várnagy
Nickel(II) complexes of oligopeptides containing aspartyl and glutamyl residues. Potentiometric and spectroscopic studies.
Polyhedron, **2007**, 26, 811-817.
- K5. Csilla Kállay, Katalin Várnagy, Imre Sóvágó, Daniele Sanna and Giovanni Micera
Potentiometric and spectroscopic studies on the transition metal complexes of GlyLys(Gly) and Asp-ε-Lys
J. Chem. Soc., Dalton Trans., **2002**, 92-98.
- K6. T. Kowalik-Jankowska, K. Várnagy and C. Bertalan
Copper complexes with oligopeptides containing serine, methionine or phenylalanine residues
J. Chem. Research, **1993**, 172-173.
- K7. K. Várnagy, B. Bóka, I. Sóvágó, D. Sanna, P. Marras and G. Micera
Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) and nickel(II) complexes of tripeptides of methionine
Inorg. Chim. Acta, **1998**, 275-276, 440-446
- K8. Katalin Ósz, Beáta Bóka, Katalin Várnagy, Imre Sóvágó, Tibor Kurtán, Sándor Antus
The application of circular dichroism and coordination modes of peptide complexes
Polyhedron, **2002**, 21, 2149-2159
- K9. Beáta Bóka, Zoltán Nagy, Katalin Várnagy, Imre Sóvágó
Solution equilibria and structural characterisation of the palladium(II) and mixed metal complexes of peptides containing methionyl residues
J. Inorg. Biochem., **2001**, 83, 77-89.
- K10. K. Várnagy, I. Sóvágó and H. Kozłowski
Transition metal complexes of amino acids and derivatives containing disulphide bridges
Inorg. Chim. Acta, **1988**, 151, 117-123.

-
- K11. Csaba G. Ágoston, Katalin Várnagy, Attila Bényei, Daniele Sanna, Giovanni Micera, Imre Sóvágó
Solution equilibria and structural characterisation of the transition metal complexes of glycyl-L-cysteine disulfide
Polyhedron, **2000**, *19*, 1849-1857.
- K12. P. Danyi, K. Várnagy, I. Sóvágó, I. Schön, D. Sanna and G. Micera
Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) complexes of peptide hormones containing disulfide bridges
J. Inorg. Biochem., **1995**, *60*, 69-78.
- K13. I. Sóvágó, T. Kiss, K. Várnagy and B. Decock-Le Révérend
Cobalt(II) and zinc(II) complexes of cysteine containing dipeptides
Polyhedron, **1988**, *7*, 1089-1093.
- K14. K. Cherifi, B. Decock-Le Révérend, K. Várnagy, T. Kiss, I. Sóvágó, C. Loucheux and H. Kozłowski
Transition metal complexes of L-cysteine containing di- and tripeptides
J. Inorg. Biochem., **1990**, *38*, 69-80.
- K15. H. Kozłowski, J. Urbanska, I. Sóvágó, K. Várnagy, A. Kiss, J. Sychala and K. Cherifi
Cadmium ion interaction with sulphur containing amino acid and peptide ligands
Polyhedron, **1990**, *9*, 831-837.

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

1. **Várnagy Katalin**, Sóvágó Imre, Süli-Vargha Helga, Likó Zsuzsanna
Bisz-imidazolil csoportot tartalmazó peptidszármazékok komplexeinek egyensúlyi vizsgálata
XXVIII. Komplexkémiái Kollokvium, Szekszárd, 1 - 3 June, 1993
2. **Várnagy Katalin**, Sóvágó Imre, Ágoston Károly, Likó Zsuzsanna és Süliné Vargha Helga
Bisz-imidazolil csoportot tartalmazó peptidszármazékok átmenetifém komplexeinek egyensúlyi vizsgálata, *Peptidkémiái Munkabizottság ülészsaka, Budapest, 24 - 25 Január, 1994*
3. **Katalin Várnagy**, Imre Sóvágó, Wolfgang Goll
Potentiometric and spectroscopic studies on transition metal complexes of di-pyridyl derivative of prolineamide, *COST Chemistry D1 Workshop, Copenhagen, 16-18 May, 1996*
4. **Katalin Várnagy**, Helga Süli-Vargha
Copper(II) and zinc(II) complexes of peptides, as the models of collagenase inhibitors
NATO Advanced Research Workshop on Molecular Modeling and Dynamics of Biological Molecules Containing Metal Ions, San Miniato (Italy), 15-21 March, 1997
5. **Várnagy Katalin**, Sóvágó Imre, Süliné Vargha Helga, Likó Zsuzsanna
Bisz(2-imidazolil)-csoportot tartalmazó peptid- és aminosavszármazékok átmenetifém komplexei, *XXXIII. Komplexkémiái Kollokvium, Kecskemét, 4 - 6 June, 1997*
6. **Katalin Várnagy**, Imre Sóvágó
Metal ion speciation in the bis(imidazolyl) containing systems, *COST D8 and ESF Workshop on Biological and Medicinal Aspects of Metal Ion Speciation, Szeged, 22-25 August, 1998.*
7. **Katalin Várnagy**
Effect of the side chain donors on the complexation of peptides, *Tanszéki Szeminárium, University of Ioannina, Department of Chemistry, Ioannina (Greece), 22 October, 1998*
8. Szabó Julianna, **Várnagy Katalin**, Sóvágó Imre
C-terminális hisztidint tartalmazó oligopeptidek átmenetifém komplexei, *XXXV. Komplexkémiái Kollokvium, Kecskemét, 2000. május 24-26.*
9. **Katalin Várnagy**, Katalin Ösz, Imre Sóvágó, Helga Süli-Vargha
The effect of C-terminal chelating group on the complexation of oligopeptides, *International Symposium, Metals in Environmental Medicine, Wroclaw, Poland, 18-21 October, 2000*
10. **Várnagy Katalin**, Ösz Katalin, Kállay Csilla, Sóvágó Imre, Süli-Vargha Helga
Oldalláncbeli donorcsoportok hatása a bisz(imidazolil) származékok komplexképző sajátosságaira, *XXXVII. Komplexkémiái Kollokvium, Mátraháza, Május 29-31, 2002,*
11. **Katalin Várnagy**, Katalin Ösz, Csilla Kállay, Imre Sóvágó
The effect of side chain donor groups on the coordination ability of the bis(imidazol-2-yl) ligands, *19th International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry, Smolenice, Slovakia, 2-6 June, 2003*

