



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

A humán ZnT3 fehérje lehetséges fémkötő helyeinek azonosítása

KÉSZÍTETTE:

Dancs Ágnes

Vegyész MSc szak, I. évfolyam

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Gajda Tamás egyetemi tanár

Árus Dávid PhD hallgató

Szeged

2012

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	3
2.	Irodalmi előzmények	4
2.1.	A cink-transzporterekről	4
2.2.	A humán ZnT3 feltételezett fémkötő helyei	5
2.3.	Hisztidintartalmú peptidek komplexei átmenetifém-ionokkal	7
2.4.	Ciklikus peptidek hatása a fémion-koordinációra	9
3.	Kísérleti rész	10
3.1.	Potenciometria.....	10
3.2.	UV-Vis spektrofotometria, CD spektroszkópia	11
3.3.	Mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia	13
3.4.	Elektronspin rezonancia (ESR) spektroszkópia	15
4.	Kísérleti eredmények és értékelésük	16
4.1.	A ligandumok (de)protonálódási folyamatai.....	16
4.2.	A ligandumok cink(II)komplexei.....	18
4.3.	A ligandumok nikkel(II)komplexei.....	25
4.4.	Az L ¹ ligandum réz(II)komplexei	33
5.	Összefoglalás	43
6.	Irodalomjegyzék	45
	Köszönetnyilvánítás	

1. Bevezetés

A modern bioszervetlen kémia egyre elterjedtebben használt módszere a biológiai rendszerek vizsgálatára, hogy a nagyméretű metalloproteinek és –enzimek fémkötő tulajdonságait első közelítésben kisebb oligopeptidek segítségével modellezi. Eszerint az adott metallofehérje feltételezett fémkötő centrumához rendelhető peptidszakaszt állítják elő, s az ezekkel a viszonylag kisméretű peptidekkel képződő fémkomplexek oldategyensúlyi – szerkezeti és kinetikai tulajdonságait tanulmányozzák. A megközelítés hatalmas előnye, hogy a biológiailag meghatározó fémkötő sajátságok egyszerűen vizsgálhatók és számszerűen jellemezhetők anélkül, hogy megteremtenénk a natív, sejtszintű környezetet. S bár ez egyúttal a módszer korlátaira is rámutat, mégis ez lehet az első lépés a biológiailag aktív metallofehérjék működési mechanizmusának megismerése felé.

Tudományos diákköri munkám során ezen módszert alkalmazva próbáltam meg összefoglalni egy az emlősök körében, így az emberben is fellelhető cink-transzporter fehérje (ZnT3) fémionkötő sajátságának jellemzőit. A humán ZnT3 cink-transzporter tanulmányozását az az újkeletű felfedezés teszi érdekessé, miszerint működésük kapcsolatban állhat az Alzheimer-kór kialakulásával. Az általunk vizsgálni kívánt kötőhely reprezentálására a munka során két modellpeptidet alkalmaztunk, amin keresztül tanulmányozható a fémkötő szegmens szerkezetének hatása a képződő komplexek stabilitására.

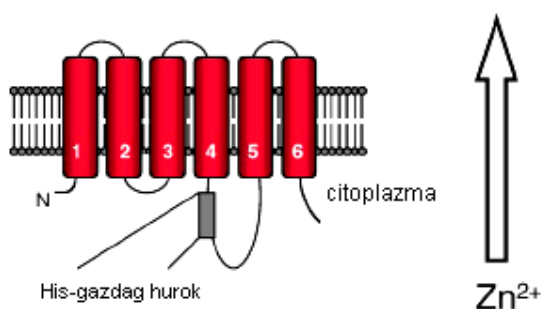
Kulcsszavak: cink-transzporter, fémkötő hely, peptidkomplexek, ciklikus peptid

2. Irodalmi előzmények

2.1. A cink-transzporterekről

A cink-transzporter fehérjék egy olyan transzmembrán fehérjecsalád tagjai, melynek feladata az eukarióta szervezetekben a Zn^{2+} ionok sejtmembránon való átjuttatása [1]. A cink(II)ionok, amellet hogy a genetikai információátadásban játszanak fontos szerepet, és számos hidrolitikus folyamat katalizálásában vesznek részt metalloenzimek részeként, az ideg-ingerületvezetésben is feladatot kapnak (neuromodulátor), ez magyarázza magas koncentrációjukat az idegsejtekben [2].

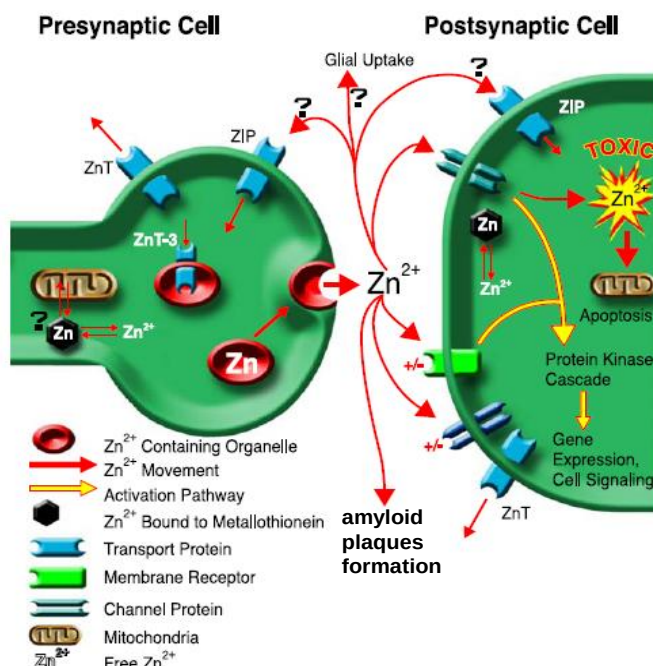
Az emlősökben található cink-transzporterek szerkezeti és funkcionális szempontból két nagyobb családba sorolhatók. A ZIP (Zrt- and Irt-like Proteins) fehérjék vagy a sejten kívülről, vagy a sejten belüli organelumokból juttatnak cinket a citoszolba [3]. Ezzel épp ellenkező irányú transzportot végeznek a ZnT (Zinc Transporter) fehérjék, a citoszolból a sejten kívüli térbe vagy az organelumokba szállítják a cinket. Mind a ZnT, mind a ZIP típusú cink-transzporterekre jellemző, hogy a citoplazma felőli oldalon két transzmembrán részt összekötő szakaszukban egy hisztidinben gazdag szekvenciát tartalmazó hurokkal rendelkeznek, melyhez az irodalom lehetséges fémkötő funkciót rendel [4]. Az ilyen módon felépülő ZnT fehérjék sematikus szerkezetét az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra: A ZnT fehérjék sematikus szerkezete és a cinkion áramlás iránya.

A humán ZnT3 cink-transzporter fehérje az agy preszinaptikus glutamáterg vezikuláinak membránjában található; működése során ezekben Zn^{2+} ionok felhalmozódnak fel, melyek adott körülmények között kijuthatnak a szinaptikus térbe [5]. A humán ZnT3 fehérjével kapcsolatos kutatások eredményei arra engednek következtetni, hogy ezeknek a fehérjéknek a működése kapcsolatban állhat az Alzheimer-kór kialakulásával. A kórra jellemző plakkok képződése a β -amiloid fehérje aggregációjának következménye, amit az egyik kurrens feltételezés szerint elősegít a fenti vezikulákból kiürülő és a szinaptikus térben átmenetileg

felhalmozódó cink(II)ionoknak a viszonylag magas koncentrációja [6]. Ez alapján a ZnT fehérjék működésével szoros összefüggésbe hozható a plakk-képződés (2. ábra).



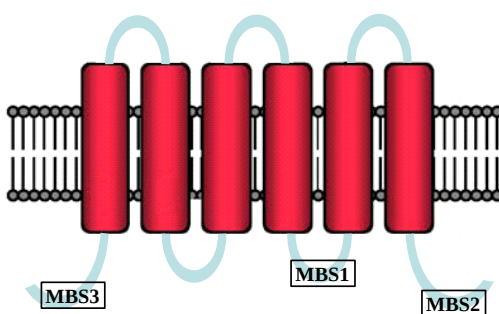
2. ábra: A cinkionok sorsa a szinaptikus térben.

Ezt az összefüggést kívánták vizsgálni azok a kutatók, akik Alzheimer-kórral mesterségesen megbetegített (transzgenikus) egerek kognitív képességeit vizsgálták a ZnT3 fehérjéjük „kiütése” után (ZnT3 fehérjével nem rendelkező, ún. „ZnT3 KO” egerek). A vizsgálatok eredményéből kiderült, hogy az ilyen egerek nem mutattak kognitív zavarokat, ellentétben a teljesen hasonló korú, szintén megbetegített, de működő ZnT3 fehérjével rendelkező egerekkel [7]. Ez azt sugallja, hogy amennyiben a ZnT3 cink-transzporter fehérjét szabályozni tudnánk, hatással lehetnénk az amiloid-plakkok képződésére, és talán az ezzel párhuzamosan fellépő emlékezési rendellenességekre.

2.2. A humán ZnT3 feltételezett fémkötő helyei

A ZnT cink-transzporter fehérjék háromdimenziós szerkezete és molekuláris szintű működési mechanizmusa nem ismert, így a humán ZnT3 fehérjéé sem. A közelmúltban az SZTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén kutatások kezdődtek a ZnT3 fehérje fémkötő sajátosságainak felderítésére. Az irodalmi források azt feltételezik, hogy a ZnT fehérjék elsődleges fémkötő helye a (már említett) IV. és V. transzmembrán szakaszok közötti hurok hisztidin-gazdag része (MBS1, 3. ábra) [4]. Ugyanakkor ennek ellentmond, hogy a fenti hurok szekvenciája, a bennük lévő hisztidinek száma az egyes szövetspecifikus ZnT-k esetén igen

változatos (pl. a humán ZnT3, ZnT1 és ZnT5 fehérjék megfelelő hurokjában 3, 9 illetve 15 His alegység található). Másfelől, a ZnT fehérjék számos egyéb jól megőrzött szekvenciát tartalmaznak, amelyek potenciálisan nagy stabilitással köthetnek meg fémionokat: az emberben, egérben és marhában található ZnT3 citoplazmatikus C-terminális része egy metalloproteináz-szerű HDXHX₈H (MBS2) szekvenciát, az N-terminális rész pedig, az ember és néhány emlősállat ZnT2 és ZnT3 fehérjéje esetén a –HHCH– (MBS3) motívumot tartalmazza [8].



3. ábra: A ZnT fehérjék feltételezett fémkötő helyei (MBS1, MBS2 és MBS3).

Kutatócsoportunk a fenti három szakasz fémkötő sajátosságainak tanulmányozását tűzte ki célul. Tudományos diákköri munkám során az MBS1 kötőhelyet modellező peptidek vizsgálatával ezen kutatásba kapcsolódtam be. A kötőhely tanulmányozása kapcsán vizsgáltuk a fent említett IV. és V. transzmembrán szakaszt összekötő hurok hisztidintartalmú szakaszát – a modell-ligandum egy 11 aminosavból álló, terminális végein védett peptid, szekvenciája: Ac-RHQAGPPHSHR-NH₂ (a ligandumot a dolgozat további részében **L¹**-ként jelölöm). Valamint méréseket végeztünk egy lényegesen nagyobb, a kötőhelyet tartalmazó hurok valószínűbb reprezentálására alkalmas ciklusba zárt peptiddel: ez egy harminc aminosavból álló ligandum (c(Ac-CKLHQAGPPHSHGSRGAHEYAPLEEGPEEK-NH₂), a továbbiakban **L²**), mely a két végén található cisztein aminosav oxidatív összekapcsolása (kovalens S-S diszulfid-híd) révén záródik ciklusba.

A humán ZnT3 fehérje másik két fémkötő tulajdonságú szekvenciáját már vizsgálta kutatócsoportunk a korábbiakban. Ennek kapcsán az MBS3 kötőhelyet modellező Ac-PFHHCHRD-NH₂ (**L³**) terminális végein védett oktapeptiddel történtek oldategyensúlyi és szerkezetvizsgálati mérések a Zn(II)- és Ni(II)-komplexek esetén. Az eredmények alapján ez a szekvencia egy kiemelkedően erős Zn²⁺-kötőhelyet képvisel a fehérjében. Semleges körüli pH-n, ligandumfelesleg jelenlétében az oldatban egy kiugró stabilitású, Zn**L³** összetételű komplex van jelen (logK = 8,50), amely esetén a koordinációban valószínűleg 3

imidazolnitrogén és a tiolátcsoport vesz részt. Magasabb pH-kon az eredmények egy ZnL^3_2 bisz-komplex megjelenésére utalnak, mely 8-9 közti pH-n mutat maximumot. Az $\text{L}^3\text{-Ni(II)}$ 1:1 arányú rendszere esetén a három imidazolnitrogén által koordinált NiHL^3 részecske deprotonálódása pH ~ 6 körül indul meg, miközben a tiolát belép a koordinációs szférába. A képződő $\{3\text{N}_{\text{im}}, \text{S}^-\}$ koordinációjú NiL^3 részecske $\log K = 6,57$ stabilitási állandóval jellemezhető. A további deprotonálódások során az amidnitrogének koordinálódásával egyidőben az imidazolnitrogének egymás után kiszorulnak a koordinációs szférából, míg a tiolátcsoport még a pH $\sim 9\text{-}10$ között domináns NiH_2L^3 részecskében is jelen van, s csak ezután szorul ki a komplexből. A NiL^3 komplexet a ZnL^3 részecskével összehasonlítva, stabilitási állandók közötti kb. 2 nagyságrendbeli különbség azt mutatja, hogy ezen szekvencia jelentős szelektivitást mutat a Zn^{2+} ionok megkötésében a Ni^{2+} ionokkal szemben.

A másik, metalloproteináz-szerű MBS2 kötőhelyre (–ATHELHLWALTLYHVA–) vonatkozóan egy nagyon hasonló, viszonylag szeparált hisztidin aminosavakat tartalmazó, a mátrix metalloproteináz 13 enzim fémkötő fragmensével azonos (Ac-KAHEFGHSLGLDHSK-NH₂, L^4) peptidre vonatkozó adatokból következtettünk. E peptidnek a Zn(II)- és Cu(II)-ionokkal való kölcsönhatását vizsgálták korábban a tanszék munkatársai. Cinkionok jelenlétében, semleges pH-n egy $\{3\text{N}_{\text{im}}\}$ koordinációjú, a szeparált His-alegységek miatt viszonylag kis stabilitású komplex képződik ($\text{Zn}^{2+} + \text{H}_2\text{L}^4 = \text{ZnH}_2\text{L}^4$, $\log K = 4,47$), ami magasabb pH-n (> 7) vegyes hidroxokomplexeiké alakul. A $\{3\text{N}_{\text{im}}\}$ koordinációjú CuH_2L^4 komplex ($\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{L}^4 = \text{CuH}_2\text{L}^4$, $\log K = 7,79$) pH 6-7 között képződik maximális mennyiségben, s a magasabb pH-kon megindul az amidnitrogének deprotonálódása. Ez utóbbi folyamatokban a három szeparált hisztidin egymástól független kötőhelyként viselkedik, így a fém-ligandum aránytól függően egy-, két- és hárommagvú réz(II)komplexek alakulnak ki.

Bár kísérleti munkával nem vettem részt az L^3 és L^4 peptidek vizsgálatában, az összehasonlítás végett ezen eredményekre az összefoglalásban hivatkozom, mivel a fehérje fémkötő mechanizmusának felderítéséhez ezen peptidek viselkedését együtt célszerű figyelembe venni.

2.3. Hisztidintartalmú peptidek komplexei átmenetifém-ionokkal

A hisztidinben gazdag peptidek fémkötő tulajdonságaival már számos kutatócsoport foglalkozott, többek között a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék kutatói is. A tanszék munkatársai vizsgáltak olyan, hisztidinben gazdag peptidek réz(II)-, cink(II)- és nikkel(II)komplexeit, melyek az élő szervezetekben található fehérjék (pl. a hisztidinben

gazdag glikoprotein, endosztatin [9]) és enzimek (pl. Cu/Zn- és Ni-szuperoxid-dizmutáz [10], mátrix metalloproteináz) aktív centrumainak részeként meghatározó szerepet játszhatnak ezen metalloproteinek és -enzimek működési mechanizmusában. A hisztidin oldallánci imidazolgyűrűjének számos kedvező sajátsága van, pl. a legtöbb átmeneti fémionnal stabilis koordinatív kötést alakít ki, így nagyszámú metalloenzim (fehérje) aktív centrumában megtalálható, mint fémkötő ligandum. A fent említett peptidek fémkötő sajátságainak vizsgálata arra utalt, hogy a ligandumban levő hisztidinek száma mellett azok egymáshoz viszonyított helyzete is meghatározó a koordinációs viszonyokat (geometria és stabilitás) illetően.

A His-tartalmú peptidek réz(II)ionokhoz való koordinációját nagymértékben befolyásolja a hisztidin alegység(ek) pozíciója a peptiden belül [11]. Amennyiben szabad N-terminális végen található a His, savas és semleges közegben hisztamin-típusú koordináció valósul meg, ahol a hisztidin imidazolnitrogénje és a terminális aminos csoport nitrogénje alakít ki egy hattagú kelátgyűrűt a fémion körül. Ez a kötődési mód termodinamikailag kedvezményezett, amit az is mutat, hogy a bisz-hisztamin típusú koordináció 3-4 pH egységgel eltolja az amidnitrogén koordinációjának bekövetkeztét [11]. A hisztidint tartalmazó, védett N-terminálissal rendelkező peptidek réz(II)-komplexei esetében hisztamin jellegű koordináció nem alakulhat ki. Ekkor az imidazol oldalláncok részvételével a legnagyobb stabilitású részecskék akkor képződnek, ha a ligandum szekvenciájában felváltva sorakoznak hisztidin aminosavak (HXH[YH]_n) [12]. Ha a hisztidin alegységek távolabb vannak egymástól, a komplexek szerkezete bonyolultabb, az egyéb aminosavaktól is függő kapcsolatban áll a peptid szekvenciájával. Minthogy ekkor a multiimidazol koordináció kisebb stabilitást eredményez, az amidnitrogének deprotonálódása és koordinálódása már alacsonyabb pH-n (pH ~ 5-6) is megtörténhet. Lúgos tartományban már általában több amidnitrogén is kapcsolódik a fémionhoz.