-
12. **Katalin Várnagy**, Katalin Ósz, Csilla Kállay, Imre Sóvágó
Coordination chemistry of amino acid and peptide derivatives containing bis(imidazol-2-yl)methyl residue, *XXXVI International Conference on Coordination Chemistry (ICCC36)*, **Merida-Yucatan, Mexico, July 18-23, 2004**
 13. **Várnagy Katalin**, Ósz Katalin, Kállay Csilla, Süli-Vargha Helga
Bisz(imidazol-2-il) csoportot tartalmazó aminosav- és peptidszármazékok komplexképző sajátságai, *XL. Komplexkémiiai Kollokvium*, **Dobogókő, 2005. május 18-20.**
 14. **Várnagy Katalin**
Több donorcsoportot tartalmazó aminosav- és peptidszármazékok koordinációs viszonyai *XLIV. Komplexkémiiai Kollokvium*, **Siófok, 2009. május 27-29.**
 15. **Várnagy Katalin**
Coordination ability of amino acid and peptide derivatives containing various donor atoms *MKE. I. Nemzeti Konferencia (National Conference I.)*, **Sopron, Hungary, Május 22-25, 2011**
 16. **Katalin Várnagy**
Coordination ability of amino acid and peptide derivatives containing various donor atoms. Modelling of metal ion – protein interaction, *4th European Conference on Chemistry for Life Sciences*, **Budapest, Hungary, Aug. 31-Sept. 3, 2011**

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ POSZTEREK

1. Katalin Várnagy, Imre Sóvágó, Zsuzsanna Likó and Helga Süli-Vargha
Equilibrium studies on transition metal complexes of peptides containing bis-imidazole ligands
ESF Workshop, Impact of Non-platinum Metal Ions on Drugs, Chemotherapeutics and Related Compounds, Wrocław-Karpacz (Poland), 1 - 4 September, 1993
2. Katalin Várnagy, Imre Sóvágó, Zsuzsanna Likó, Helga Süli-Vargha, Daniele Sanna and Giovanni Micera
Equilibrium and spectroscopic studies on transition metal complexes of peptides containing bis-imidazole ligands, *Eurobic II, Metal Ions in Biological Systems, Florence (Italy)*, 30 August - 3 September, 1994
3. Katalin Várnagy, Imre Sóvágó, Wolfgang Goll
Potentiometric and spectroscopic studies on transition metal complexes of di-pyridyl derivative of prolineamide, *Cytotoxic, Mutagenic and Carcinogenic Potential of Heavy metals Related to Human Environment, Prziesieka (Poland)*, 15-26 June, 1996
4. Katalin Várnagy and Imre Sóvágó
Metal ion speciation of peptide complexes containing bis(imidazolyl) agents, *EUROBIC 4, Fourth European Biological Chemistry Conference, Seville (Spain)*, July 20-25, 1998
5. Katalin Várnagy, Imre Sóvágó, Helga Süli-Vargha, Katalin Ösz and Lidia Lennert
The effect of bis(imidazol-2-yl) and bis(pyridin-2-yl) groups on complex formation processes of amino acids and peptides,
XXXIII International Conference on Coordination Chemistry (ICCC), Florence (Italy), August 30 - September 4, 1998
6. Katalin Várnagy, Julianna Szabó, Katalin Ösz, Imre Sóvágó, Helga Süli-Vargha, Katalin Giovanni Micera, Daniele Sanna
The effect of C-terminal imidazol ring on the complexation of oligopeptides containing histidyl or bis(imidazolyl) groups, *5th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EUROBIC 5), Toulouse (France), July 17-20, 2000*
7. Katalin Várnagy, Katalin Ösz, Csilla Kállay, Imre Sóvágó, Helga Süli-Vargha, Daniele Sanna, Giovanni Micera
The effect of coordinating donor group on the complexation of bis(imidazolyl) derivatives, *XXXVth International Conference on Coordination Chemistry, ICC35, Heidelberg, Germany, 21-26 July, 2002*
8. Katalin Várnagy, Csilla Kállay, Helga Süli-Vargha, Daniele Sanna, Giovanni Micera
The effect of carboxylate group on the complexation of amino acid derivatives of bis(imidazol-2-yl) group, *28th International Conference on Solution Chemistry, Debrecen, Hungary, 23-28 August, 2003*
9. K. Várnagy, K. Ösz, Cs. Kállay, O. Szilágyi, M. Cattari, D. Sanna, I. Sóvágó, G. Micera
Coordination chemistry of amino acid and peptide derivatives containing bis(imidazol-2-yl)methyl residue, *7th European Biological Inorganic Chemistry Conference (Eurobic7), Garmisch-Partenkirchen, Germany, August 29 – September 2, 2004*

10. **Katalin Várnagy**, Csilla. Kállay, Imre Sóvágó, Gersaimos Malandrinis and Nick Hadjiliadis
Copper(II) complexes of pentapeptides related to the active site of Cu,Zn-SOD, *Cost Chemistry D20, 10th Management Committee Meeting and Final Conference, "Metal Compounds in the Treatment of Cancer and Viral Diseases, Brno, Czech Republic, June 15-18, 2006*
11. **K. Várnagy**, S. Timári, A. Dávid, Cs. Kállay, K. Ösz, I. Sóvágó
Transition metal complexes of small multihistidine peptides, *2nd European Conference on Chemistry for Life Sciences, Wroclaw, Poland, 4-8 September, 2007*
12. **Katalin Várnagy**, Imre Takács, Tamás Tarcsa, Csilla Kállay
Copper(II) and nickel(II) complexes of peptides containing histidine analogue amino acids
4th EuCheMS Conference on Nitrogen Ligands, Garmisch-Partenkirchen, Germany, August 24-28, 2008
13. **Katalin Várnagy**, Imre Takács, Tamás Tarcsa, Csilla Kállay
Copper(II) complexes of peptides containing histidine analogue amino acids, *Copper 08, 6th International Copper Meeting, Copper and Related Metals in Biology, Alghero, Sardinia - Italy, October 11-15, 2008*
14. **Katalin Várnagy**, Dóra Kiss, Zsuzsanna Kovács, Katalin Ösz, Daniele Sanna, Eugenio Garribba, Giovanni Micera
Transition metal complexes of non-proteinogenic histidine analogue amino acids and their tripeptide derivatives, *10th European Biological Inorganic Chemistry Conference (Eurobic 10), Thessaloniki, Greece, June 22-26, 2010*
15. **Katalin Várnagy**, Dóra Kiss, Zsuzsanna Kovács, Katalin Ösz, Daniele Sanna, Eugenio Garribba, Giovanni Micera
Transition metal complexes of non-proteinogenic histidine analogue amino acids and their tripeptide derivatives, *The 5th Central European Conference - Chemistry towards Biology, Primosten, Croatia, 8-11 Sept, 2010*
16. **Katalin Várnagy**, Sarolta Timári, Gizella Csire, Norbert Lihi
Coordination and redox properties of copper(II) and iron(II/III) complexes of bis(imidazol-2-yl) ligands, *11th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, Barcelona, Spain, 2-5. Dec, 2011*
17. **Katalin Várnagy**, Sarolta Timári, Dóra Serfőző, József Asztalos, Mariann Kiss
Coordination ability of small multihistidine peptides, *Internation Symposium on Metal Complexes*
Lisbon, Portugal, 18-22. June, 2012
18. **Sarolta Timári, Katalin Várnagy**
Copper(II) complexes of histidine containing peptides as models of the Cu,Zn-SOD enzyme, *Internation Symposium on Metal Complexes*
Lisbon, Portugal, 18-22. June, 2012
19. **Sarolta Timári, Katalin Várnagy**
Copper(II) complexes of imidazole containing ligands as models of the Cu,Zn-SOD enzyme
11th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Granada, Spain, 12-16. September, 2012

HIVATKOZÁSOK

1. I. Bertini, C. Luchinat, A. Scozzafava, *Struc. Bonding*, **1982**, 48, 45-92.
2. F.A. Quichio, W.N. Lipscomb, *Adv. Protein Chem.*, **1971**, 25, 1-78.
3. P.M. Collman, H.C. Freeman, J.M. Guss, M. Murata, V.A. Norris, J.A.M. Ramshaw, M.P. Venkatapp, *Nature*, **1978**, 272, 319-324.
4. H. Sigel, R.B. Martin, *Chem. Rev.*, **1982**, 82, 385-426.
5. I. Sóvágó, K. Ösz, *Dalton Trans.*, (2006) 3841-3854.
6. I. Sóvágó, Metal complexes of peptides and their derivatives, in *Biocoordination Chemistry*, ed. K. Burger, Ellis Horwood, New York, **1990**, pp. 135-184.
7. L.D. Pettit, J.E. Gregor, H. Kozłowski, Complex formation between metal ions and peptides, in *Perspectives on Bioinorganic Chemistry*, ed. R.W. Hay, J.R. Dilworth, K.B. Nolan, Jai Press Ltd, London, **1991**, vol. 1. pp. 1-41.
8. L.D. Pettit, R.A. Robinson, Metal-peptide complex formation, in *Handbook of Metal-Ligand Interaction in Biological Fluids*, ed. G. Berthon, Marcel Dekker Inc., New York, **1995**, vol. 1, pp. 636-647.
9. R.B. Martin, Nickel binding to amino acids and peptides, in *Metal Ions in Biological Systems*, ed. H. Sigel and A. Sigel, Marcel Dekker Inc., New York and Basel, **1988**, vol. 23, pp. 123-164.
10. E. Farkas, I. Sóvágó, Metal complexes of amino acids and peptides, in *Special Periodical Reports, Amino Acids, Peptides and Proteins*, ed. G.C. Barrett and J.S. Davies, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1988**, vol. 29, **2000**, vol. 31, **2002**, vol. 33.
11. A.Q. Lyons, L.D. Pettit, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1984**, 2305-2308.
12. R. Ferrari, S. Bernés, C.R. De Barbarin, G. Mendoza-Diaz, L. Gasque, *Inorg. Chim. Acta*, **2002**, 339, 193-201.
13. J. Torres, C. Kremer, E. Kremer, H. Pardo, S. Russi, Á. Mombrú, S. Dominguez, A. Mederos, *Inorg. Chim. Acta*, **2003**, 355, 442-448.
14. N.V. Nagy, T. Szabó-Plánka, A. Rockenbauer, G. Peintler, I. Nagypál, L. Korecz, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 5227-5235.
15. I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely, *Inorg. Chim. Acta*, **1984**, 93, L53-L55.
16. I. Sóvágó, C. Bertalan, L. Göbl, I. Schön, O. Nyéki, *J. Inorg. Biochem.*, **1994**, 55, 67-75.
17. M. Raics, C. Kállay, I. Sóvágó, nem publikált eredmények
18. H. Kozłowski, A. Lebkiri, Ch.O. Onindo, L.D. Pettit, A.F. Galey, *Polyhedron*, **1995**, 14, 211-218.
19. V. Józsa, I. Sóvágó, *Polyhedron*, **2011**, 30, 2114-2120.
20. C.G. Ágoston, Z. Miskolczy, Z. Nagy, I. Sóvágó, *Polyhedron*, **2003**, 22, 2607-2615.
21. J. E. Folk, J.S. Finlayson, *Adv. Protein Chem.*, 31 **1977**, 1-133.
22. J.L. Strominger, M. Ghuysen, *Science*, **1967**, 156, 213-221.