A hisztidintartalmú peptidek cink(II)komplexei esetén kiemelten jellemző, hogy a His aminosavak száma és sorrendje mellett sokszor az egyéb koordinálódni képes oldalláncok befolyásolják alapvetően a komplexek stabilitását és szerkezetét [11]. Ennek fő oka, hogy a cink(II)ion nem mutat kiemelkedő affinitást a deprotonált amidnitrogénekhez, így a koordináció az oldalláncok által meghatározott. A cink(II)-amid koordináció kialakulásához speciális szekvenciárész jelenléte szükséges (pl. N-terminális végen egy H₂N-XH- egység [13]). Láncközi hisztidint tartalmazó peptidek esetén (amennyiben nincs jelen elegendő számú His vagy egyéb extra-stabilitást eredményező koordináló csoport) a cinkkomplexek magasabb pH-kon jellemzően kicsapódnak kis oldhatóságú, általában polimerizálódott hidroxo-

vegyeskomplexek formájában [14]. Így sok esetben az ilyen rendszerek pH-függését csak ligandumfelesleg esetén lehetséges mérni. Viszont a vegyes-hidroxokomplexek oldékonyságát növelheti pozitív töltéssel bíró oldalláncok (Arg, Lys) beépítése a szekvenciába. A cink(II)komplexek stabilitását lényegesen megnövelő tényező lehet a cisztein aminosav jelenléte (tiolátkoordináció), de kismértékű stabilitásnövekedést eredményezhet a Met, Asp, és Glu oldalláncok koordinálódása is [11].

A His-tartalmú peptidek nikkel(II)komplexei savas és semleges közegben a cink(II)-, lúgos közegben a réz(II)komplexek viselkedéséhez hasonlítanak [11]. Az amidkoordináció magasabb pH-n általában megvalósul, még ha lassabban és lúgosabb körülmények között is, mint a réz(II)komplexek esetén. Savas körülmények között kedvező a hisztamin típusú koordináció (amennyiben van N-láncvégi His és szabad aminocsoport) [11], ilyen pH-tartományban általában paramágneses, oktaéderes geometriájú komplexek vannak jelen az oldatban. A pH növelésével, az amidnitrogének koordinációjával párhuzamosan geometriaváltás következik be, a paramágneses oktaéderes komplexek síknégyszetes geometriába rendeződnek át [11]. Az amidnitrogének deprotonálódása kooperatív módon (sok esetben majdhogynem egyszerre) zajlik le, amit a geometriaváltás segít elő. Ez a szerkezetváltozás jól követhető spektrofotometriásan, mert a Ni^{2+} síknégyszetes komplexei intenzív sárga színűek. A nikkel(II)komplexekre is elmondható, hogy a hisztidinek mellett jelenlevő cisztein koordinálódása nagyfokú stabilizáló tényező lehet, mivel a nikkel(II)ion, a réz(II)ionnal ellentétben nem lép redoxireakcióba a tiolátcsoporttal, hanem viszonylag erős kötődés jön létre, ami stabil komplexet eredményez [15].

2.4. Ciklikus peptidek hatása a fémion-koordinációra

A ZnT fehérjék elsődleges fémkötő helyeként feltételezett szakasza a már említett, MBS1-ként megjelölt hisztidingazdag szekvencia. Ez a szakasz egy citoplazmába lógó hurok, mely két transzmembrán szegmenst köt össze. Hogy felderítsük, a fragmens másodlagos szerkezete milyen hatással lehet a képződő fémkomplexek stabilitására, egy a humán ZnT3 MBS1 kötőhelyének megfelelő szekvenciájú, annak valószínűbb reprezentálására alkalmas ciklusba zárt peptiddel is vizsgáltuk a képződő fémkomplexeket, s az eredményt összehasonlítottuk a rövidebb, L^1 ligandum komplexeinek jellemzőivel.

Az irodalmi eredmények alapján az állapítható meg, hogy a His-tartalmú ciklopeptidek és a nekik megfelelő nyílt láncú peptidek komplexei közötti hasonlóság-különbségi viszony az aminosavak számával változik. Kis számú aminosav részvételekor a fémkötő sajátságok szignifikánsan különböznek a ciklikus és nyílt láncú peptideknél, míg nagyobb oligopeptidek

esetén a különbség már nem olyan számottevő. Egészen kisméretű, ciklikus dipeptidek koordinációja során például különösen stabil fémkomplexek keletkeznek, mivel a koordinálódó hattagú gyűrű jól meghatározott térszerkezete extra stabilitást biztosít [16]. A kisebb méretű ciklusok okozta szerkezeti rigiditás még a négytagú ciklusos aminosavak esetén is érződik [17], bár a nyílt láncú forma láncvégi csoportjainak esetleges koordinálódása szintén stabilitásnövelő tényező lehet. Ahogy nő a ciklust alkotó atomok száma, a háromdimenziós szerkezet egyre flexibilisebb, egyre kevésbé érződik a gyűrű merevebb szerkezetének hatása. Hexapeptideknél már 18 atomból áll a ciklus, s a fémionok koordinációja mindkét peptidformánál nagyon hasonló módon zajlik [18].

Mindkét általunk vizsgált ligandum tartalmazza a hisztidinek által meghatározott primer fémkötő szakaszt (-HQAGPPHS-), ám az aminosavak száma, s ebből fakadóan a ligandumok minősége merőben különbözik egymástól. Emiatt az L^1 ligandumnál tapasztaltak részben sem vihetők át a ciklopeptid (L^2) - fémion rendszerekre; csak az ezen mérésekből nyert információk L^1 eredményeivel történő összevetése után vonhatunk le konklúziót az MBS1 fragmens fémionkötő potenciáját illetően.

3. Kísérleti rész

3.1. Potenciometria

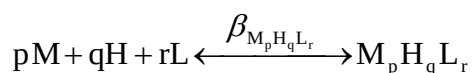
Az oldatbeli egyensúlyi vizsgálatokhoz, a ligandumok (de)protonálódási és komplexképződési állandóinak meghatározásához potenciometriás módszert alkalmaztunk. A módszer alkalmazhatóságának elvi háttere az, hogy a vizsgált folyamat valamilyen módon az oldatbeli hidrogénion-koncentráció megváltozását okozza, mely az üvegelektrod által érzékelt potenciálváltozást eredményez. Az általunk tanulmányozott rendszerek mindegyike megfelel ennek a követelménynek, hiszen a proton és a fémion verseng egymással a funkciós csoportokért.

A pH-metriás titrálásokat vizes közegben, állandó hőmérsékleten (25°C) és állandó ionerősség (0,1 M) mellett végeztük. Az ionerősség beállítására minden esetben analitikai tisztaságú NaCl-ot (Reanal) használtunk. A CO₂ távoltartására oldatainkba argon inert gázt buborékolattunk. A mérőoldat NaOH (Fluka) ~ 0,1 M-os vizes oldata volt, melyet ioncserélt, szűrt és kiforralt vízből készítettünk. A mérőoldat koncentrációját pontos beméréssel készített kálium-hidrogénftalát (Fluka) oldat titrálásával határoztuk meg. A fémionok törzsoldatainak elkészítéséhez Cu(ClO₄)₂-ot, Zn(ClO₄)₂-ot és NiCl₂-ot (mindhárom Aldrich) használtunk fel, majd az oldatok koncentrációit komplexometriás titrálással határoztuk meg. A titrálásokat

IBM-kompatibilis PC által vezérelt Dosimat 665 típusú Metrohm automata bürettából és Orion 710A precíziós pH-mérőből álló berendezéssel végeztük. Az Orion 8103BN típusú szemimikro kombinált üvegelektrod kalibrálásához egy erős savat (HCl) titráltunk. Az így nyert $E_{\text{rel.mV}}$ vs. V_{mL} adatsorok értékelése a módosított Nernst-egyenlet alapján történt [19]:

$$E = E_0 + K \cdot \log[H^+] + J_H \cdot [H^+] + \frac{J_{OH} \cdot K_w}{[H^+]}$$

melyben az ismert paraméterek mellett J_H és J_{OH} az üvegelektrod savas illetve lúgos hibájának, valamint a folyadék–folyadék határfelületi potenciálból adódó hibáknak a korrekciójára szolgáló illesztési paraméterek, $K_w = 10^{-13,75} \text{ M}^2$ pedig a víz autoprotolízis-állandója [20]. A paraméterek kiszámítása a nemlineáris legkisebb négyzetek módszere szerint történt. A rendszerekben képződő részecskék az alábbi általános egyensúlyi folyamattal ill. képződési állandóval jellemezhetők,



$$\beta_{M_p H_q L_r} = \frac{[M_p H_q L_r]}{[M]^p [H]^q [L]^r}$$

ahol M a fémiont, L a nem protonált ligandummolekulát jelöli (a dolgozatban az egyszerűség kedvéért a komplexek töltésétől eltekintettünk, de ezek könnyen számolhatóak, ha figyelembe vesszük, hogy L^1 és L^2 esetében a teljesen protonált ligandum LH_3^{3+} ill. LH_{11}^{5+} formájú). A protonálódási és komplexképződési állandók ($\beta_{M_p H_q L_r} = \beta_{pqr}$) meghatározását a PSEQUAD nevű számítógépes programmal végeztük [21]. A protonálódási állandók meghatározása 3-4, a komplexképződési állandók meghatározása 6-8 független titrálással történt, az egyes adatsorok egyenként 70-90 adatpontot tartalmaztak. A fém-ligandum arányt 1:2 és 2:1 között, a fémion koncentrációt $7,0 \times 10^{-4} - 2,1 \times 10^{-3} \text{ M}$ tartományban változtattuk.

3.2. UV-Vis spektrofotometria, CD spektroszkópia

A vizes oldatban képződő komplexek koordinálódó donorcsoportjainak azonosítása végett spektroszkópiás méréseket végeztünk az L^1 jelzésű ligandum esetében. Erre az ad lehetőséget, hogy az UV- és látható tartományban fényelnyelő tulajdonságú molekularészek koordinációs viszonyainak megváltozása az elnyelési spektrum megváltozásával járhat: bizonyos csoportok koordinációjakor új elnyelési sáv jelenik meg, valamint a koordinálódó ligandumok/donorcsoportok cseréjekor a már meglévő elnyelési sávok maximumhelyei eltolódhatnak a kisebb hullámhosszak irányába. Ezen jelenségek alapján következtethetünk a

koordinálódó donorcsoportok minőségére a különböző pH-kon felvett abszorpciós spektrumok tanulmányozásával. A CD (cirkuláris dikroizmus) spektroszkópia alapjai azon a tapasztalaton nyugszanak, hogy a síkban polarizált fény egy jobbra és egy balra forgató cirkulárisan poláros komponensre bontható fel. Az optikailag aktív anyagok oldata eltérő mértékben nyeli el ezt a két cirkulárisan poláros komponens, ezt a jelenséget nevezik cirkuláris dikroizmusnak. A jelenséget felhasználó spektroszkópai módszer lényege, hogy a balra és a jobbra cirkulárisan poláros fény abszorpciós (extinkciós) koefficienseinek különbségét ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{bal}} - \varepsilon_{\text{jobb}}$) a hullámhossz függvényében ábrázolva az optikailag aktív mintára jellemző CD spektrumot kapjuk.

Mind az UV-Vis, mind a CD spektroszkópia alkalmas a minták mennyiségi jellemzésére: az adatsorok értékelésének alapjául a fényelnyelést produkáló molekulafajta koncentrációja (c) és az abszorbancia (A) közötti összefüggést leíró Lambert-Beer-törvény szolgál.

$$A = \lg(I_0/I) = \varepsilon \times c \times l$$

ahol I_0 a beeső fény intenzitása, I az oldatmintából kilépő (transzmittált) fény intenzitása, ε az egyes molekulafajták moláris abszorbanciája, l a küvettahossz (cm-ben megadva). Az UV-tartományban elsősorban a ligandumok kromofor csoportjai mutatnak elnyelést, illetve ennél kisebb intenzitással az ún. töltésátviteli vagy „charge transfer” (CT) sávok is itt jelennek meg, melyek a fémion és a ligandum közti elektronátmenetekre jellemzőek. A látható fény hullámhossz-tartományában rendszerint a fémionok jóval kisebb intenzitású $d-d$ átmeneti sávjai találhatók.

Az átmenetifém-komplexek kiralitása többféle aszimmetriaforrásból adódhat (centrális, helikális, konformációs kiralitás). Mindazonáltal, az általunk vizsgált Cu(II)- és Ni(II)-komplexek vizes oldatainak esetén a fémionhoz koordinálódó ligandumban található kiralitáscentrum hatásának van döntő szerepe. A ligandum kiralitáscentrumai egyrészt a kötéseken keresztül hatnak a fémionra, másrészt a kiralitáscentrum következtében fellépő aszimmetria miatt a kelátgyűrűk valamely konformációja kitüntetett stabilitású lehet. Ennek hiányában ugyanis a konformáció szempontjából „racém elegy” alakulna ki, aminek eredő elnyelése nulla lenne. Az tehát, hogy a $d-d$ átmenetek hullámhossz-tartományában optikai aktivitást tapasztalhatunk, önmagában is egy királis ligandum koordinációját bizonyítja. A spektrum alakja, előjele és intenzitása pedig a fémion körül kialakult térbeli szerkezetre jellemző.

A CD méréseket a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban végeztük egy Jasco J-815 spektropolariméteren 300-800 nm hullámhossztartományban. Különböző nikkel(II) és réz(II)

- ligandum (1:2, 1:1) arányokat vizsgáltunk vizes oldataikban. A CD spektrumokat 3,4-11,3 pH tartományon belül 14-18 különböző pH-n vettük fel. A ligandum koncentrációja a mérések során $6,8 \times 10^{-4}$ M körüli volt, míg a fémioné $3,31 \times 10^{-4}$ – $1,32 \times 10^{-3}$ M tartományokban változott. Az UV-Vis spektrumokat egy Unicam HELIOS α típusú, kétutas spektrofotométeren vettük fel, 1 cm-es hosszúságú teflondugós kvarcküvetékben. A spektrofotometriás titrálásaink pontonkénti mérések sorozatából állnak, melynek során savas pH-któl kezdve, $\sim 0,3$ pH egységenként, kellő mennyiségű oldatrészletet a mérőcellába kimérve vettük fel az oldatok abszorpciós spektrumát a 250-800 nm-es hullámhossztartományban. A mérések során a ligandum-fémion arány 2:1 – 1:1 között, a fémion koncentrációja $7,00 \times 10^{-4}$ – $2,81 \times 10^{-3}$ M koncentrációtartományban változott. A spektrofotometriás adatsorok kiértékelése a már említett PSEQUAD nevű számítógépes programmal történt [21].

3.3. Mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia

Az egyik leghatékonyabb szerkezetvizsgáló és kvalitatív analitikai módszer a mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia. A módszer olyan atommagot tartalmazó elemek, ill. vegyületek vizsgálatára alkalmas, melyeknek magspinje zérustól eltérő ($I \neq 0$). Az NMR spektroszkópia alapja, hogy – hasonlóan az elektronokhoz – az atommagoknak is van impulzusmomentuma, s így mágneses momentuma. Ennek kvantáltsága azt jelenti, hogy mágneses tér hatására a külső térrel olyan szöget zár be, hogy vetülete meghatározott nagyságú, $1/2\gamma\hbar$ egész számú többszöröse: $m\gamma\hbar$, ahol $\hbar = h/2\pi$; az ún. giromágneses tényező (γ) az egyes atommagokra jellemző állandó; m futó szám, melynek maximuma I , a (mag)spin kvantumszám és nagysága az $I, I-1, \dots, -I$, összesen $2I+1$ értéket veheti fel. A rezonancia során a magmomentum-vektor az egyik lehetséges beállásból átbillen a másikba, vagyis a mag mágneses momentumának a külső mágneses térhez viszonyított iránya változik meg. Az ehhez szükséges energia a rádiófrekvenciás sugárzás elnyeléséből származik és a megfelelő frekvenciát, az egyes magokra jellemző Larmor-frekvenciát, amely a külső térrel arányos, szelektíven nyelik el az atommagok. Azt a jelenséget, hogy a kémiai környezet, ha csak igen kis mértékben is (a külső mágneses tér milliomod részével, ppm-ben mérhetően), de befolyásolja a rezonanciafrekvenciát, kémiai eltolódásnak (δ) nevezzük. A jelek intenzitása arányos az érték felelős magok számával, vagyis az NMR spektrumból megkapható a különböző kémiai környezetben előforduló azonos fajta magok relatív száma. A spinek „érzik” szomszédaik kvantumállapotát, vagyis a szomszéd alap- vagy gerjesztett állapota

eltérően hat a partnere körüli lokális mágneses tér nagyságára, s ezzel a rezonanciafrekvenciára. Az olyan spinek, melyeket csak néhány kötés választ el, egymást kölcsönösen ún. multiplettekre (egymáshoz közeli vonalakra) hasíthatják fel. Az egyszerűbb esetekben ezen vonalak Hz-ben kifejezett távolsága adja meg az ún. csatolási állandót (J).

Az NMR mérések esetében lehetőség van arra, hogy a különböző csoportok rezonanciajelei között mágnesezettség transzfert hozzunk létre, és a kapott spektrumot két tengelyen ábrázoljuk (kétdimenziós NMR spektroszkópia). A kétdimenziós NMR spektroszkópiának többféle technikai kivitelezése van: a COSY (korrelációs spektroszkópia) homonukleáris szomszédos magok, a TOCSY az egy spinrendszerhez tartozó homonukleáris magok kölcsönhatását érzékeli kötéson keresztül (skaláris) csatolás révén. A NOESY (mag Overhauser hatás spektroszkópia) esetében a csatolás nem kötéson keresztül, hanem téren keresztül jön létre, a ROESY pedig a NOESY forgó koordináta-rendszerű változata.

Az oktaéderes nikkel(II)komplexeknél, valamint a réz(II)komplexeik esetében a fémionok paramágneses tulajdonsága miatt az NMR spektroszkópia korlátozottan alkalmazható. Ebből adódóan méréseink során a cink(II)ion komplexeit, valamint a síknégyszetes nikkel(II)komplexeiket vizsgáltuk, melyek diamágneses sajátosságúak. Ezen komplexek egyes atomcsoportjaira (az általunk is alkalmazott ^1H NMR spektroszkópia esetén a hidrogént tartalmazó csoportokra) jellemző jelek kiszélesedéséből, ezek kémiai eltolódás értékéből és annak megváltozásából, valamint a jelek felhasadásából következtethetünk a ligandumok különböző csoportjainak protonáltságára, illetve fémionhoz való koordinálódására.

Az NMR spektrumokat Szegeden egy Bruker Avance DRX 500 spektrométeren vettük fel (működési frekvencia: 500,13 MHz). A minták készítéséhez oldószerként 10% D_2O -t (Aldrich) tartalmazó desztillált vizet használtunk, mert ilyen mennyiségű D_2O jelenléte még nem befolyásolja számottevően a tisztán vizes oldatban uralkodó egyensúlyi viszonyokat. Az oldószerben jelenlevő víz protonjához tartozó jelintenzitás elnyomására a Watergate ill. Presat pulzusprogramokat alkalmaztuk. Utóbbi permanens módon gerjeszti a víz protonjait, és így ezek a mérés ideje alatt nem relaxálódhatnak, vagyis a H_2O jel intenzitása jelentősen lecsökken. A kémiai eltolódás értékeket dioxán (Reanal) belső referens alkalmazásával Me_4Si -ra vonatkoztatva adtuk meg ($\delta_{\text{dioxán}} = 3,700 \text{ ppm } ^1\text{H NMR}$). Méréseinket a fémion-ligandum arány változtatásával végeztük: az alkalmazott fémion-koncentráció $0 - 4,3 \times 10^{-3} \text{ M}$ tartományban változott, míg a ligandum oldatok kis mértékben hígultak $5,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ értékről $4,2 \times 10^{-3} \text{ M}$ -ra.

3.4. Elektronspin-rezonancia (ESR) spektroszkópia

Az L^1 jelzésű peptid réz(II)ionokkal való kölcsönhatását ESR módszerrel is követtük. Az elektronspin-rezonancia spektroszkópia (ESR) a párosítatlan elektront tartalmazó fémkomplexek szerkezeti jellemzésére használt módszer, így a réz(II)komplexek vizsgálatára kiválóan alkalmas. A módszer alapja a Zeemann-effektus, mely szerint külső mágneses tér hatására a párosítatlan elektron energiaszintjének degenerációja megszűnik. A felhasadt energiaszintek között mikrohullámú sugárzás hatására átmenet jöhet létre.

Az ESR-aktív vegyületekben az alkalmazott mágneses tér mellett további – nullától eltérő magspinű mag(ok), vagy esetleg más párosítatlan elektron(ok) által indukált – elemi terek is hatással lehetnek az elektronnívók felhasadására, azaz módosíthatják a vonalak helyzetét (g), számát, alakját, illetve intenzitását. Az általunk tanulmányozott rendszerben az alábbi kölcsönhatásokkal kell számolnunk:

(a) Ha a párosítatlan elektron nem-zéró spinű mag ($I \neq 0$) erőterében mozog, akkor a jel $2I+1$ darab komponensre hasad fel. Ez a kölcsönhatás a hiperfinom csatolási állandóval (A) jellemezhető. Többmagvú komplexek esetén a jel elvileg $2nI+1$ vonalra hasadhat fel (ahol n a magok száma), azonban ezt az elektron-elektron kölcsönhatás elfedheti.

(b) A ligandum nem-zéró spinű magjai a spektrum további felhasadását eredményezhetik. Ezt az előbbinél gyengébb kölcsönhatást az okozza, hogy az elektron kismértékben ezen magok mágneses terét is érzékeli, így több mag hatása esetén $2nI+1$ illetve különböző magok esetén $(2n_1I_1+1) \times (2n_2I_2+1)$ további vonal jelenik meg a spektrumban. A kölcsönhatásokat a szuperhiperfinom csatolási állandó jellemzi (A).

(c) Kétmagvú fémkomplexekben a centrumok közelsége elektronspin kicserélődést (antiferromágneses kölcsönhatást) eredményezhet a fémionok között. Ez a hatás erősen függ a fémionok egymástól való távolságától, s a kölcsönhatás jelentős sávkiszélesedést okozhat vagy akár az ESR-jel eltűnését is eredményezheti.

Az ESR spektrumokat Budapesten (KKK), Dr. Nagy Nóra segítségével egy BRUKER EleXsys E500 típusú spektrométeren vettük fel, 100 Hz térmodulációval, 298 és 77 K hőmérsékleten. Az Ac-RHQAGPPHSHR-NH₂ – Cu^{II} rendszer 1:1 és 1:2 arányú komplexeit vizsgáltuk. A méréseknél alkalmazott rézion-koncentráció $1,30\text{--}2,1 \times 10^{-3}$ M között volt. A spektrumokat pH 3 és pH 11 között vettük fel $\sim 0,4$ egységenként. A szobahőmérsékleten történő méréseket egy 8 cm³ térfogatú átfolyós küvettában vizes közegben, állandó inert nitrogén gáz buborékoltatása közben, állandó ionerősség (0,1 M) mellett végeztük. Az

ionerősség beállítására minden esetben analitikai tisztaságú NaCl-ot (Reanal) használtunk. A 298 K-en rögzített kislebontású izotróp spektrumokat csak annak érdekében elemeztük, hogy nyomon követhessük a pH függvényében eltérő mértékben képződő ESR-aktív részecskék koncentrációjának változását. Az anizotróp spektrumok felvétele előtt a fagyasztott mintákhoz a jég szerkezetének megtörése céljából 30% metanolt adtunk. Az ESR spektrumok kiértékelését Dr. Nagy Nóra, a Központi Kémiai Kutató Intézet munkatársa végezte.

4. Kísérleti eredmények és értékelésük

4.1. A ligandumok (de)protonálódási folyamatai

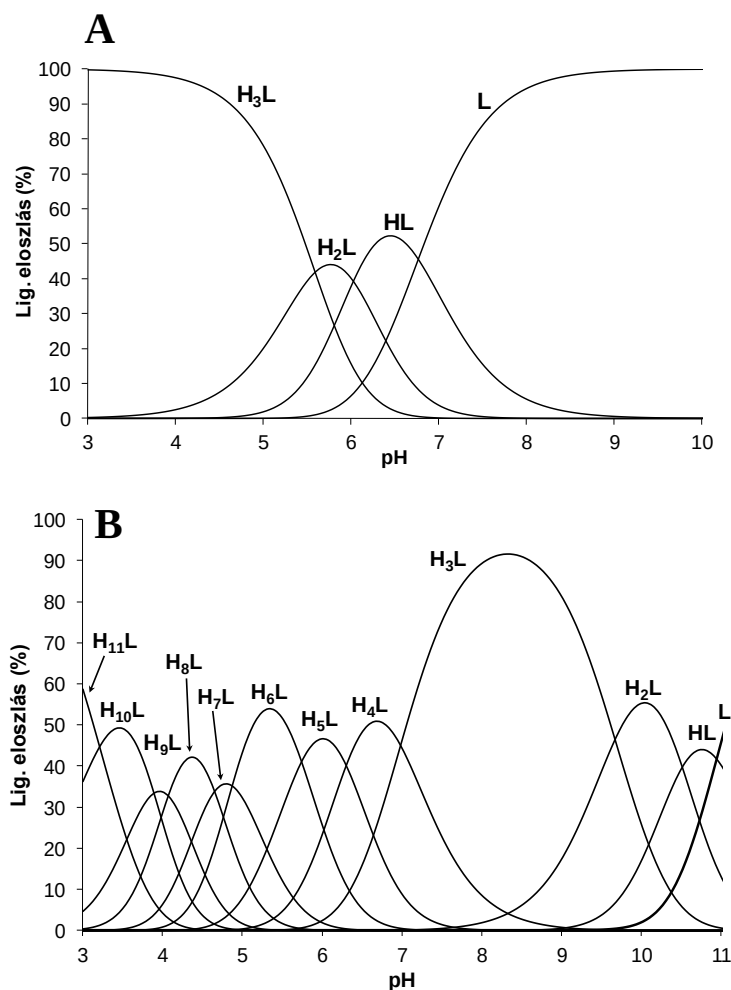
Az Ac-RHQAGPPHSR-NH₂ (**L**¹) ligandum a vizsgált pH-tartományban (pH ~ 3 és 11,5 között) három (de)protonálódási folyamaton megy keresztül, amelyekben a három hisztidin aminosav imidazol oldalláncai vesznek fel ill. adnak le protont. Mivel a hasonló donorcsoportok esetében ezek a folyamatok erősen átfednek, ezért valójában a mért értékek makroállandók, a tényleges folyamatokat tükröző ún. mikro-deprotonálódási állandókat kizárólag pH-potenciometria segítségével nem tudjuk megadni - viszont az imidazolgyűrűk azonos környezetét feltételezve becsülhető, mint a makroszkopikus állandók átlaga ($pK_{\text{micro}} \sim 6,13$) [22]. Az 1. táblázatban feltüntetett értékek jó egyezést mutatnak más, hasonlóan 3, viszonylag szeparált hisztidin-aminosavat tartalmazó peptid esetén mért értékekkel [23-25]. Az arginin oldallánci guanidínium-csoportja nagyon erős bázisként viselkedik ($pK \sim 12,5$), ezért a vizsgált pH-tartományban nem deprotonálódik.

1. táblázat: A ligandumok protonálódási folyamataira vonatkozó képződési állandók, valamint az utolsó tizedesjegyre vonatkozó standard deviációk.

Ac-RHQAGPPHSHR-NH ₂ (L ¹)			c(Ac-CKLHQAGPPHSHGSR-GAEYAPLEEGPEEK-C-NH ₂) (L ²)		
H _q L _r	log β	pK	H _q L _r	log β	pK
H ₃ L	18,38(1)	5,58	H ₁₁ L	70,83(7)	3,21
H ₂ L	12,80(1)	6,04	H ₁₀ L	67,62(3)	3,89
HL	6,76(1)	6,76	H ₉ L	63,73(5)	4,07
			H ₈ L	59,66(4)	4,65
			H ₇ L	55,01(3)	4,87
			H ₆ L	50,14(3)	5,74
			H ₅ L	44,40(3)	6,30
			H ₄ L	38,10(3)	6,98
			H ₃ L	31,12(2)	9,67
			H ₂ L	21,45(2)	10,51
			HL	10,94(3)	10,94

A ciklikus c(Ac-CKLHQAGPPHSHGSRGAEYAPLEEGPEEK-C-NH₂) (**L**²) ligandum lényegesen hosszabb, s változatosabb minőségben tartalmaz (de)protonálódni képes aminosav oldalláncokat. Az első öt részecske (H₁₁L-H₇L) pK-ja az öt glutaminsav deprotonálódásához rendelhető; egyik érték sem haladja meg a pK ~ 5-t. A H₆L, H₅L és H₄L összetételű részecskék protonvesztési folyamataiban (5,74, 6,30 és 6,98-as pK értékkel) a hisztidinek érintettek. Érdekes, hogy a ciklikus peptid pK_{His} értékei valamivel nagyobbak az **L**¹ peptidnél mértékhez képest, ami erősebb hidrogénhidas kölcsönhatásra utal. A H₃L protonvesztése a tirozinhoz rendelhető (pK = 9,67), a H₂L és HL deprotonálódása során pedig a két lizin aminosav adja le oldallánci protonját.

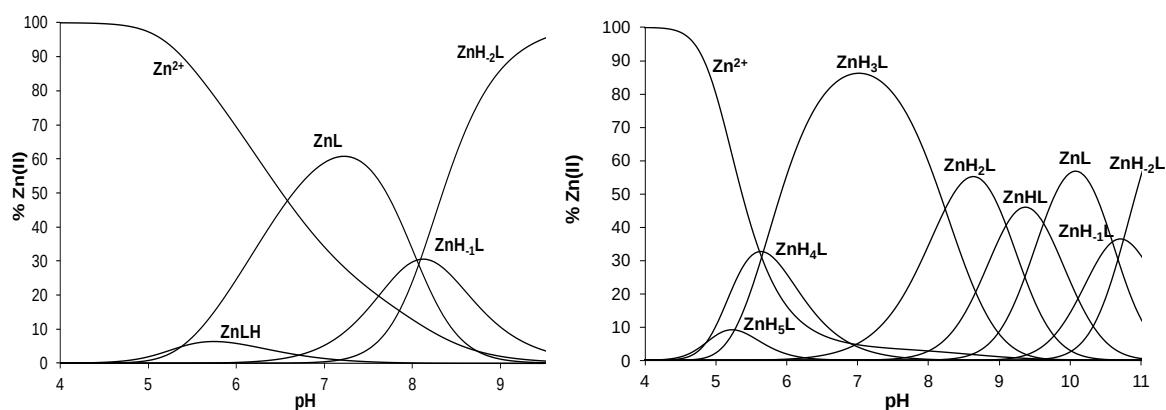
A különböző protonáltsági állapotú részecskék pH-függő eloszlásgörbéit a 4. A-B. ábra mutatja be.



4. A-B. ábra: Az L^1 (A) és L^2 (B) ligandumok eloszlása a pH függvényében ($C_{\text{lig}} = 1,1 \times 10^{-3}$ M, $I = 0,1$ M, $T = 25^\circ\text{C}$).

4.2. A ligandumok cink(II)komplexei

A ligandumok cink(II)komplexeit pH-potenciometriás és NMR spektroszkópiás mérésekkel vizsgáltuk. Az $L^1:Zn^{2+} = 1:1$ arányú rendszer esetében a potenciometriás adatok értékelése pH $\sim 9,3$ -ig történt. A ligandumfelesleg mellett mért rendszerek kiértékelése során nem adódott különbség az ekvimoláris oldatok mérési eredményeihez képest, így biszkomplexek képződését nem tudtuk kimutatni. Az L^1 - és L^2 -cink(II) 1:1 arányú rendszerekben mért eloszlásgörbék az 5. ábra, a képződő komplexek stabilitási és deprotonálódási állandóit a 2. táblázat szemlélteti.



5. ábra: Az L^1 - és L^2 -Zn(II) 1:1 arányú rendszerében számolt eloszlásgörbék (c_{lig} és $c_{\text{Zn(II)}} = 1 \times 10^{-3}$ M, $I = 0,1$ M, $T = 25$ °C).

2. táblázat: A vizsgált cink(II)komplexek képződési és (de)protonálódási állandói, log K származtatott állandók és az utolsó tizedesjegyre vonatkozó standard deviációk.

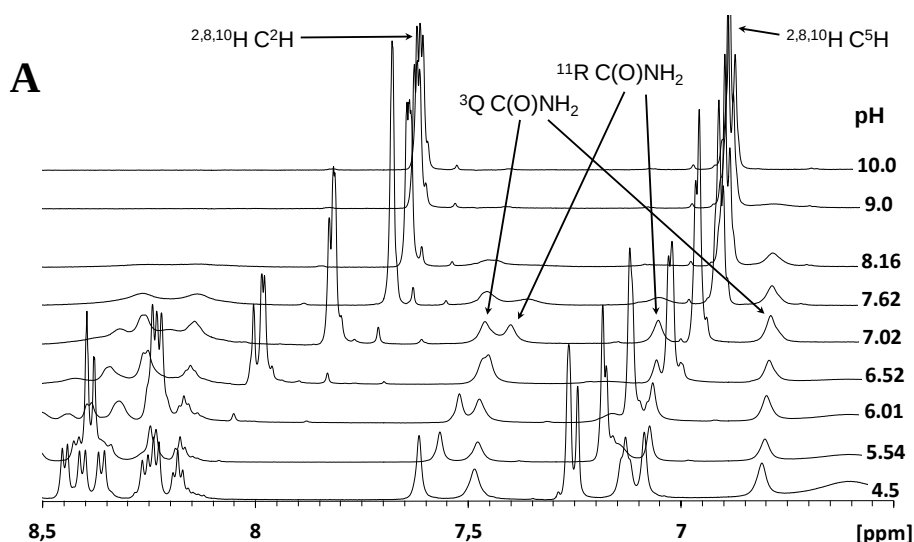
L^1			L^2		
$Zn_pH_qL_r$	$\log \beta_{pqr}$	pK_{pqr}	$Zn_pH_qL_r$	$\log \beta_{pqr}$	pK_{pqr}
ZnHL	9,85(9)	5,37	ZnH ₅ L	47,5(1)	4,8
ZnL	4,48(3)	8,05	ZnH ₄ L	42,72(4)	5,67
ZnH ₁ L	-3,57(4)	8,03	ZnH ₃ L	37,05(3)	8,24
ZnH ₂ L	-11,66(4)		ZnH ₂ L	28,81(5)	9,10
			ZnHL	19,71(5)	9,63
			ZnL	10,08(5)	10,60
			ZnH ₁ L	-0,52(6)	10,76
			ZnH ₂ L	-11,28(4)	
$\log K_{ZnHL}$	3,09		$\log K_{ZnH_3L}$	5,93	
$\log K_{ZnL}$	4,48		Mérési pontok	314	
Mérési pontok	684		Illesztési par. (cm ³)	0,0026	
Illesztési par. (cm ³)	0,0045				

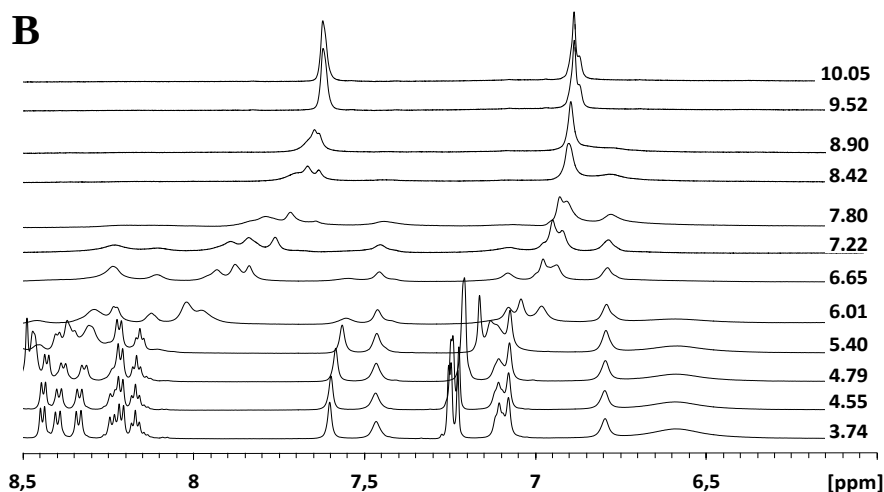
Az L^1 ligandum esetén az első kimutatható részecske a savas tartományban képződő $ZnHL^1$ komplex. Kis mennyiségben jelenik meg pH ~ 5 -7 között, képződésével csaknem teljesen átfed a pH 6 és 8 között domináns ZnL^1 kialakulása. Ezen két komplex esetében 2, illetve 3 imidazolnitrogén koordinációja feltételezhető. A tanszéken korábban vizsgált, a bevezetőben említett Ac-KAHEFGHSLGLDHSK-NH₂ peptid ezen koordinációkhoz tartozó komplexei esetén számított log K értékek ($\log K_{ZnH_3L} = 3,65$, $\log K_{ZnH_2L} = 4,47$) egyezése,

valamint a cink(II)ion jelenlétében felvett NMR spektrumok is egyértelműen imidazolnitrogének koordinációját mutatják (lásd később, 6. A-B. ábra).