23. J.-M. Ghuysen, J.L. Strominger, D.J. Tripper, *Compr. Biochem.*, **1968**, 26A, 53-104.
24. P.G. Daniele, E. Prenesti, G. Ostacoli, *J. Inorg. Biochem.*, **1996**, 61, 165-177.
25. D.B. McCormick, R. Griesser, H. Sigel, in *Metal Ions in Biological Systems*, ed. H. Sigel, Marcel Dekker Inc., New York, **1974**, vol. 1.
26. B. Decock, H. Kozlowski, *J. Chim. Phys.*, **1985**, 82, 883-890.
27. I. Sóvágó, Gy. Petöcz, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1987**, 1717-1720.
28. B. Decock-Le Reverand, C. Loucheux, T. Kowalik, H. Kozlowski, *Inorg. Chim. Acta*, **1982**, 66, 205-212.
29. H. Kozlowski, B. Decock-Le Reverand, J.-L. Delaruelle, C. Loucheux, B. Ancian, *Inorg. Chim. Acta*, **1983**, 78, 31-35.
30. B.T. Khan, S. Shamsuddin, K. Venkatasubramanian, *Polyhedron*, **1992**, 11, 671-676.
31. B.T. Khan, S. Shamsuddin, S.R.A. Khan, K. Annapoorna, T. Satyanarayana, *J. Coord. Chem.*, **1995**, 36, 81-93.
32. M. Calaf, A. Caubet, V. Moreno, M. Font-Bardia, X. Solans, *J. Inorg. Biochem.*, **1995**, 59, 63-77.
33. X. Luo, W. Huang, Y. Mei, S. Zhou, L. Zhu, *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 1474-1480.
34. A. Krezel, W. Bal, *Acta Biochim. Pol.*, **1999**, 46, 567-580.
35. A. Krezel, W. Bal, *Bioinorg. Chem. Appl.*, **2004**, 2, 293-305.
36. A. Krezel, J. Wojcik, M. Maciejczyks, W. Bal, *Inorg. Chem.*, **2011**, 50, 72-85.
37. I. Sóvágó, Metal complexes of sulfhydryl containing peptides, in *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids*, ed. G. Berthon, Marcel Dekker, New York, **1995**, vol. 1., pp. 657-665.
38. D. Carillo, *Coord. Chem. Rev.*, **1992**, 119, 137-169.
39. T.G. Appleton, *Coord. Chem. Rev.*, **1997**, 166, 313-359.
40. H. Kozlowski, B. Decock-Le Reverand, D. Ficheux, C. Loucheux, I. Sóvágó, *J. Inorg. Biochem.*, **1987**, 29, 187-197.
41. H. Kozlowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankoska, *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, 184, 319-346.
42. P. Tsiveriotis, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, 190-192, 171-184.
43. H. Kozlowski, A. Janicka-Klos, P. Stanczak, D. Valensin, G. Valensin, K. Kulon, *Coord. Chem. Rev.*, **2008**, 252, 1069-1078.
44. G. Brooks, L.D. Pettit, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1975**, 2112-2117.
45. I. Sóvágó, E. Farkas, A. Gergely, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1982**, 2159-2163.
46. N. Jakab, B. Gyurcsik, T. Körtvéleysi, I. Vosekalna, J. Jensen, E. Larsen, *J. Inorg. Biochem.*, **2007**, 101, 1376-1385.
47. E. Farkas, I. Sóvágó, A. Gergely, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1983**, 1545-1551.
48. P.J. Morris, R.B. Martin, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1971**, 33, 2913-2918.
49. W. Bal, M. Jezowska-Bojczuk, K.S. Kasprzak, *Chem. Res. Toxicol.*, **1997**, 10, 906-914.