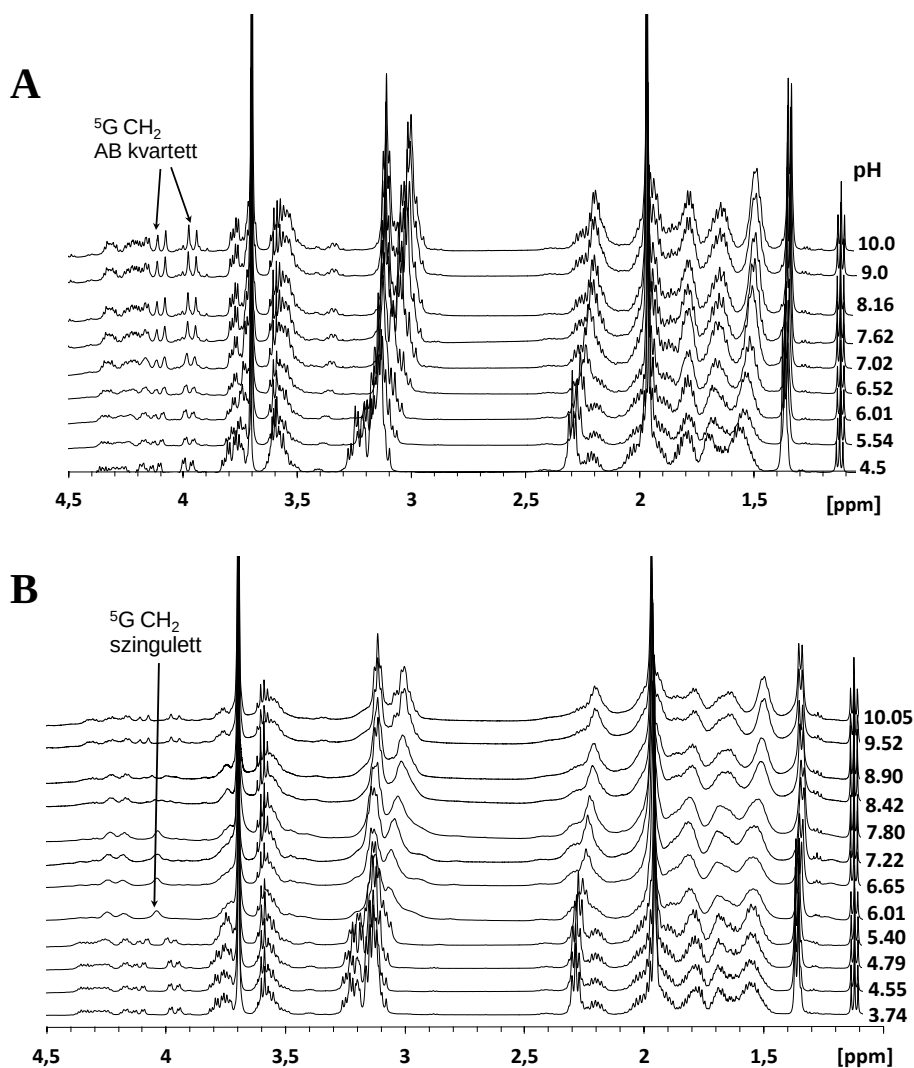
Az L^2 - Zn^{2+} rendszerben is hasonló pH-n indul meg a komplexképződés. Nem egészen pH 6 körül kezd dominánsá válni a $\{3N_{im}\}$ kötismódú (lásd később) ZnH_3L^2 komplex, mely két átfedő deprotonálódási lépésben keletkezik a valószínűleg $\{N_{im}\}$ és $\{2N_{im}\}$ koordinációjú ZnH_5L^2 és ZnH_4L^2 komplexekből. A fiziológiás pH-tartományban uralkodó ZnH_3L^2 képződésére felírható egyensúlyi állandó ($Zn^{2+} + H_3L^2 = ZnH_3L^2$, $\log K = 5,93$) körülbelül másfél nagyságrendnyi stabilitásnövekedést jelez az L^1 ligandum megfelelő ZnL^1 komplexéhez képest (bár ez szignifikáns növekedés, mindkettő alulmarad az MBS3 kötőhely $\{3N_{im}, S^-\}$ koordinációjú ZnL^3 részecskéjéhez viszonyítva ($\log K_{ZnL^1} < \log K_{ZnH_3L^2} < \log K_{ZnL^3}$). Ez a stabilitásnövekedés vagy a gyűrű miatt kialakuló, valamilyen módon preorganizált szerkezethez, vagy további donorcsoportok (amid- vagy karboxiláttoxigén) koordinációjához rendelhető. A semleges pH-n domináns ZnL^1 és ZnH_3L^2 komplexek kötismódjának felderítéséhez NMR vizsgálatokkal gyűjtöttünk további információt.

A vizsgálatok során az L^1 ligandum spektrumának cink(II)ionok távol- és jelenlétében mérhető pH-függését, valamint mindkét ligandum spektrumának a cink(II)ionok mennyiségétől való függését követtük. A cink(II)-függésre vonatkozó méréseket L^1 esetében pH $\sim 6,8$, L^2 -nél pedig pH $\sim 7,0$ értéknél végeztük, ahol a ZnL^1 és ZnH_3L^2 komplexek domináns mennyiségben találhatóak. A kapott spektrumsorozatokat a 6. A-B, 7. A-B, 8. A-B., valamint a 9. és 10. ábrákon láthatók.





6. A-B ábra: Az L^1 ligandum ^1H NMR spektrumának pH-függése cink(II)ion nélkül (A) és annak jelenlétében (B), a $\delta = 6,3\text{-}8,6$ ppm tartományban.

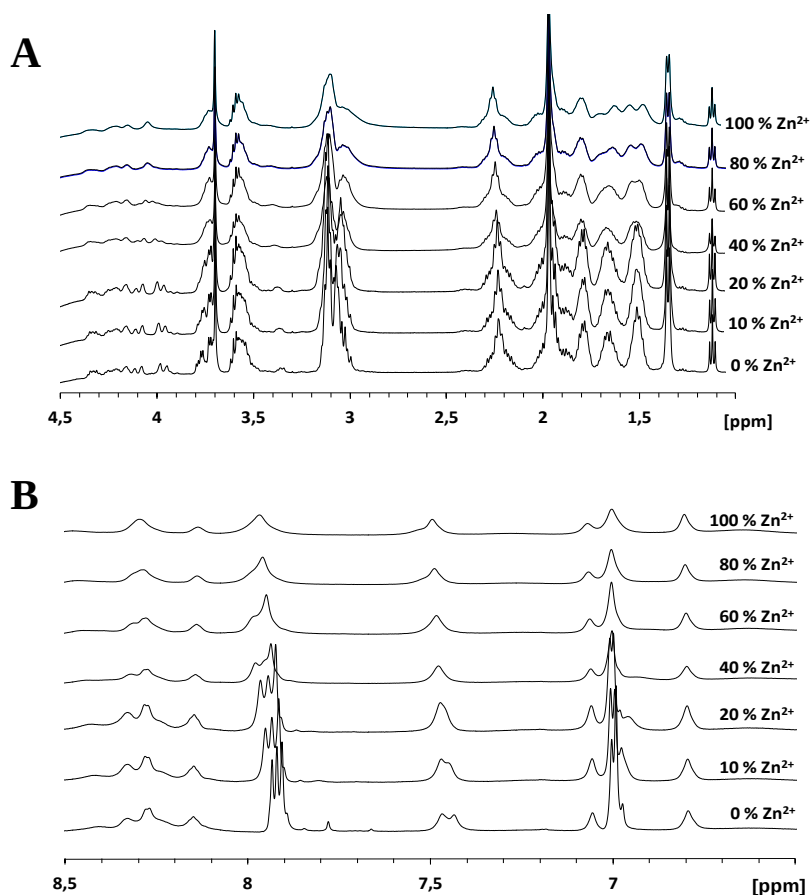


7. A-B. ábra: Az L^1 ligandum ^1H NMR spektrumának pH-függése cink(II)ion nélkül (A) és annak jelenlétében (B), a $\delta = 0,9\text{-}4,5$ ppm tartományban.

A $\delta = 6-9$ ppm tartományban (6. A. és B. ábra) az imidazolgyűrűk protonjai mellett az amidprotonok jelentkeznek. Ezek a pH növelésével egyre növekvő sebességű protoncsere miatt pH ~ 8 felett eltűnnek a spektrumról, és néhány apró különbségtől eltekintve (lásd később) azonosan viselkednek fémion jelen- és távollétében. Azonban ettől eltérően viselkednek az imidazolgyűrűk protonjai. Az L^1 peptid esetében az állapítható meg, hogy bár az imidazol-jelek pH függvényében történő eltolódása hasonló a 6. A. és B. ábrán, a pH 5 – 8 tartományban igen jelentős kiszélesedést mutatnak fémion jelenlétében, a viszonylag lassú ligandumcseréjű ZnL^1 komplex képződésével párhuzamosan. A fémion jelenlétében felvett spektrumokon minden jel kisebb-nagyobb kiszélesedést mutat, mégis, ez a hatás kiugróan jelentős a három imidazol-gyűrű esetén. Ez a megfigyelés mindhárom imidazolgyűrű koordinációját bizonyítja a pH 5-8 között jelenlévő ZnL^1 komplexben.

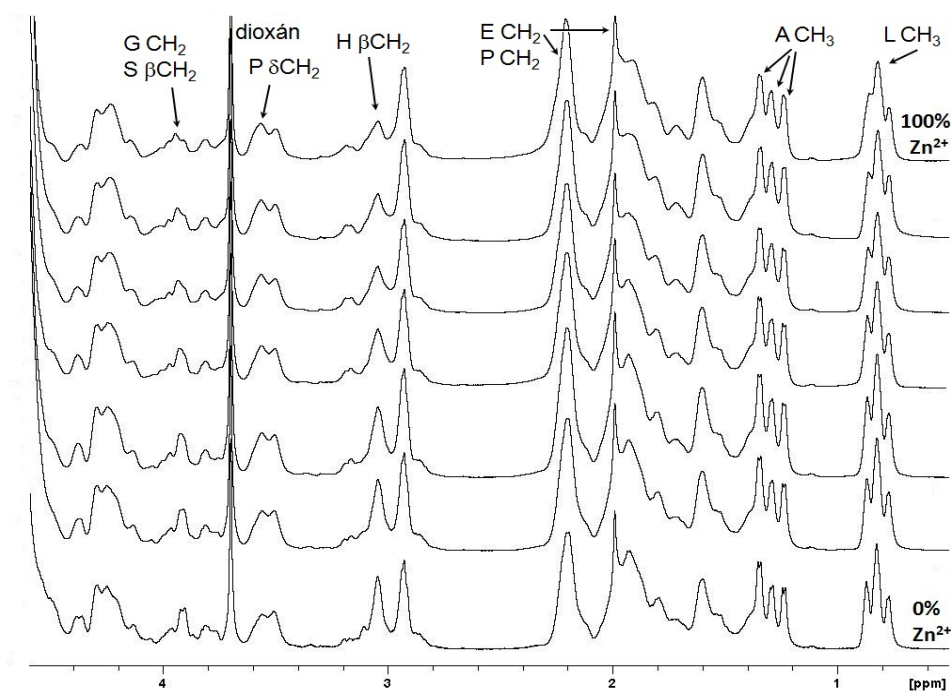
A fémion távol- és jelenlétében felvett spektrumokon számos apró jel utal L^1 peptid szerkezetének megváltozására a fémion koordinálódása során. Példaként említhetjük a glicin CH_2 -csoportjának jelét: míg cink(II) távollétében a peptideknél tipikusnak mondható AB-kvartett jelcsoport látható, addig Zn(II)-ion jelenlétében pH 6 – 8 között egyetlen szingulett jel alakul ki (lásd 7. A-B. ábra). Hasonlóan eltérő viselkedést figyelhetünk meg glutamin oldalláncának és a peptid C-terminális amidjának ($-(C=O)-NH_2$) jeleinél is (a 6. A. ábrán jelölt, 7,5 és 7 ppm körüli csúcspárok). Fémion távollétében a terminális amidcsoport (^{11}R) jelei látványosan eltolódnak a pH növelésével, cink(II)ion jelenlétében (6. B. ábra) ilyen erős eltolódás nem lép fel. Mindezek a peptid szerkezetének változására utalnak a koordináció hatására, de belőlük abszolút információk a térbeli struktúrára vonatkozóan nem állapíthatók meg.

A koordinációs módra vonatkozóan a fentiekhez hasonló következtetés vonható le a pH 6,8-nál, növekvő mennyiségű cink(II) mellett felvett spektrumok alapján is (8. A-B. ábra). Bár minden jel kiszélesedik kismértékben, a hisztidin protonok a többinél jelentősebben szélesednek és el is tolódnak növekvő mennyiségű cinkionok hatására.

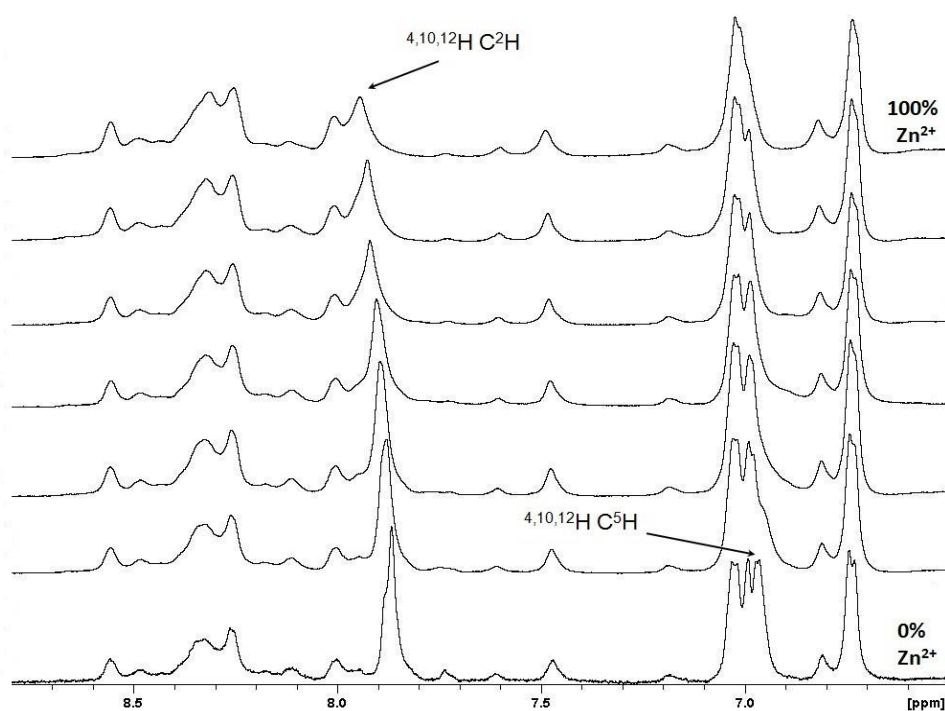


8. A-B. ábra: Az L^1 ligandum 1H NMR spektrumának Zn^{2+} -függése a $\delta = 0,9-4,5$ ppm (**A**) és a $\delta = 6,3-8,5$ ppm (**B**) tartományban.

Az L^2-Zn^{2+} rendszerben mért spektrumok (9, 10. ábra), a peptid nagyobb méretéből is következően, az előzőnél szelektívebb hatást mutatnak. A legtöbb jel nem, vagy csak nagyon kismértékben változik a cink(II) növekvő mennyiségének hatására. Viszont a hisztidin protonok egyértelmű eltolódást (főként a C^2H jelek), és jelentős kiszélesedést mutatnak. A jelek egy csoportja (Gly, Ser, Leu) szintén kismértékű változást mutat, ezek az aminosavak jellemzően a hisztidin-triád közelében vannak. Ugyanakkor a ciklikus peptid 5 db glutaminsav alegységének jelei nem változnak a cinkion adagolására, ami a korábban felvetett glutamát O-koordinációt valószínűtlenné teszi. Mindezek a ciklikus peptid domináns ZnH_3L^2 komplexében is, az L^1 -hez hasonló $\{3N_{im}\}$ koordinációt támasztják alá. A tirozin esetleges koordinációjára vonatkozóan fluoreszcenciás vizsgálatokat végeztünk, amire a Tyr fluoreszcens volta ad lehetőséget. Azonban a tirozin aromás gyűrűjének jele semmilyen változást nem mutat a cink(II)ionok mennyiségének növekedésével párhuzamosan, így megállapítható, hogy a Zn^{2+} koordinációja a tirozintól távol valósul meg - ez közvetett módon megerősíti azt is, hogy a glutaminsav-karboxilátok nem koordinálódnak.



9. ábra: Az L^2 ligandum ^1H NMR spektrumának Zn^{2+} -függése a $\delta = 0,5$ - $4,5$ ppm tartományban.



10. ábra: Az L^2 ligandum ^1H NMR spektrumának Zn^{2+} -függése a $\delta = 6,5$ - $9,0$ ppm tartományban.

Az L^1 peptid fiziológiás tartományban domináns ZnL komplexe $\text{pH} \sim 7$ - 8 között kezd deprotonálódni és két átfedő protonvesztési folyamaton keresztül alakul ki előbb a ZnH_1L^1 , majd a ZnH_2L^1 összetételű részecske. E két deprotonálódási lépés a fémionhoz koordinált víz, és/vagy az amidnitrogének protonvesztési folyamataihoz rendelhetőek. Általában igaz,

hogy az amidnitrogéneknek a fémionokhoz való koordinálódását az NMR spektrumokon a jelek duplázódása kíséri [13], mert a komplex ligandumcsere sebessége jelentősen lelassul. Méréseink során éppen ellenkezőleg, a ligandumcsere sebességének növekedése volt tapasztalható pH 7-10 között, ezért feltételezhetően a vizsgált pH-tartományban nem amidkoordináció, hanem két koordinált vízmolekula deprotonálódása zajlik le, meglepő módon kooperativitást mutatva ($pK_{ZnL^1} = 8,05$, $pK_{ZnH_{-1}L^1} = 8,03$). A pH ~ 8 felett dominánssá váló ZnH_2L^1 igen stabil, nagy mennyiségben keletkezik.

A ZnH_3L^2 komplex pH 7 felett öt egymást követő (átfedő) deprotonálódást szenved, a ZnH_2L^2 , $ZnHL^2$, ZnL^2 , $ZnH_{-1}L^2$ és a pH $\sim 10,7$ -től dominánssá váló ZnH_2L^2 komplex képződése közben. Feltételezhetően az L^1 ligandumhoz hasonlóan az első két lépésben hidroxó-vegyeskomplexek képződnek, majd a magasabb pK-jú oldallánci donorcsoportok deprotonálódnak a fémiontól függetlenül. Ezt az elképzelést támasztja alá pK_{ZnHL^2} , pK_{ZnL^2} , $pK_{ZnH_{-1}L^2}$ valamint a $pK_{H_3L^2}$, $pK_{H_2L^2}$ és pK_{HL^2} értékek jó egyezése is (1. és 2. táblázat).

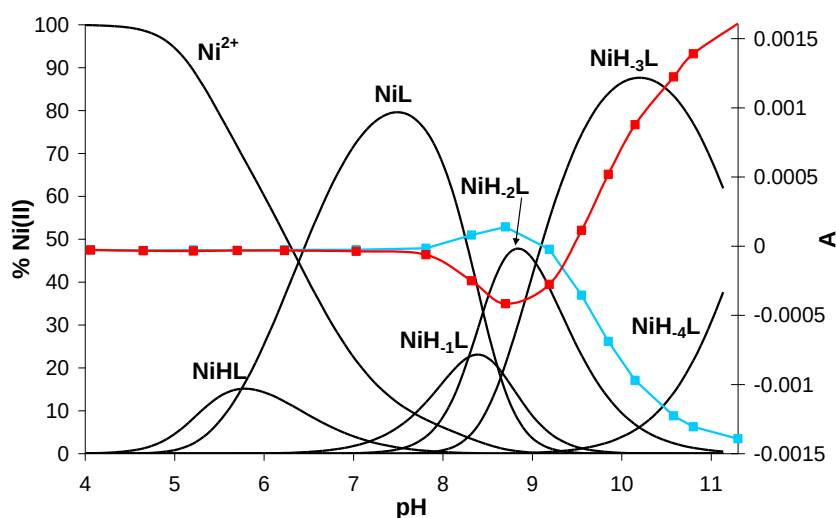
4.3. A ligandumok nikkel(II)komplexei

Azért, hogy információt nyerjünk a ZnT3 fehérje feltételezett fémkötő helyének (MBS1) fémion-szelektivitásáról, vizsgáltuk az Ac-RHQAGPPHSHR-NH₂ ligandum kölcsönhatását Ni(II)- és Cu(II)-ionokkal, és a c(Ac-CKLHQAGPPHSHGSRGAELYAPLEEGPEEK-NH₂) ligandum Ni(II)-ionokkal való kölcsönhatását is. Az L^1 -Ni(II) rendszerben az 1:1 ligandum-fémion arányú potenciometriás méréseket pH ~ 9 -ig értékeltük ki. Kétszeres ligandumfelesleg jelenlétében nem tapasztaltunk változást az 1:1 aránynál jelenlevő komplexekhez képest, ezért biszkomplexek jelenlétét nem feltételezzük. Az ilyen arányra vonatkozó, pH ~ 4 -11,3 tartományban végzett potenciometriás, UV-Vis és CD spektroszkópiás mérések mellett a lúgos pH-jú oldatok NMR spektrumait is felvettük, melyek segítségével a síknégyszetes Ni(II)-komplexek tanulmányozhatóak. Az L^2 peptidből kisebb mennyiség állt rendelkezésünkre a vizsgálatainkhoz, ezért a Ni²⁺ ionokkal való kölcsönhatást csak pH-potenciometria segítségével követtük.

A pH-potenciometriás eredmények értékelése során a 3. táblázatban feltüntetett összetételű komplexekre tudtunk stabilitási és (de)protonálódási állandókat meghatározni. Az ezek alapján számolt eloszlásgörbéket a 11. ábra szemlélteti.

3. táblázat: A vizsgált nikkel(II)komplexek képződési és (de)protonálódási állandói a standard deviációkkal, valamint log K származtatott állandók.

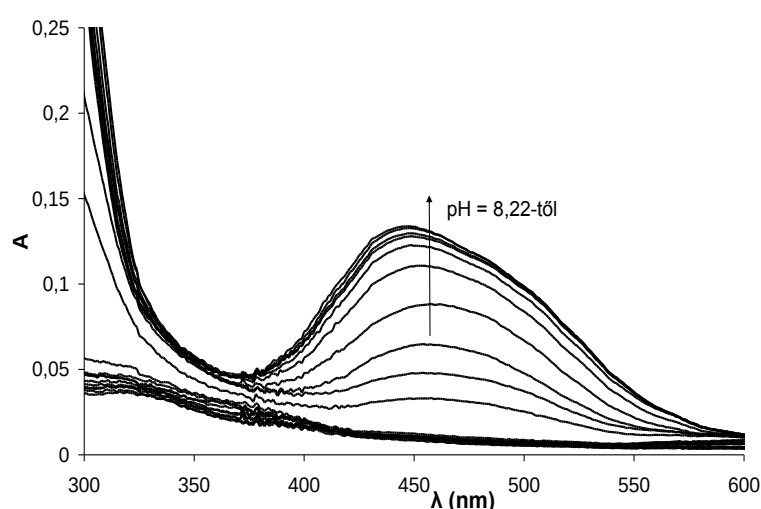
L¹			L²		
Ni _p H _q L _r	log β _{pqr}	pK _{pqr}	Ni _p H _q L _r	log β _{pqr}	pK _{pqr}
NiHL	10,29(3)	5,69	NiH ₄ L	42,19(2)	5,87
NiL	4,60(1)	8,52	NiH ₃ L	36,32(1)	8,84
NiH ₁ L	-3,92(4)	8,34	NiH ₂ L	27,48(3)	9,06
NiH ₂ L	-12,26(2)	9,00	NiHL	18,42(3)	9,00
NiH ₃ L	-21,26(2)	11,21	NiL	9,42(3)	9,92
NiH ₄ L	-32,47(2)		NiH ₁ L	-0,50(2)	10,40
			NiH ₂ L	-10,90(3)	11,45
			NiH ₃ L	-22,35(4)	
log K _{NiHL}	3,53		log K _{NiH₃L}	5,20	
Mérési pontok száma:	717		Mérési pontok száma:	212	
Illesztési paraméter (cm ³)	0,0033				



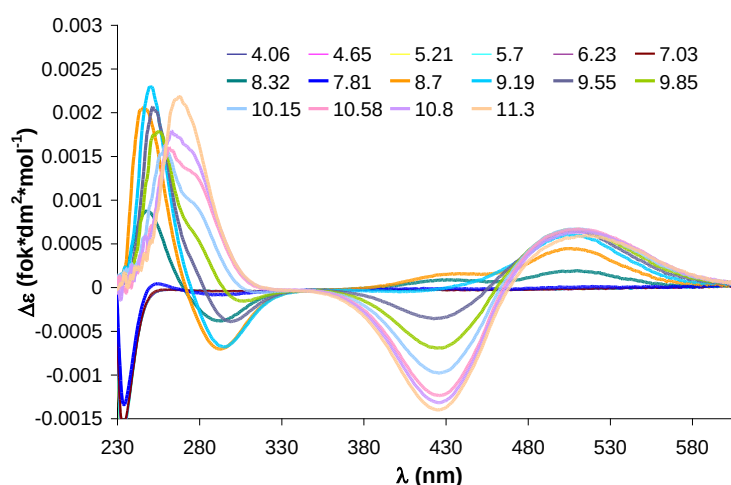
11. ábra: Az L¹–Ni(II) 2:1 arányú rendszerében számolt eloszlásgörbék ($c_{\text{lig}} = 1 \times 10^{-3}$ M, $c_{\text{Ni(II)}} = 5 \times 10^{-4}$ M, $I = 0,1$ M, $T = 25$ °C) és a 280 (pirossal), valamint a 423 (késsel) nm-en mért CD intenzitások pH-függése.

Ahogy az ide vonatkozó eloszlásgörbén is látható (11. ábra), az L¹-nikkel(II) 2:1 arányú rendszerben a legmagasabb protonáltsági fokú komplex a NiHL, ami savas tartományban, pH ~ 5 fölött képződik kis mennyiségben. A komplex - igen kis intenzitású látható spektruma alapján (lásd 12. ábra) - oktaéderes szerkezetű, a fémion minden bizonnyal két imidazolgyűrű

által koordinált. Már szinte ugyanezen a pH-n megindul a semleges kémhatású tartományban domináns NiL részecske kialakulása. Képződése során a harmadik – feltehetően a szeparált, N-terminális vég felőli – hisztidin imidazolnitrogénje adja le protonját és koordinálódik a nikkel(II)ionhoz. A látható spektrumoknak az ebben a pH-tartományban megfigyelhető elhanyagolható intenzitása itt is oktaéderez geometriára utal. Szintén az imidazolcsoportok koordinációját támasztja alá ezen részecskénél, hogy a NiHL és NiL komplexek fémionból és megfelelő protonáltságú ligandumból történő képződését jellemző származtatott log K értékek ($\log K_{\text{NiHL}} = 3,53$, $\log K_{\text{NiL}} = 4,60$) jól megfelelnek az irodalomban közölt, két ill. három hisztidint tartalmazó peptidek nikkel(II)komplexeire vonatkozó megfelelő log K értékeknek [23].

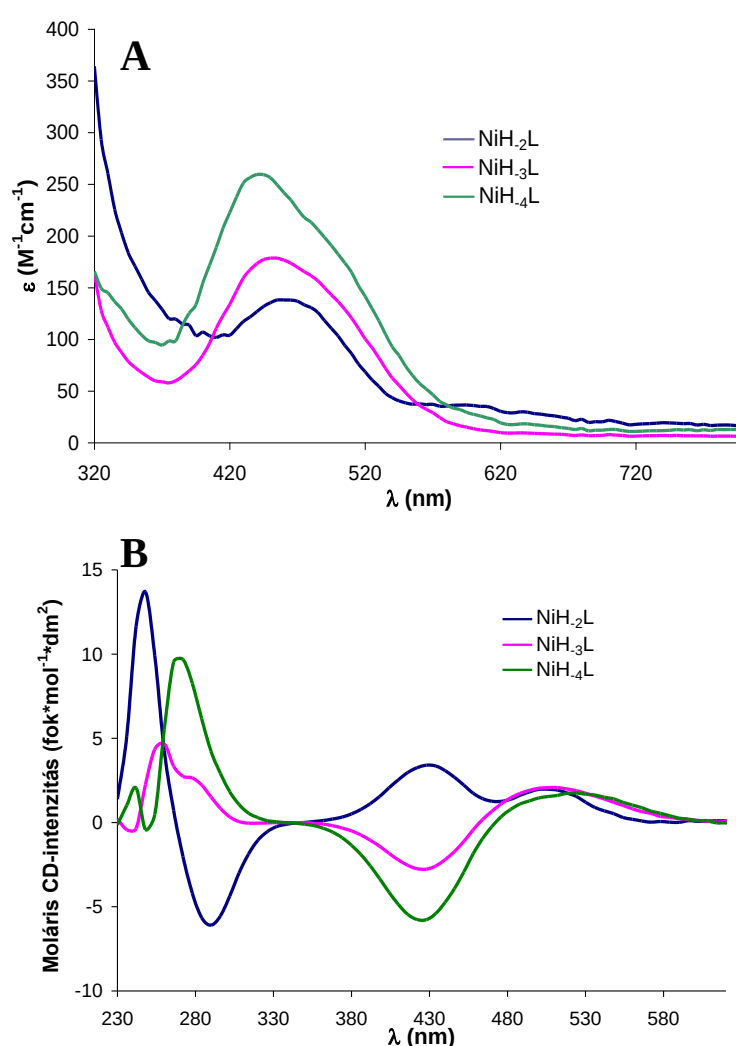


12. ábra: Az L^1 -Ni(II) 2:1 arányú rendszerének UV-Vis spektrumai különböző pH-kon ($c_{\text{lig}} = 7 \times 10^{-4}$ M; $c_{\text{Ni(II)}} = 3,5 \times 10^{-4}$ M, $I = 0,1$ M, $T = 25$ °C).



13. ábra: Az L^1 -Ni(II) 2:1 arányú rendszerének CD spektrumai különböző pH-kon ($c_{\text{lig}} = 7 \times 10^{-4}$ M; $c_{\text{Ni(II)}} = 3,5 \times 10^{-4}$ M, $I = 0,1$ M, $T = 25$ °C).

A NiH_1L^1 és NiH_2L^1 részecskékre vonatkozó deprotonálódási állandókat összevetve (3. táblázat) megállapítható, hogy a NiL^1 komplexből a NiH_1L^1 képződése, valamint ennek az NiH_2L^1 részecskévé alakulása kooperatív deprotonálódásokon keresztül valósul meg. A nikkel(II)-peptid rendszerekben ez jellemző sajátság, mivel az amidnitrogének koordinálódása rendszerint geometriaváltást eredményez, a paramágneses, kis intenzitású *d-d* sávval rendelkező oktaéderes komplexek diamágneses, 450 nm körül intenzív elnyelést mutató síknégyszetes komplexekké alakulnak át. Minthogy a NiH_1L^1 komplex minden pH-n minor részecske, UV-Vis és CD spektruma nem határozható meg pontosan. A NiH_2L^1 viszont már biztosan síknégyszetes geometriájú (14. A-B. ábra).