50. Ch. Conato, H. Kozłowski, P. Mlynarz, F. Pulidori, M. Remelli, *Polyhedron.*, **2002**, *21*, 1469-1474.
51. G.F. Bryce, R.W. Roeske, F.R.N. Gurd: *J. Biol. Chem.*, **1966**, *241*, 1072-1080.
52. S.J. Lau, T.P.A. Kruck, B. Sarkar: *J. Biol. Chem.*, **1974**, *249*, 5878-5884.
53. M. Wienken, B. Lippert, E. Zangrando, L. Randaccio, *Inorg. Chem.*, **1992**, *31*, 1983-1985.
54. T. Gajda, B. Henry, A. Aubry, J.-J. Delpuech, *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 586-593.
55. Y. Zhang, D.E. Wilcox: *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2002**, *7*, 327-337.
56. P. Mlynarz, D. Valensin, K. Kociolek, J. Zabrocki, J. Olejnik, H. Kozłowski, *New J. Chem.*, **2002**, *26*, 264-268.
57. P. Gizzi, B. Henry, P. Rubini, S. Giroux, E. Wenger, *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, *99*, 1182-1192.
58. R.B. Martin, J.T. Edsall, *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 1107-1111.
59. C. Livera, L.D. Pettit, M. Bataille, B. Perly, H. Kozłowski, B. Radomska, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1987**, 661-666.
60. R. Bonomo, F. Bonsignore, E. Conte, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, R. Purello, E. Rizzaralli, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1993**, 1295-1300.
61. A. Myari, G. Malandrinos, Y. Deligiannakis, J.C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, Z. Nagy, I. Sóvágó, *J. Inorg. Biochem.*, **2001**, *85*, 253-261.
62. F.W. Sunderman Jr., A.H. Varghese, O.S. Kroftova, S. Grbac-Ivankovic, J. Kotyza, A.K. Datta, M. Davis, W. Bal, K.S. Kasprzak, *Mol. Reprod. Dev.*, **1996**, *44*, 507-524.
63. R. Bonomo, L. Casella, L. De Gioia, H. Molinari, G. Impellizzeri, T. Jordan, G. Pappalardo, R. Purrello, E. Rizzarelli, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1997**, 2387-2389.
64. G. Pappalardo, G. Impellizzeri, R.P. Bonomo, T. Campagna, G. Grasso, M.G. Saita, *New J. Chem.*, **2002**, *26*, 593-600.
65. K. Ősz, Z. Nagy, G. Pappalardo, D. Di Natale, D. Sanna, G. Micera, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 7129-7143.
66. G. Di Natale, K. Ősz, Z. Nagy, D. Sanna, G. Micera, G. Pappalardo, I. Sóvágó, E. Rizzarelli, *Inorg. Chem.*, **2009**, *48*, 4239-4250.
67. I. Turi, C. Kállay, D. Szikszai, G. Pappalardo, G. Di Natale, P. De Bona, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, *104*, 885-891.
68. G. Arena, D. La Mendola, G. Pappalardo, I. Sóvágó, E. Rizzarelli, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, *256*, 2202-2218.
69. E. Farkas, I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1984**, 611-614.
70. R. Hay, M. Hassan, C. Y.-Quan, *J. Inorg. Biochem.*, **1993**, *52*, 17-25.
71. J.M. McCord, *Science*, **1974**, *185*, 529-531.
72. L.W. Oberley, G.R. Buettner, *Cancer Res.*, **1979**, *39*, 1141-1149.
73. T.C. Pederson, S.D. Aust, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1973**, *52*, 1071-1078.

-
-
74. M.S. Lah, M.M. Dixon, K.A. Patridge, W.C. Stallings, J.A. Fee, M.L. Ludwig: *Biochemistry*, **1995**, *34*, 1646-1660.
 75. R.A. Edwards, H.M. Baker, M.M. Whittaker, J.W. Whittaker, G.B. Jameson, E.N. Baker: *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1998**, *3*, 161-171.
 76. M.L. Ludwig, A.L. Metzger, K.A. Patridge, W.C. Stallings: *J. Mol. Biol.*, **1991**, *219*, 335-358.
 77. H.D. Youn, E.J. Kim, J.H. Roe, Y.C. Hah, S.O. Kang, *Biochem. J.*, **1996**, *318*, 889-896.
 78. H.D. Youn, H. Youn, J.W. Lee, Y.I. Yim, J.K. Lee, Y.C. Hah, S.O. Kang, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *334*, 341-348.
 79. B. Palenik, B. Brahamsha, F.W. Larimer, M. Land, L. Hauser, P. Chain, J. Lamerdin, W. Regala, E.E. Allen, J. McCarren, I. Paulsen, A. Dufresne, F. Partensky, E.A. Webb, J. Waterbury, *Nature*, **2003**, *424*, 1037-1042.
 80. J.A. Tainer, E.D. Getzoff, J.S. Richardson, D.C. Richardson, *Nature*, **1983**, *306*, 284-287.
 81. H.M. Steinman, V.R. Naik, L.J. Abernathy, R.L. Hill, *J. Biol. Chem.*, **1974**, *249*, 7326-7338.
 82. J.S. Richardson, K.A. Thomas, B.H. Rubin, D.C. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1975**, *72*, 1349-1353.
 83. R.H. Holm, P. Kennepohl, E.I. Solomon, *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 2239-2314.
 84. A. Tainer, E.D. Getzoff, J.S. Richardson, D.C. Richardson, *Nature*, **1983**, *306*, 284-287.
 85. L.M. Ellerby, D.E. Cabelli, J.A. Graden, J.S. Valentine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 6556-6561.
 86. C.S. St. Clair, H.B. Gray, J.S. Valentine, *Inorg. Chem.*, **1992**, 925-927.
 87. H.A. Azah, L. Banci, M. Borsari, C. Luchinat, M. Sola, M.S. Viezzoli, *Inorg. Chem.*, **1992**, 4649-4655.
 88. W.H. Koppenol, *Free Radical Toxicology*, ed. K.B. Wallace, Taylor and Francis, London, **1997**, pp. 3-14.
 89. A.J. Bard, R. Parsons, J. Jordan, *Standard potentials in aqueous solution*, Marcel Dekker Incl, New York, **1985**
 90. M. Bodanszky, *Peptide Chemistry*, A Practical Textbook, Springer-Verlag, **1993**
 91. R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149-2154.
 92. M.J. Leigh, M.C. Swain, *Synthesis*, **1977**, 459-461.
 93. Z. Likó, H. Süli-Vargha, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 1673-1676.
 94. E. Niemers, R. Hittman, *Synthesis*, **1976**, 593-595.
 95. L. Zékány, I. Nagypál, *Computation Methods for the Determination of Formation Constants* (ed.: D.J. Leggett, Plenum Press, New York) **1985**, pp. 291- 299.
 96. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1985**, 1195-1200.
 97. H.M. Irving, M.G. Miles, L.D. Pettit, *Anal. Chim. Acta*, **1967**, *38*, 475-488.
 98. G. Eriksson, *Anal. Chim. Acta*, **1979**, *112*, 375-383.