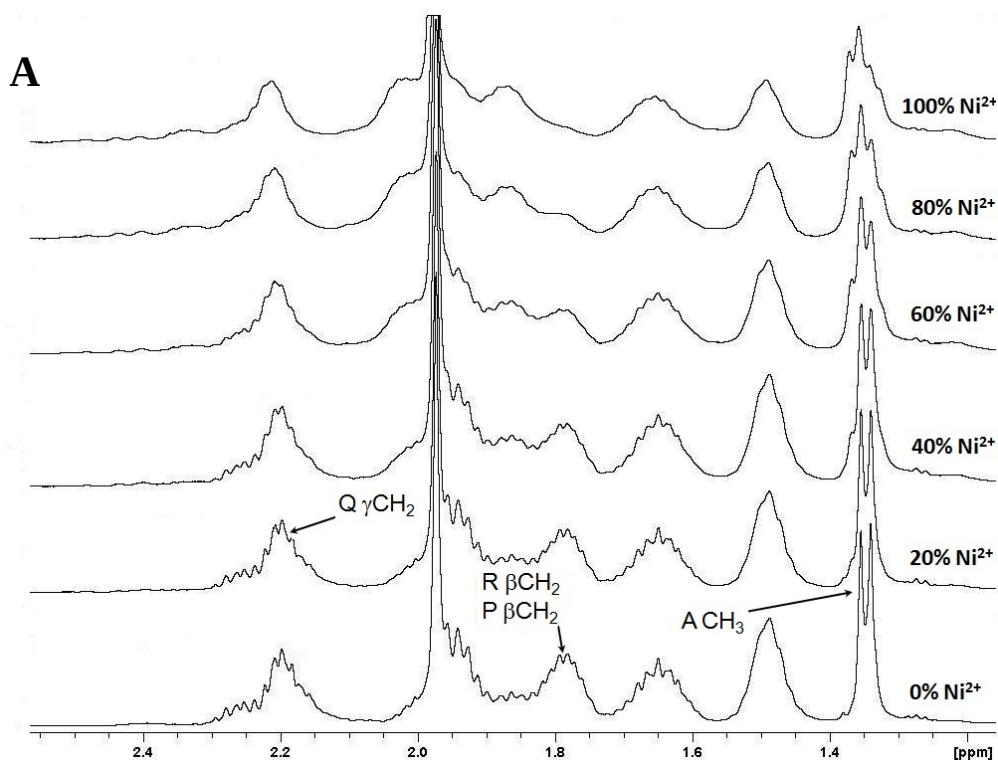


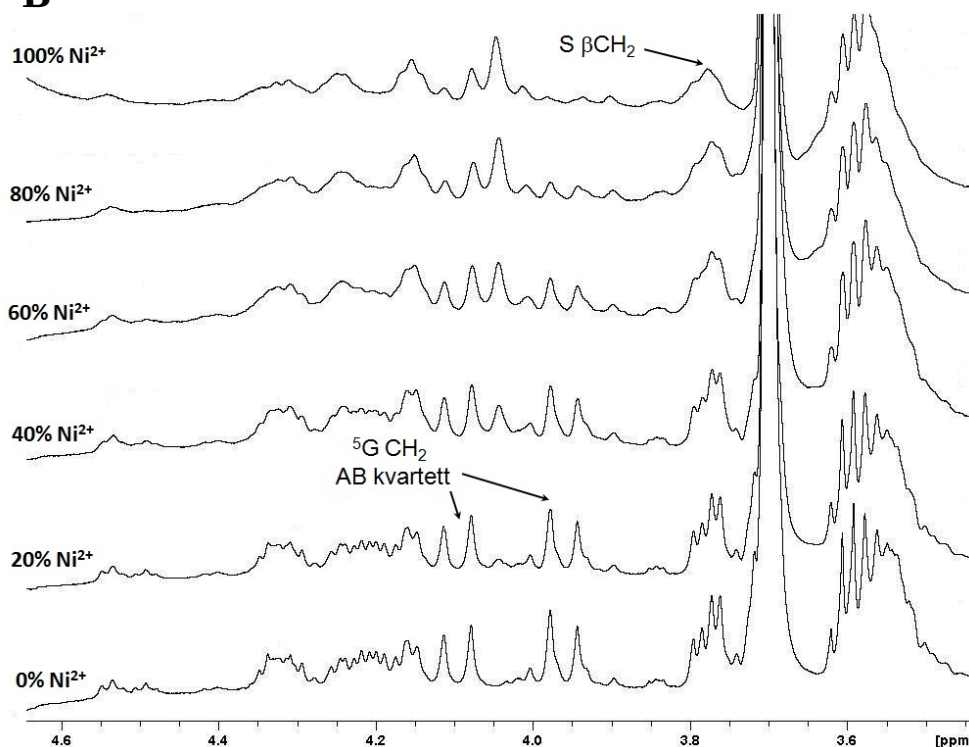
14. A-B. ábra: Az L^1 –Ni(II) 2:1 arányú rendszerében mért főbb részecskék egyedi moláris UV-Vis (**A**) és CD (**B**) spektrumai.

Szeeparált His-alegységeket tartalmazó peptidek nikkel(II)komplexei esetén általában három egymást követő kooperatív deprotonálódás tapasztalható, melyek egy $\{\text{N}_{\text{im}}, 3\text{N}^-\}$ koordinációjú részecske kialakulásához vezetnek [26]. Esetünkben a harmadik deprotonálódás

valamelyest elkülönül az előző kettőtől, ami a NiH_2L^1 részecske viszonylagos extra stabilitásra utal. Ez valószínűleg a –HSH– szekvencia megléte miatt, a NiH_2L^1 komplexben kialakuló kitüntetett stabilitású, $\{\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}\}$ típusú koordináció kialakulásával magyarázható (lásd később, a CuH_2L^1 -nél).

A pH 9 felett nagy mennyiségben képződő NiH_3L^1 részecske koordinációs szférájában – egy hisztidin kiszorulásával és egy újabb deprotonálódó amidnitrogén koordinálódásával – a már említett nagy stabilitású $\{\text{N}_{\text{im}}, 3\text{N}^-\}$ kötődés jön létre. Ezt jól mutatja az egyedi moláris UV-Vis spektrumok $\lambda^{\text{d-d}}_{\text{max}}$ értékeinek eltolódása a kisebb hullámhosszak irányába (14. A. ábra). A részecske széles tartományban domináns, csak pH 11 felett alakul át a NiH_4L^1 komplexszé. Bár a viszonylag alacsony ligandum-koncentráció miatt ez a pH-tartomány már a potenciometriás mérések megbízhatósági határán mozog, a CD spektrumok igazolják egy újabb komplex kialakulását pH 11 felett (11. ábra, pirossal jelölt CD jel). Kialakulása során egy negyedik amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja következhet be – ezt látszik alátámasztani a NiH_4L komplex egyedi UV-látható és CD spektrumának erősen megnövekedett intenzitása a NiH_3L spektrumához képest (14. A-B. ábra). Azonban irodalmi adatok alapján a negyedik amidnitrogén deprotonálódása kevésbé valószínű [26], inkább egy másik protonvesztési folyamattal érdemes számolni: a koordinálódó hisztidin pirrolszerű, N1-nitrogénjének koordináció nélküli deprotonálódása [27] is megtörténhet, ami jelentősen átrendezi a fémion körüli elektroneloszlást.



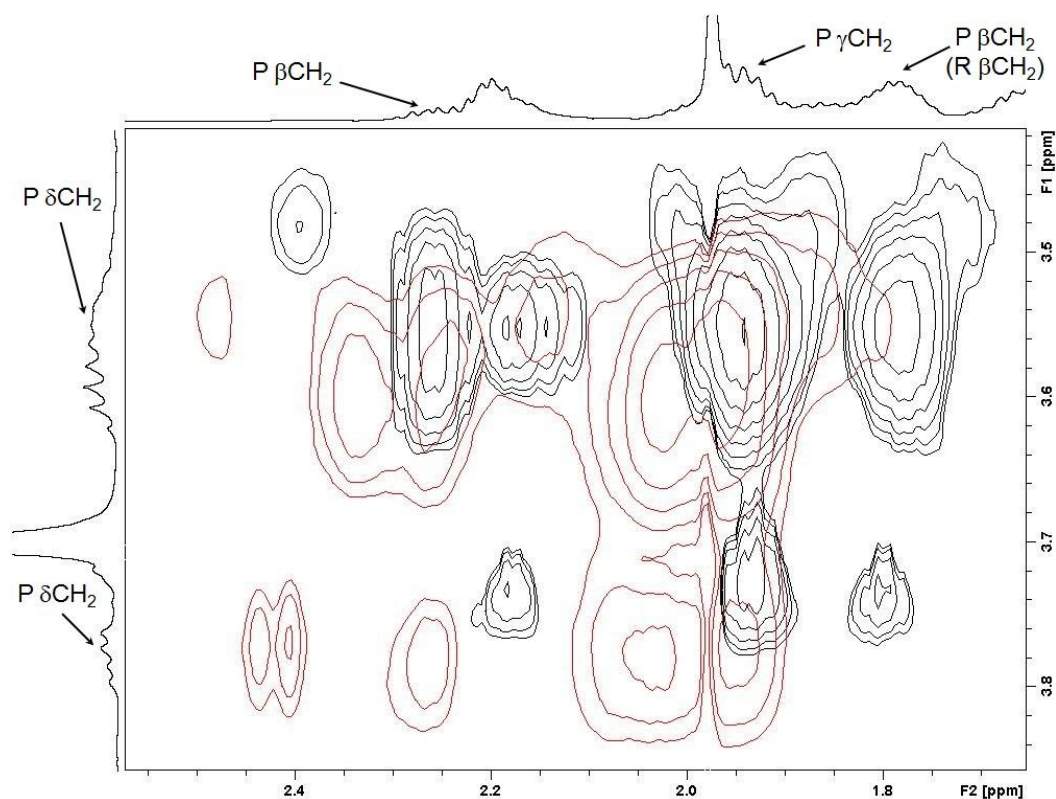
B

15. A-B. ábra: Az L^1 ligandum 1H NMR spektrumának Ni^{2+} -függése

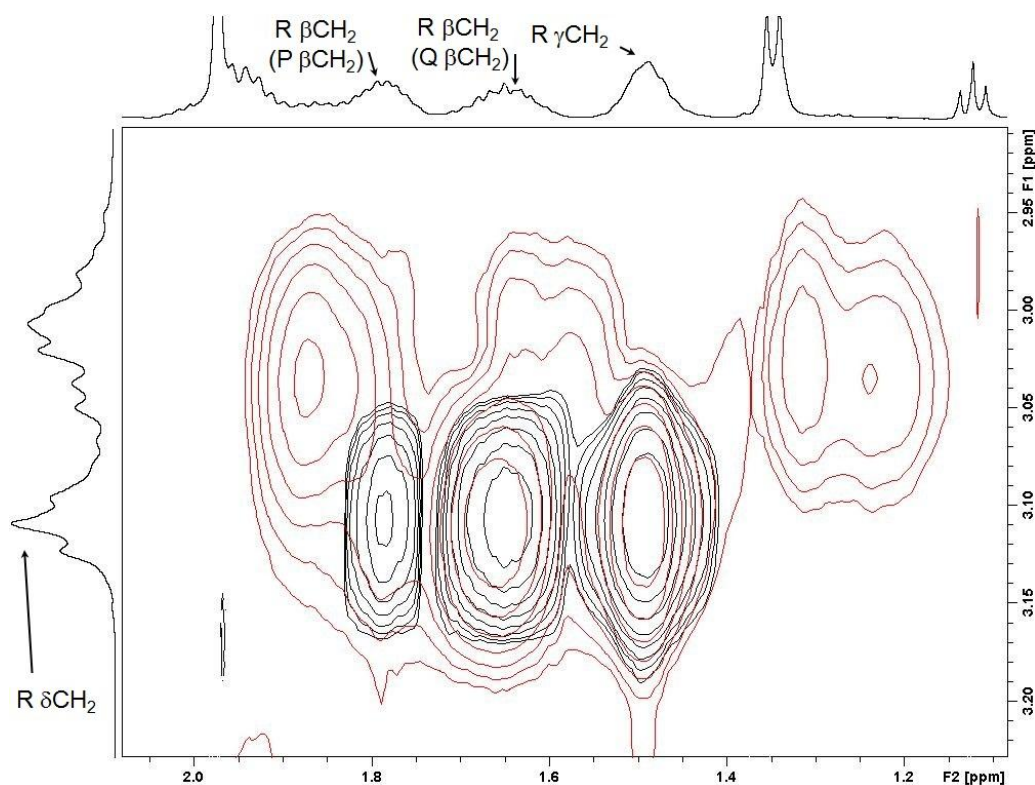
(A: 1,2-2,6 ppm, B: 3,4-4,6 ppm)

Potenciometriás eredményeinket a síknégyzetes NiH_3L^1 részecske NMR vizsgálatával egészítettük ki. A pH $\sim 10,2$ -nél, növekvő Ni^{2+} koncentráció mellett felvett spektrumsorozatot a 15. A. és B. ábra szemlélteti; az ekvimoláris oldatban felvett, viszonylag jó felbontású spektrum önmagában bizonyítja a diamágnéses komplex(ek) jelenlétét. Az L^1 peptid esetén a nikkell(II)ionnak 3 lehetősége van a $\{Ni_{im}, 3N^-\}$ típusú koordináció kialakítására. Kötődésének pontos helyére a jelek koordináció hatására bekövetkező változásaiból próbáltunk következtetni, hiszen bizonyos csoportok jelei látványos alakváltozást szenvednek, ami a kémiai környezet megváltozására utal. Elsősorban az Ala, Gly, Arg és Pro jelek változása szembeötlő. A 5Gly CH_2 csoportjának 3,9-4,1 ppm-nél jelentkező AB kvartettje szinguletté alakul. A 4Ala CH_3 csoportjának 1,35 ppm-nél jelentkező dublettje is erőteljesen megváltozik a koordináció hatására. E változások arra utalhatnak, hogy ezen aminosavak amidnitrogénjei részt vesznek a koordinációban, a fémion az N-terminális közeli hisztidin imidazolgyűrűjéhez, és az attól a C-terminális irányában elhelyezkedő Gln, Ala és Gly aminosavak amidnitrogénjéhez kötődhet. Azonban a már említett 4Ala CH_3 jele két kb. azonos intenzitású dublettként jelentkezik, ami két különböző kémiai környezetet jelentő komplex összemérhető mennyiségben való képződését valószínűsíti. Figyelembe véve a Ser 3,8 ppm-nél található jelének karakteres szélesedését is, a fentiek egy másik (a C-terminális közeli koordinációjú) szerkezeti izomer egyidejű

jelenlétére utalnak (mivel 10,2-es pH-n a NiH_3L komplex mellett nincs más protonáltsági állapotú domináns részecske). Három egymást követő amidnitrogén koordinációja természetesen a peptid konformációjának alapvető változását eredményezi, ami jól nyomon követhető a kötőhely két szélén található Arg-, valamint a Pro-jelek megváltozása alapján is.

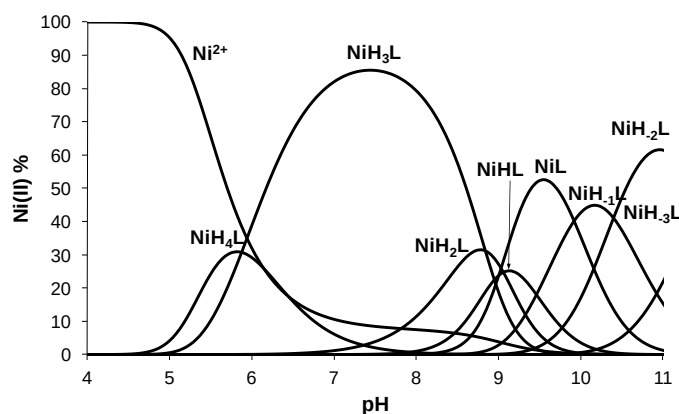


16. ábra: Az L^1 ligandum TOCSY-spektrumának változása; a Pro-jelek (fekete: szabad ligandum, piros: jelek Ni^{2+} jelenlétében; a szegélyre illesztett spektrumok a szabad ligandum jeleit mutatják).



17. ábra: Az L^1 ligandum TOCSY-spektrumának változása; az Arg-jelek (fekete: szabad ligandum, piros: jelek Ni^{2+} jelenlétében; a szegélyre illesztett spektrumok a szabad ligandum jeleit mutatják).

Az L^2 ligandum legsavasabb pH-n képződő komplexe nikkel(II)ionok jelenlétében a NiH_4L^2 összetételű minor részecske. 6-os pH körüli maximumánál a NiH_3L^2 domináns komplex már körülbelül azonos mennyiségben van jelen, s gyorsan meg is haladja azt. Ezen részecske közel 3 pH egységen keresztül uralkodó oktaéderes, paramágneses, $\{3N_{im}\}$ koordinációjú komplex. A képződésére felírható egyensúlyi állandó ($Ni^{2+} + H_3L^2 = NiH_3L^2$, $\log K = 5,20$) közel egy nagyságrenddel kisebb, mint a megfelelő cinkkomplex értéke.

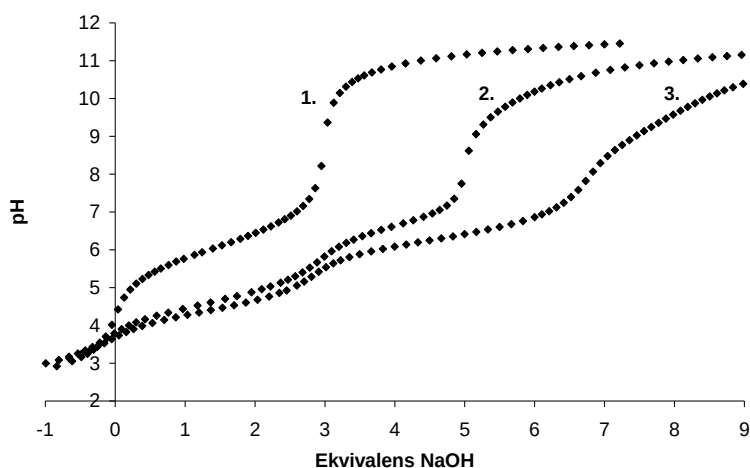


18. ábra: Az L^2 -Ni(II) 2:1 arányú rendszerében számolt eloszlásgörbék ($c_{lig} = 1,1 \times 10^{-3}$ M, $c_{Ni(II)} = 1 \times 10^{-3}$ M, $I = 0,1$ M, $T = 25$ °C).

A pH 8 felett meginduló, egymással erősen átfedő deprotonálódások során sárga színű, diamágneses komplexek képződnek, így azok a fémion által indukált amidnitrogének deprotonálódását, valamint a bázikus oldalláncok protonvesztését eredményező mikrofolyamatokhoz rendelhetőek. A $\text{Zn}^{2+}\text{-L}^2$ rendszerhez hasonlóan itt is végeztünk néhány egyszerű fluorimetriás tesztet, hogy megállapítsuk, van-e hatása a fémionkoordinációnak a peptid fluorimetriásan aktív Tyr körüli szegmensére. Ám a tirozintól származó jel most sem szenvedett változást a fémionmennyiség növelésével, azaz feltehetően az L^2 peptidhez kötődő nikkkel is távol helyezkedik el a Tyr-től.

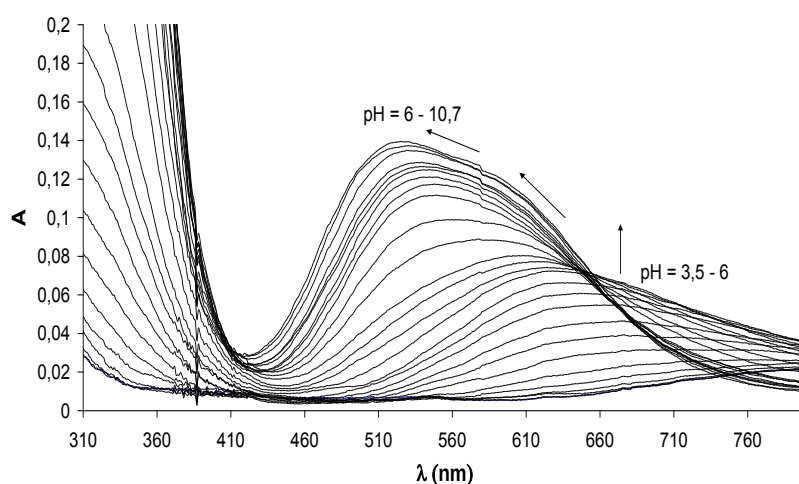
4.4. Az L^1 ligandum réz(II)komplexei

A peptid réz(II)-ionokkal 1:1 és 2:1 fémion-ligandum arányok mellett a teljes pH-tartományban vízzoldható egy- és kétmagvú komplexeket képez. A 19. ábrán látható titrálási görbékéből leolvasható, hogy a szabad ligandumhoz viszonyítva, fémiononként két „extra” deprotonálódás játszódik le pH ~ 8 -ig, ami az amidnitrogének fémion-indukálta protonvesztését mutatja. Az ábra azt is szemlélteti, hogy a fémiont tartalmazó rendszerekben pH ~ 4 értéknél indul meg számottevő mértékben a komplexek képződése, ugyanis ettől kezdve „válnak szét” a görbék (ugyanolyan pH eléréséhez több lúgot kell adni a fémiont tartalmazó rendszerhez, mint a tiszta ligandum oldatához). Az 1:1 és 1:2 ligandum-fém aránynál mért görbék pH ~ 5 -ig hasonló lefutásúak, amiből arra lehet következtetni, hogy fémionfelesleg esetén itt kezdenek megjelenni kétmagvú komplexek.



19. ábra: Az L^1 ligandum (1.), az $\text{L}^1\text{-Cu(II)}$ 1:1 (2.) és az $\text{L}^1\text{-Cu(II)}$ 1:2 (3.) arányú rendszerének titrálási görbéi a ligandumra vonatkoztatott ekvivalens lúgmennyiség ($n_{\text{NaOH}}/n_{\text{lig}}$) függvényében.

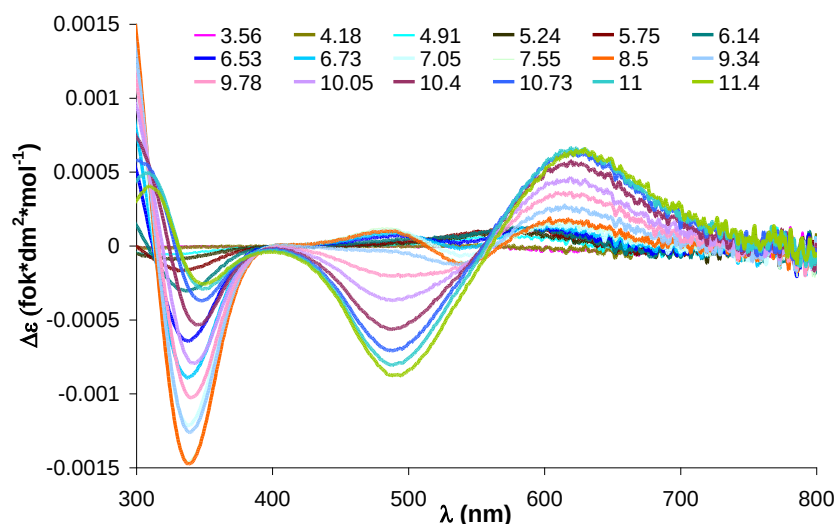
Potenciometrás méréseinkkel párhuzamosan vizsgáltuk rendszereink UV-Vis és CD spektrumainak pH függését is. Az ekvimoláris oldatokban felvett elektrongerjesztési spektrumokat a 20., a CD spektrumokat a 21. ábra mutatja be. Az elektrongerjesztési spektrumon a réz(II) *d-d* átmenetéhez rendelhető sáv nagyobb energiaértékek (kisebb hullámhosszak) felé történő erőteljes eltolódása figyelhető meg a pH növelésével (kék eltolódás), amit a 20. ábrán nyilakkal szemléltettem.



20. ábra: Az L^1 -Cu(II) 1:1 arányú rendszer UV-Vis spektrumai különböző pH-kon.

Ez az eltolódás a koordinálódott nitrogének egyre növekvő számának következménye, mivel ezen donorcsoportok mindegyike nagyobb ligandumtérerőt hoz létre a réz(II)ion körül, mint az általuk leszorított vízmolekulák.

A CD spektrumok pH $\sim$ 6-ig viszonylag kismértékű változást mutatnak, idáig feltehetően csak imidazolnitrogének lépnek be a koordinációs szférába, magasabb pH-n azonban jelentős mértékben változnak. Minthogy a királis perturbáció döntően az amidnitrogén koordinálódásán keresztül hat a réz(II)ionra, pH 6 felett már ezen donorcsoportok koordinálódásával is számolni kell.

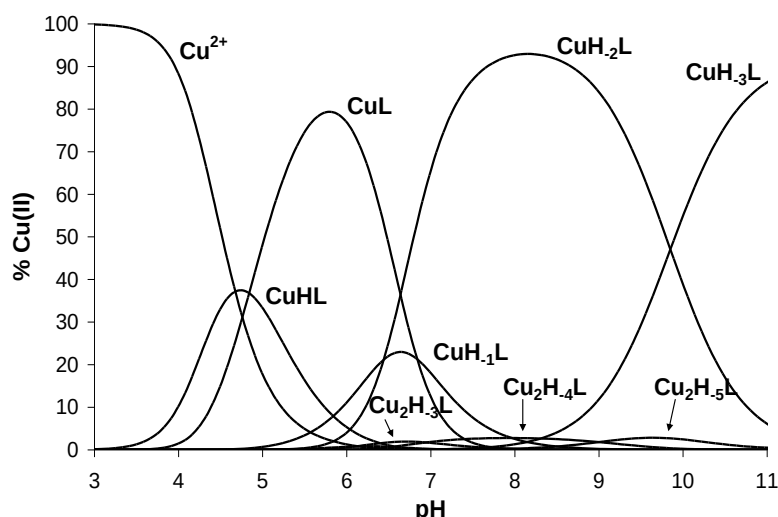


21. ábra: Az L^1 -Cu(II) 1:1 arányú rendszerének CD spektrumai különböző pH-kon (c_{lig} és $c_{\text{Cu(II)}} = 8 \times 10^{-4}$ M, $I = 0,1$ M, $T = 25$ °C).

A potenciometriás titrálások, valamint a pH-függő UV-Vis és CD spektrumok együttes kiértékeléséből nyertük információinkat rendszereink egyensúlyi viszonyait, valamint a képződött komplexek egyedi moláris UV-Vis és CD spektrumait illetően. Ez utóbbiak, és a később bemutatandó ESR eredmények szolgálták a vizsgált komplexekre vonatkozó szerkezeti információk alapjaként. A rendszerben képződő részecskék összetételét és azok képződését jellemző bruttó stabilitási állandók ($\log \beta$) értékeit, valamint a CuHL^1 komplex fémionból és a megfelelő protonáltágú ligandumból történő képződését jellemző $\log K$ értékét a 4. táblázatban foglaltuk össze.

4. táblázat: A vizsgált réz(II)komplexek képződési állandói és $\log K$ állandó.

$\text{Cu}_p\text{H}_q\text{L}^1_r$	$\log \beta_{\text{pqr}}$	pK_{pqr}	$\text{Cu}_p\text{H}_q\text{L}^1_r$	$\log \beta_{\text{pqr}}$	pK_{pqr}
CuHL	12,51(1)	4,83	$\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}$	-1,77(3)	6,14
CuL	7,68(1)	6,85	$\text{Cu}_2\text{H}_3\text{L}$	-7,89(1)	6,83
CuH_{-1}L	0,83(3)	6,44	$\text{Cu}_2\text{H}_4\text{L}$	-14,82(1)	9,23
CuH_2L	-5,61(1)	9,85	$\text{Cu}_2\text{H}_5\text{L}$	-23,82(2)	9,60
CuH_3L	-15,46(1)		$\text{Cu}_2\text{H}_6\text{L}$	-33,66(2)	
$\log K_{\text{CuHL}}$	5,75				
Mérési pontok	804				
Illesztési paraméter (cm^3)	0,0056				

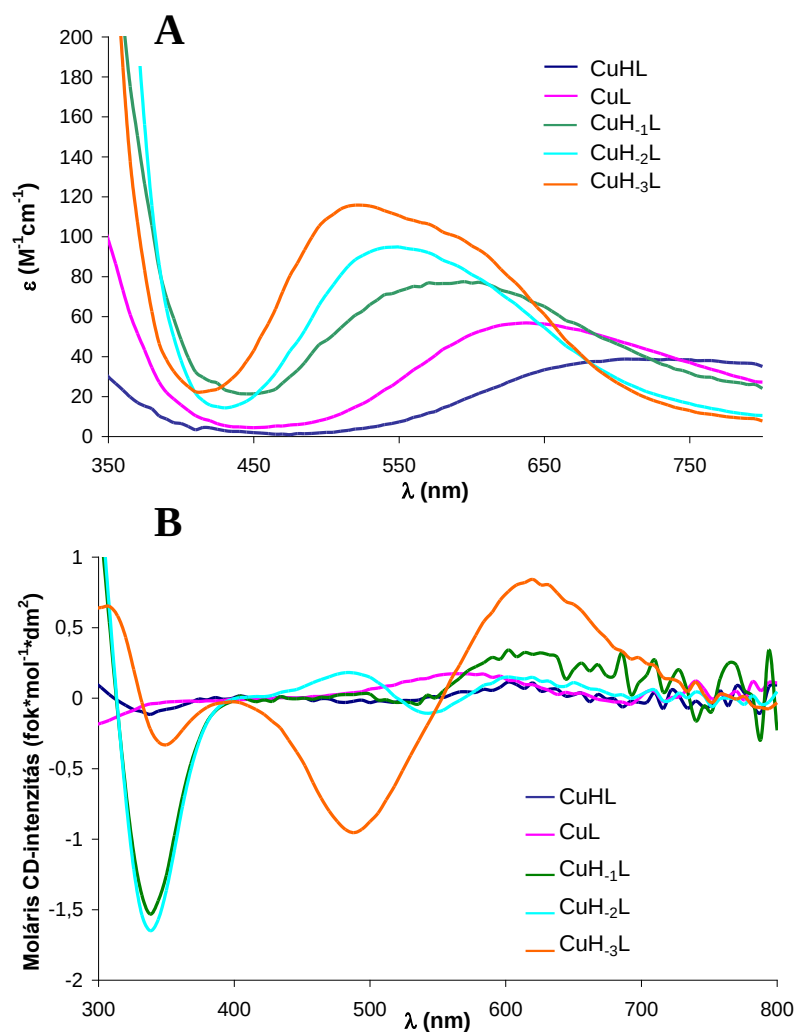


22. ábra: Az L^1 -Cu(II) 1:1 arányú rendszerében számolt eloszlásgörbék ($c_{\text{lig}} = 1 \times 10^{-3}$ M, $c_{\text{Cu(II)}} = 1 \times 10^{-3}$ M, $I = 0,1$ M, $T = 25$ °C).

A L^1 -Cu(II) 1:1 rendszerben képződő komplexek eloszlásgörbéi a 22. ábrán láthatóak. A rendszerben kimutatható legmagasabb protonáltsági fokú részecske a CuHL^1 , amely viszonylag jelentős, ám nem domináns mennyiségben képződik pH 4 és 5 között. Az alkalmazott szerkezetvizsgálati módszereink mindegyike azt mutatja (kis intenzitású CD spektrum, $\lambda^{\text{d-d}}_{\text{max}} = 725$ nm, $g_{\text{zz}} = 2,330$, $A_{\text{zz}} = 140$ G), hogy ezen részecskében a Cu(II)-iont koordinációs szférájában két imidazolnitrogén veszi körül. Ez a komplex pH ~ 5 fölött deprotonálódik és alakul át a pH ~ 5 –6 között domináns CuL^1 részecskévé (lásd 22. ábra). E folyamat pK-ja (4,83) jóval kisebb, mint a szabad ligandum első pK-ja, ami mindhárom imidazol koordinációját valószínűsíti. Ez teljes összhangban van ezen részecske spektrális sajátágaival ($\lambda^{\text{d-d}}_{\text{max}} = 625$ nm, $g_{\text{zz}} = 2,274$, $A_{\text{zz}} = 165$ G), így a komplex $\{3N_{\text{im}}\}$ koordinációs móddal jellemezhető. Emellett, a CuL^1 és CuHL^1 komplexek fémionból és a megfelelő protonáltságú ligandumból történő képződésére ($\text{Cu}^{2+} + \text{HL}^1 = \text{CuHL}^1$ és $\text{Cu}^{2+} + L^1 = \text{CuL}^1$) felírható folyamatokat jellemző log K értékek is (5,75 és 7,68) meggyőző hasonlóságot mutatnak más 2 N_{im} , illetve 3 N_{im} koordinált peptid-Cu(II) komplexek esetén mért értékekkel [23-26].

A semleges pH-tartományban, a CuH_1L^1 és CuH_2L^1 részecskék képződésével párhuzamosan, nagy intenzitású negatív CD-effektus jelenik meg 340 nm környékén (21. ábra), ami a réz(II)-amid töltésátviteli sávnak tulajdonítható, így amidkoordinációt valószínűsít. Az a tény, hogy a CuH_1L^1 részecske deprotonálódási állandója kisebb érték ($\text{pK}_{\text{CuH}_1L^1} = 6,43$), mint a nála protonáltabb CuL^1 részecskéé ($\text{pK}_{\text{CuL}^1} = 6,86$), kooperatív deprotonálódásra utal. Ilyen kooperativitást mutató deprotonálódások, melyben két

amidnitrogén csaknem egyidejű protonvesztése és koordinációja játszódik le, jellemzőek a HXH-részletet tartalmazó peptidek réz(II)komplexeire [28], így feltételezzük, hogy a CuH_2L^1 komplexben a réz(II) a ligandum –HSH– részletéhez kötődik, $\{\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}\}$ koordinációs környezetet kialakítva. A komplex spektrális paraméterei is ($\lambda^{\text{d-d}}_{\text{max}} = 545 \text{ nm}$, $g_{\text{zz}} = 2,209$, $A_{\text{zz}} = 185 \text{ G}$) alátámasztják ezt a kötési módot. Ez a szerkezet feltehetően igen nagy stabilitású, hiszen a komplex széles pH-tartományban domináns, csak magas pH-n alakul tovább. A CuH_3L^1 részecske pH ~ 9 -10 felett képződik, amivel párhuzamosan újabb mélyre ható változások tapasztalhatóak a CD spektrumon (21. ábra), s ez jelentős szerkezetváltozásra utal ezen részecske kialakulása során. E komplex spektrális paraméterei alapján ($\lambda^{\text{d-d}}_{\text{max}} = 525 \text{ nm}$, $g_{\text{zz}} = 2,188$, $A_{\text{zz}} = 193 \text{ G}$) a ligandumtér jelentős növekedésére tudunk következtetni, ami feltehetően egy harmadik amidnitrogén koordinációjával (és az egyik imidazolgyűrű kiszorulásával) magyarázható.

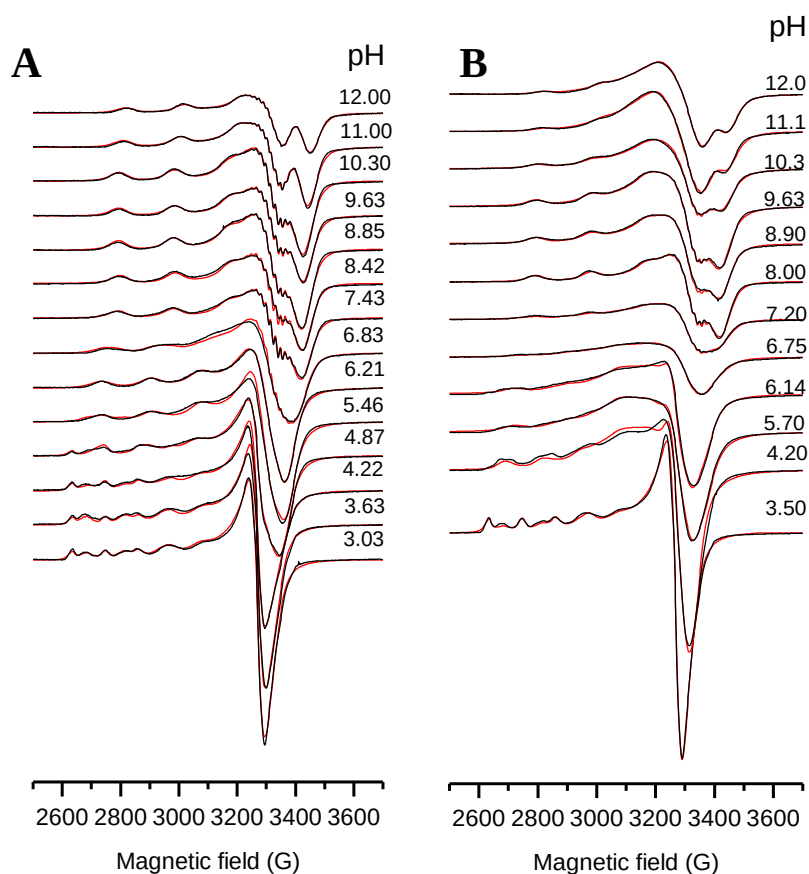


23. A-B. ábra: Az L^1 -Cu(II) 1:1 arányú rendszerében található főbb részecskék számolt egyedi moláris UV-Vis (A) és CD (B) spektrumai.