99. I. Puigdomenech, Hydra/Medusa Chemical Equilibrium Database and Plotting Software, KTH Royal Institute of Technology, freely downloadable software at [<http://www.kemi.kth.se/medusa/>], **2004**
100. G. Gran, *Acta Chem. Scand.*, **1950**, *4*, 559-577.
101. H. Kozłowski, G. Micera: *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids* (eds.: G. Berthon, Marcel Dekker Inc., New York), **1995**, *Vol. 1*, pp. 566-582.
102. C.R. Cantor, P.R. Schimmel: *Biophysical Chemistry*, **2**, **1980**, Chapter 8.
103. R.B. Martin, *Metal ions in Biological Systems*, **1979**, *vol. 9*, 1-39.
104. E.W. Wilson Jr., R.B. Martin, *Inorg. Chem.*, **1970**, *9*, 528-532.
105. J.M. Tsangaris, R.B. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92*, 4255-4260.
106. J.W. Chang, R.B. Martin, *J. Phys. Chem.*, **1969**, *73*, 4277-4283.
107. R.L. Belford, N.D. Chasteen, H. So, R.E. Tapscott, *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, *91*, 4675-4680.
108. J.M. Miller, G.L. Wilson, Some Applications of Mass Spectroscopy in Inorganic and Organometallic Chemistry; In: *Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry* (Eds.: H.J. Emeléns, A.G. Sharpe) Academic Press Inc., London, **1976**., *Vol. 18*.
109. D.J. Harvey, *Mass Spectrometry Reviews* **1999**, *18*, 349-451.
110. D.J. Harvey, *Proteomics*, **2001**, *1*, 311-328.
111. D. Masselon, B. Salih, R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 19-26.
112. T. Kiss, H. Kozłowski, G. Micera, L.S. Erre, *Polyhedron*, **1989**, *8*, 647-651.
113. S. Bourcier, S. Bouchonnet, Y. Hoppilliard, *Int. J. Mass Spectrom.*, **2001**, *210/211*, 59-69.
114. C.M. Land, G.R. Kinsel, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2001**, *12*, 726-731.
115. H. Lavanant, E. Hecquet, Y. Hoppilliard, *Int. J. Mass Spectrom.*, **1999**, *185/186/187*, 11-23.
116. K. Ősz, G. Lente, Cs. Kállay, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, *109*, 1039-1047.
117. G.A. Mabott, *J. Chem. Edu.*, **1983**, *60*, 697-702.
118. P.T. Kissinger, W. R. Heineman, *J. Chem. Edu.*, **1983**, *60*, 702-706.
119. D.H. Evans, K. M. O'Connell, R. A. Petersen, M. J. Kelly, *J. Chem. Edu.*, **1983**, *60*, 290-293.
120. E. Farkas, P. Buglyó, É.A. Enyedy, M.A. Santos, *Inorg. Chim. Acta*, **2004**, *357*, 2451-2461.
121. S. Goldstein, C. Michel, W. Bors, M. Saran, G. Czapski, *Free Radical Biology & Medicine*, **1988**, *4*, 295-303.
122. C.N.C. Drey, J.S. Fruton, *Biochemistry*, **1965**, *4*, 1-5.
123. C.N.C. Dery, J.S. Fruton, *Biochemistry*, **1965**, *4*, 1258-1263.
124. C.C. Tang, D. Davalian, P. Huang, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 3918-3922.

-
-
125. M.S. Mohan, *Ind. J. Chem., Sect. A*, **1981**, 20, 252-257.
 126. E. Fursova, G. Romanenko, V. Ikorskii, V. Ovcharenko, *Polyhedron*, **2003**, 22, 1957-1964.
 127. J.-F. Ma, J. Yang, G.-L. Zheng, L. Li, Y.-M. Zhang, F.-F. Li, J.-F. Liu, *Polyhedron*, **2004**, 23, 553-559.
 128. P.C.A. Bruijnincs, M. Lutz, A. L. Spek, E.E. Van Faassen, B.M. Weckhuysen, G. van Koten, R.J.M. Klein Gebbink, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2005**, 779-787.
 129. T. Gajda, R. Krämer, A. Jancsó, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2000**, 1635-1644.
 130. M. Beretta, E. Bouwman, L. Casella, B. Douziech, W.L. Driessen, L. Gutierrez-Soto, E. Monzani, J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, 310, 41-50.
 131. W.A. Alves, I.A. Bagatin, A.M. Da Costa Ferreira, *Inorg. Chim. Acta*, **2001**, 321, 11-21.
 132. S.-P. Yang, Y.-X. Tong, H.-L. Zhu, H. Cao, X.-M. Chen, L.-N. Ji, *Polyhedron*, **2001**, 20, 223-229.
 133. H. Ohtsu, S. Itoh, S. Nagatomo, T. Kitagawa, S. Ogo, Y. Watanabe, S. Fukuzumi, *Inorg. Chim. Acta*, **2001**, 40, 3200-3207.
 134. A. Jancsó, I. Török, L. Korecz, A. Rockenbauer, T. Gajda, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2002**, 2601-2607.
 135. R.N. Patel, N. Singh, K.K. Shukla, U.K. Chauhan, *Spectrochim. Acta A*, **2005**, 61, 287-297.
 136. R.N. Patel, N. Singh, K.K. Shukla, W.L.N. Gundla, *Spectrochim. Acta A*, **2005**, 61, 1893-1897.
 137. W.L. Driessen, D. Rehorst, J. Reedijk, I. Mutikainen, U. Turpeinen, *Inorg. Chim. Acta*, **2005**, 358, 2167-2173.
 138. F. Holmes, K.M. Jones, E.G. Terrible, *J. Chem. Soc. (A)*, **1961**, 4790-4794.
 139. W.J. Eilbeck, F. Holmes, *J. Chem. Soc. (A)*, **1967**, 1777-1782.
 140. I. Sóvágó, A. Gergely, *Inorg. Chim. Acta*, **1979**, 37, 233-236.
 141. P.D.W. Boyd, A.D. Toy, T.D. Smith, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1973**, 1549-1563.
 142. T. Kiss, T. Jakusch, J. Costa Pessora, I. Tomaz, *Coord. Chem. Rev.*, **2003**, 237, 123-133.
 143. P.J. Morris, R.B. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 1543-1546.
 144. G. Anderegg, E. Hubmann, N.G. Podder, F. Wenk, *Helv. Chim. Acta*, **1977**, 60, 123-140.
 145. A. Abufarag, H. Vahrenkamp, *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 2207-2216.
 146. Y. Gultneh, A.R. Khan, D. Blaise, S. Chaudhry, B. Ahvazi, B.B. Marvey, R.J. Butcher, *J. Inorg. Biochem.*, **1999**, 75, 7-18.
 147. A. Hazell, K.B. Jensen, C.J. McKenzie, H. Toftlund, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1993**, 3249-3257.
 148. H. Bühler, G. Anderegg, *Chimia*, **1970**, 24, 433-436.

149. A. Gergely, I. Nagypál, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1977**, 1104-1108.
150. H. Aiba, A. Yokoyama, H. Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1974**, *47*, 1437-1441.
151. M.R. McDonald, W.M. Scheper, H.D. Lee, D.W. Margerum, *Inorg. Chem.*, **1995**, *34*, 229-237.
152. W.J. Eilbeck, M.S. West, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1976**, 274-278.
153. R.J. Sundberg, R.F. Bryan, I.F. Taylor, H. Taube, *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, *96*, 381-392.
154. R.J. Sundberg, G. Gupta, *Bioinorg. Chem.*, **1973**, *3*, 39-48.
155. C.A. Evans, D.L. Rabenstein, G. Geier, I.W. Erni, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 8106-8108.
156. T.P. Pittner, E.W. Wilson, R.B. Martin, *Inorg. Chem.*, **1972**, *11*, 738-742.
157. B. Decock-Le Reverand, F. Liman, C. Livera, L.D. Pettit, S. Pyburn, H. Kozlowski, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1988**, 887-894.
158. L.D. Pettit, S. Pyburn, H. Kozlowski, B. Decock-Le Reverand, F. Liman, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1989**, 1471-1475.
159. L.D. Pettit, S. Pyburn, W. Bal, H. Kozlowski, M. Bataille, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1990**, 3565-3570.
160. W. Bal, M. Jezowska-Bojczuk, H. Kozlowski, L. Chruscinski, G. Kupryszewski, B. Witczak, *J. Inorg. Biochem.*, **1995**, *57*, 235-247.
161. W. Bal, H. Kozlowski, R. Robbins, L.D. Pettit, *Inorg. Chim. Acta*, **1995**, *231*, 7-12.
162. P. Tsiveriotis, N. Hadjiliadis, I. Sóvágó, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1997**, 4267-4270.
163. B. Gyurcsik, I. Vosekalna, E. Larsen, *Acta Chem. Scand.*, **1997**, *51*, 49-58.
164. K. Hsieh, E.C. Jorgensen, *J. Med. Chem.*, **1979**, *22*, 1199-1206.
165. G.W. Chang, E. Snell, *Biochemistry*, **1968**, *7*, 2005-2012.
166. S. Tanase, B.M. Guirard, E. Snell, *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 6738-6746.
167. D.C. Roberts, F. Vellaccio, *The Peptides*, Academic, New York, **1983**
168. A. Dondoni, A. Massi, E. Minghini, V. Berolasi, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 2311-2326.
169. E. Garribba, G. Micera, D. Sanna, nem publikált eredmények
170. T.P. Kruck, B. Sarkar, *Can. J. Chem.*, **1973**, *51*, 3563-3571.
171. B. Bóka, A. Myari, I. Sóvágó, N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, *98*, 113-122.
172. D. Sanna, G. Micera, C. Kállay, V. Rigó, I. Sóvágó, *Dalton Trans.*, **2004**, 2702-2707.
173. C. Kállay, K. Ősz, A. Dávid, Z. Valastyán, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, I. Sóvágó, *Dalton Trans.*, **2007**, 4040-4047.
174. T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta, K. Wisniewska, L. Lankiewicz, *J. Inorg. Biochem.*, **2003**, *95*, 270-282.
175. S. Rajkovic, C. Kállay, R. Serényi, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, *Dalton Trans.*, **2008**, 5059-5071.

-
-
176. M. Remelli, M. Luczkowski, A.M. Bonna, Z. Mackiewicz, C. Conato, H. Kozłowski, *New J. Chem.*, **2003**, 27, 245-250.
 177. D. Valensin, M. Luczkowski, F.M. Mancini, A. Legowska, E. Gaggelli, G. Valensin, K. Rolka, H. Kozłowski, *Dalton Trans.*, **2004**, 1284-1293.
 178. P. Stanczak, D. Valensin, P. Juszczak, Z. Grzonka, C. Migliorini, E. Molteni, G. Valensin, E. Gaggelli, H. Kozłowski, *Biochemistry*, **2005**, 44, 12940-12954.
 179. B.R. James, R.J.P. Williams, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1998**, 3851-3857.
 180. R.P. Bonomo, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, R. Purello, E. Rizzarelli, G. Tabbi, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1998**, 3851-3857.
 181. R.P. Bonomo, E. Conte, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, R. Purello, E. Rizzarelli, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1996**, 3093-3099.
 182. J.M. Fernández-G., F.A. López-Durán, S. Hernández-Ortega, V. Góez-Vidalas, N. Marcias-Ruvalcaba, M. Aguilar-Matínez, *J. Mol. Struct.*, **2002**, 612, 69-79.
 183. K. Miyoshi, H. Tanaka, E. Kimura, S. Tsuboyama, S. Murata, H. Shimizu, K. Ishizu, *Inorg. Chim. Acta*, **1983**, 78, 23-30.
 184. P.V. Robandt, R.R. Schroeder, D.B. Rorabacher, *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 3957-3963.
 185. N.M. Villeneuve, R.R. Schroeder, L.A. Ochrymowycz, D.B. Rorabacher, *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 4475-4483.
 186. R.P. Bonomo, G. Di Natale, E. Rizzarelli, G. Tabbi, L.I. Vagliasindi, *Dalton Trans.*, **2009**, 2637-2646.
 187. Q.-X. Li, Q.-H. Luo, Y.-Z. Li, M.-C. Shen, *Dalton. Trans.*, **2004**, 2329-2335.
 188. G. Thomas, P.S. Zacharias, *Polyhedron*, **1984**, 3, 861-866.
 189. K. Takehara, Y. Ide, *Inorg. Chim. Acta*, **1991**, 186, 73-78.
 190. K. Takehara, Y. Ide, *Inorg. Chim. Acta*, **1991**, 183, 195-202.
 191. R.P. Bonomo, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, G. Tabbi, *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 4195-4202.
 192. C. Hureau, L. Charlet, P. Dorlet, F. Gonnet, L. Spadini, E. Anxolabéhère-Mallart, J.-J. Girerd, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2006**, 11, 735-744.
 193. P.T. Kissinger, W.R. Heineman, *J. Chem. Edu.*, **1983**, 60, 702-706.
 194. R.N. Patel, S. Kumar, K.B. Pandeya, *Spectrochim. Acta, Part A*, **2000**, 56, 2791-2797.
 195. R.N. Patel, S. Kumar, K.B. Pandeya, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 89, 61-68.
 196. M.G.B. Drew, C. Cairns, A. Lavery, S.M. Nelson, *J. Chem. Soc.: Chem. Commun.*, **1980**, 1122-1124.
 197. P.K. Coughlin, A.E. Martin, J.C. Dewan, E.I. Watanabe, J.E. Bulkowski, J.M. Lehn, S.J. Lippard, *Inorg. Chem.*, **1984**, 23, 1004-1009.
 198. P.K. Coughlin, S.J. Lippard, *Inorg. Chem.*, **1984**, 23, 1446-1451.
 199. K.G. Strothkamp, S.J. Lippard, *Acc. Chem. Res.*, **1982**, 15, 318-326.
 200. J.L. Pierre, P. Chautemps, S. Refaif, C. Beguin, A.E. Marzuoki, G. Serratrice, E. Saint-Aman, R. Rey, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 1965-1973.

201. H.L. Zhu, L.M. Zheng, D.G. Fu, X.Y. Huang, M.F. Wu, W.X. Tang, *J. Inorg. Biochem.*, **1998**, *70*, 211-218.
202. H. Ohtsu, Y. Shimazaki, A. Odani, O. Yamauchi, W. Mori, S. Itoh, S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 5733-5741.
203. G. Facchin, M.H. Torre, E. Kremer, O.E. Piro, E.E. Castellano, E.J. Baran, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, *89*, 174-180.
204. M. Casolaro, M. Chelli, M. Ginanneschi, F. Laschi, L. Messori, M. Muniz-Miranda, A.M. Papini, T. Kowalik-Jankowska, H. Kozlowski, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, *89*, 181-190.
205. L.L. Costanzo, G. DeGuidi, S. Giuffrida, E. Rizzarelli, G. Vecchio, *J. Inorg. Biochem.*, **1993**, *50*, 273-281.
206. K. Jitsukawa, M. Harata, H. Arai, H. Sakurai, H. Masuda, *Inorg. Chim. Acta*, **2001**, *324*, 108-116.
207. A. Jancsó, Z. Paksi, N. Jakab, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, T. Gajda, *Dalton Trans.*, **2005**, 3187-3194.
208. N.I. Jakab, A. Jancsó, T. Gajda, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, *102*, 1438-1444.
209. P. Stanczak, H. Kozlowski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2007**, *352*, 198-202.
210. K. Atkari, T. Kiss, R. Bertani, R.B. Martin, *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 7089-7094.
211. J. Casanova, G. Alzuet, J. Bo O. Carugo, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1996**, 2239-2244.
212. J. Casanova, G. Alzuet, S. Ferrer, J. Latorre, J.A. Ramirez, J. Borrás, *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, *304*, 170-177.
213. E. Bienvenue, S. Choua, M.A. Lobo-Recio, C. Marzin, P. Pacheco, P. Seta, G. Tarrago, *J. Inorg. Biochem.*, **1995**, *57*, 157-168.