5. táblázat: Az L^1 -Cu(II) 1:1 arányú rendszerében mért főbb részecskék egyedi moláris spektrumainak λ^{d-d}_{max} értékei (mért és számolt [29]).

$Cu_pH_qL^1_r$	mért λ^{d-d}_{max} (nm)	számolt λ^{d-d}_{max} (nm)
$CuHL \{2N_{im}\}$	725	685
$CuL \{3N_{im}\}$	635	625
$CuH_{-1}L \{2N_{im}, N^-\}$	595	602
$CuH_{-2}L \{2N_{im}, 2N^-\}$	545	537
$CuH_{-3}L \{N_{im}, 3N^-\}$	525	521

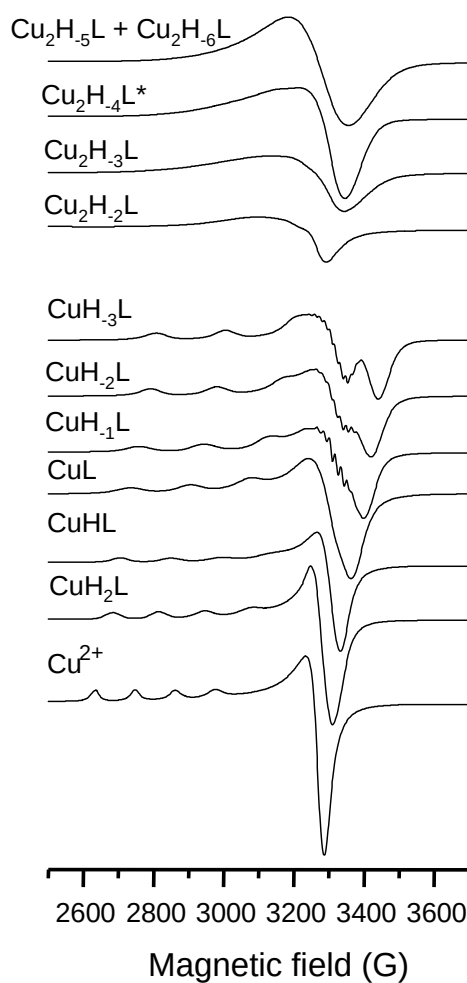
Oldategyensúlyi, UV-Vis és CD méréseinkkel párhuzamosan az L^1 -Cu(II) 1:1 és 1:2 rendszerre vonatkozó ESR mérések is készültek. A felvett pH-függő spektrumokat a 24. A-B. ábra, az azok kiértékelésével nyert ESR paramétereket és feltételezett koordinációs módokat a 6. táblázat, a számolt egyedi spektrumokat a 25. ábra mutatja be. Az ezekből levonható következtetések jó egyezést mutatnak az UV-Vis és CD vizsgálatok eredményeivel.



24. A-B. ábra: Kísérleti (fekete) és számított (piros) ESR spektrumok különböző pH-kon az L^1 -Cu(II) 1:1 (A) és 1:1,8 (B) rendszerében.

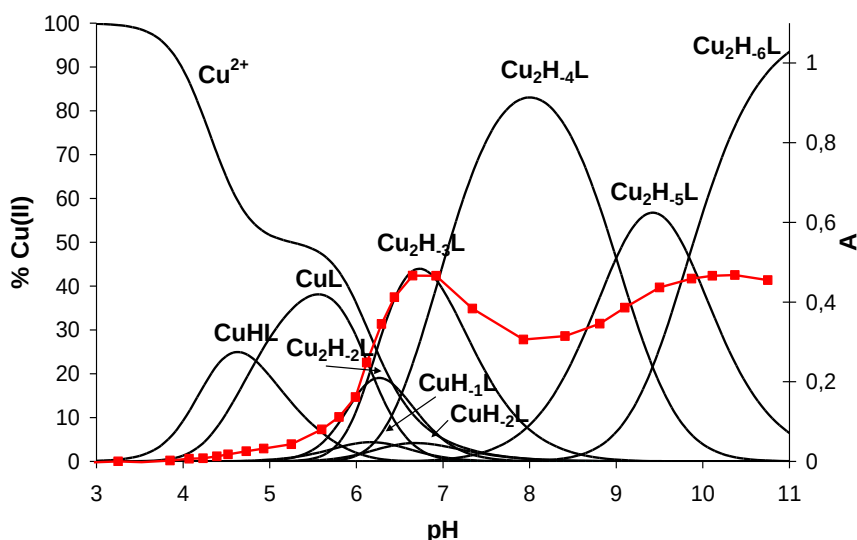
6. táblázat: Az L^1 -Cu(II) rendszerben mért komponensek ESR paraméterei ($Cu_2H_4L^*$ a megfelelő összetételű komplex kölcsönható fémcentrumokat tartalmazó izomerje).

$Cu_pH_qL^1_r$	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx}/G	A_{yy}/G	A_{zz}/G	Koordináció
Cu^{2+}	2,082	2,082	2,425	8,3	8,3	111,5	
CuHL	2,062	2,062	2,330	10,0	10,0	140,0	$\{2N_{im}\}$
CuL	2,058	2,058	2,274	23,8	23,8	165,2	$\{3N_{im}\}$
$CuH_{-1}L$	2,051	2,051	2,240	32,0	32,0	180,0	$\{2N_{im}, N^-\}$
$CuH_{-2}L$	2,036	2,044	2,209	15,4	33,2	184,5	$\{N_{im}, N^-, N^-, N_{im}\}$
$CuH_{-3}L$	2,031	2,046	2,188	20,1	35,2	192,8	$\{N_{im}, N^-, N^-, N^-\}$
$Cu_2H_{-2}L$	2,135			55,6			
$Cu_2H_{-3}L$	2,128			70,0			
$Cu_2H_{-4}L^*$	2,117			63,5			
$Cu_2H_{-5}L + Cu_2H_{-6}L$	2,102			47,3			



25. ábra: Az L^1 -Cu(II) rendszerben mért részecskék számított egyedi ESR spektrumai.

Potenciometriás és spektrofotometriás méréseink során az általunk vizsgált pH-tartományban az L^1 -Cu(II) 1:2 arányú rendszere mindvégig oldatban maradt, csapadék nem képződött, ami kétmagvú komplexek képződésére utal. Ezen részecskék kis mennyiségben már az 1:1-es ligandum-fém aránynál is képződnek (22. ábra), de csak 1:2 aránynál váltak dominánssá (26. ábra).

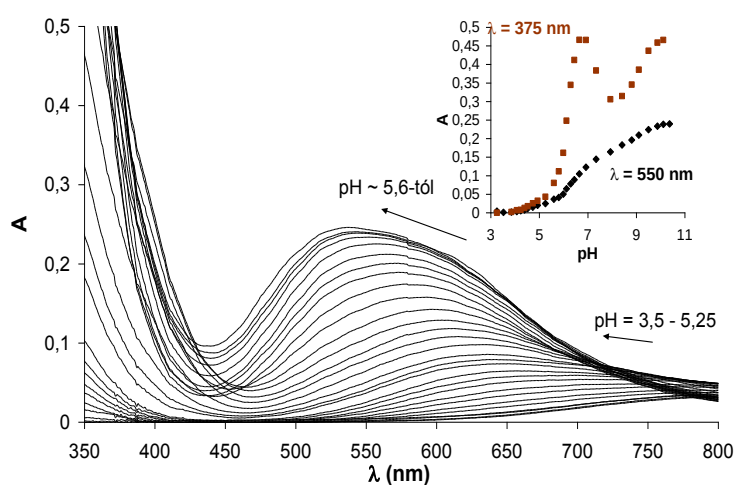


26. ábra: Az L^1 -Cu(II) 1:2 arányú rendszerében számolt eloszlásgörbék ($c_{\text{lig}} = 1 \times 10^{-3}$ M, $c_{\text{Cu(II)}} = 2 \times 10^{-3}$ M, $I = 0,1$ M, $T = 25$ °C), és a 375 nm-en mért UV-Vis abszorbancia a pH függvényében.

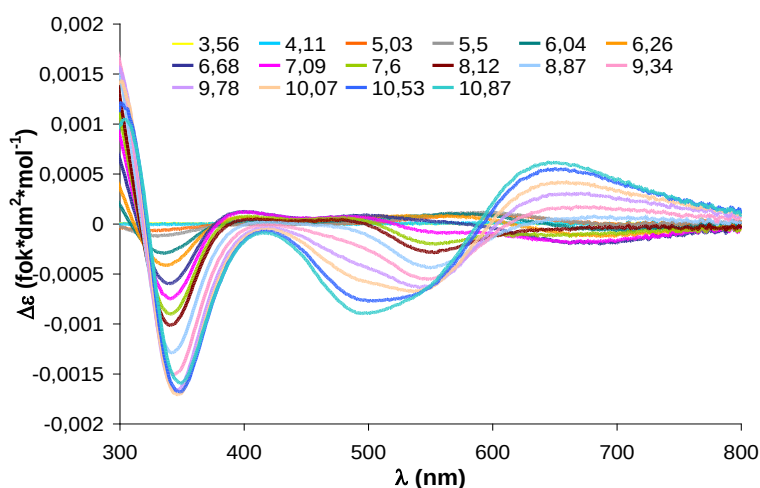
A potenciometriás titrálások mellett, pH-függő UV-Vis (27. ábra), CD (28. ábra) és ESR vizsgálatokat is (24. B. ábra) végeztünk kb. kétszeres fémionfelesleg jelenlétében. Ahogy a megfelelő titrálási görbén is látható (19. ábra), pH ~ 5-ig fémionfelesleg esetén is csak egymagvú komplexek képződnek, az 1:1 arányú rendszernek megfelelően. Az első kimutatható kétmagvú részecske a $Cu_2H_2L^1$, mely pH 6 és 7 között képződik kis mennyiségben. Mivel kialakulása jelentősen átfed a következő $Cu_2H_3L^1$ komplexével, spektroszkópiai paraméterei bizonytalanok, azokból nem vontunk le következtetéseket. Az első nagyobb koncentrációban megjelenő kétmagvú részecske a $Cu_2H_3L^1$ komplex. Kialakulásával párhuzamosan az UV-Vis spektrumon egy töltésátviteli sáv jelenik meg 375 nm-es maximummal (26. ábra és 27. ábra inzertje), ami sem a réz-imidazol, sem a réz-amid koordinációhoz nem rendelhető. Az irodalmi adatok alapján ez leginkább egy μ -hidroxovagy μ -alkoxohidas koordináció töltésátviteli sávjához tartozhat [30]. Ezt alátámasztani látszik az ESR spektrumokon pH ~ 6-7 között megfigyelhető szignifikáns intenzitáscsökkenés is (24. B. ábra), ami erőteljes antiferromágneses kölcsönhatásra utal a két réz(II)centrum között, melyet az ilyen egyatomos μ -hidroxovagy μ -alkoxohidak hatékonyan képesek

közvetíteni. Az ESR spektrumok intenzitása a $\text{Cu}_2\text{H}_3\text{L}^1$ részecske továbbalakulásával ismét nőni kezd, bár az eredeti intenzitást a legmagasabb pH-kon sem éri el. Eszerint a két réz(II) centrum kölcsönhatásban marad, de az erős közvetítő hatású hidroxo-/alkoxohíd ezen részecske deprotonálódásával megszűnik.

A fémfelesleg mellett vizsgált rendszerekre vonatkozó titrálási görbe azt mutatja (19. ábra), hogy pH ~ 7 értékig négy „extra” deprotonálódás játszódik le a kétmagvú komplexek képződésétől kezdődően, ezért kétségtelenül már a $\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}^1$ és $\text{Cu}_2\text{H}_3\text{L}^1$ részecskék is tartalmaznak amidnitrogént koordinációs szférájukban. Ezek a protonvesztési folyamatok azonban annyira átfednek egymással, hogy koordinációs elrendezésüket és szerkezetüket illetően nem tudunk megbízható következtetéseket levonni.

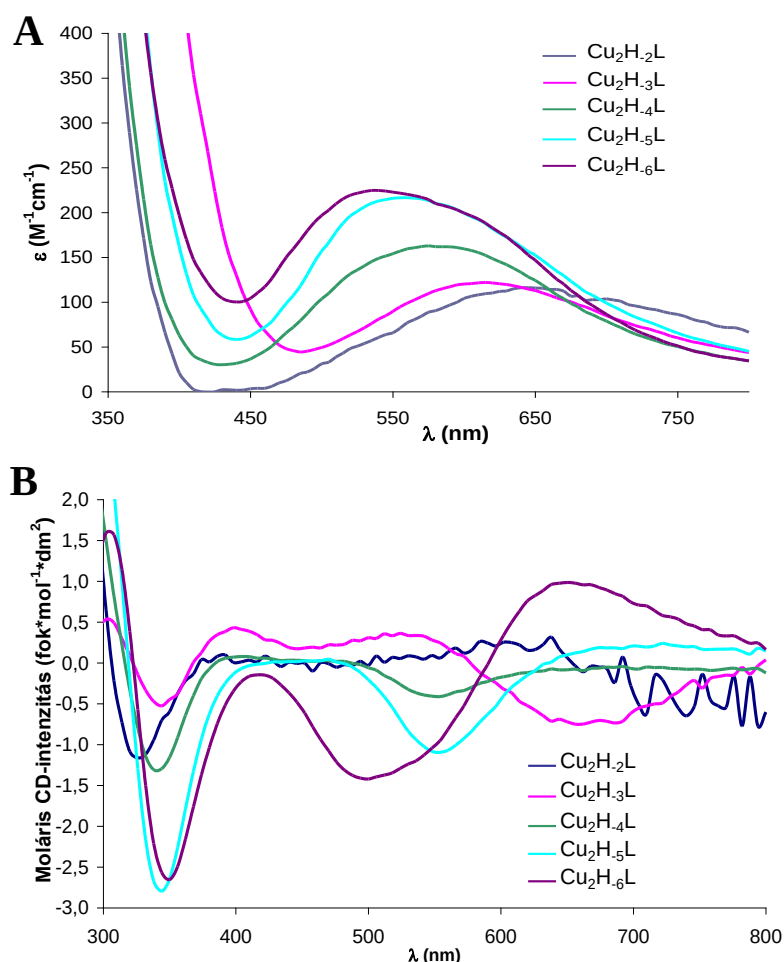


27. ábra: Az L^1 -Cu(II) 1:2 arányú rendszer UV-Vis spektrumai különböző pH-kon, valamint a 550 és 375 nm-en mért abszorbancia pH-függése.



28. ábra: Az L^1 -Cu(II) 1:2 arányú rendszerének CD spektrumai különböző pH-kon ($c_{\text{lig}} = 8 \times 10^{-4}$ M; $c_{\text{Cu(II)}} = 1,5 \times 10^{-4}$ M, $I = 0,1$ M, $T = 25$ °C).

A $\text{Cu}_2\text{H}_4\text{L}^1$ részecske a $\text{pH} \sim 7-9$ tartományban domináns, s így a kétmagvú komplexek között kiemelkedő stabilitással bír. Az $\text{L}^1\text{-Cu(II)}$ 1:1 arányú rendszerben kapott eredményeket is figyelembe véve, ebben a komplexben az egyik fémion esetében a kiemelkedő stabilitást eredményező $\{\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}\}$ típusú koordináció feltételezhető, míg a másik réz(II) környezetében valószínűleg $\{\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-\}$ valósul meg, így eredményezve a négyszeres „extra” deprotonáltsági állapotot. Ezt erősíti meg az is, hogy az ESR eredmények alapján a kétmagvú komplex spektruma jórészt leírható az egymagvú CuH_2L^1 részecske paramétereivel (lásd később). A $\text{Cu}_2\text{H}_5\text{L}^1$ képződése során a CD spektrumsorozaton a már meglévő réz(II)-amidnitrogén kölcsönhatásra jellemző sávok intenzitása erősödik meg (560 nm körüli CD sáv, 28. ábra), tehát itt egy újabb amidnitrogén lép be a koordinációs szférába, feltehetően a második, $\{\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-\}$ koordinációjú réz alakul $\{\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-\}$ környezetű komplexszé. A $\text{pH} \sim 10$ után dominánssá váló $\text{Cu}_2\text{H}_6\text{L}^1$ képződésével a CD spektrumon egy erőteljes, ún. couplet-sáv jelenik meg, mely – bár átfed a $\text{Cu}_2\text{H}_5\text{L}^1$ -hez rendelhető sávval – jól azonosítható az egyedi moláris CD spektrumok alapján (29. B. ábra).



29. A-B. ábra: Az L^1 - Cu(II) 1:2 arányú rendszerekben található főbb részecskék számolt egyedi moláris UV-Vis (A) és CD (B) spektrumai.

Ehhez hasonló mélyre ható változások következtek be az L^1 -Cu(II) 1:1 aránynál mért CD spektrum esetén is az utolsó deprotonálódás során (CuH_3L^1 képződése, 21. ábra), ráadásul ezen két deprotonálódást jellemző pK érték igen hasonló ($pK_{Cu_2H_5L} = 9,60$ és $pK_{CuH_2L} = 9,85$). Mindez alátámasztja azt, hogy ezen kétmagvú $Cu_2H_5L^1$ komplex deprotonálódása során a kedvező $\{N_{im}, N^-, N^-, N_{im}\}$ elrendeződésű réz(II)centrum egyik imidazolnitrogénje cserélődik amidnitrogénre a CuH_3L^1 komplexnél már említett szerkezeti változáshoz hasonló átrendeződés kíséretében.

A fémion feleslegében felvett ESR spektrumok az egymagvú komplexekre már meghatározott egyedi spektrumok mellett antiferromágneses kölcsönhatásra utaló izotróp komponensek figyelembevételével kerültek értékelésre. Ezen izotróp komponensek spektrumai (25. ábra) jó egyezéssel hozzárendelhetők a képződő kétmagvú komplexekhez. A $Cu_2H_4L^1$ részecske esetén szerkezeti izomerek jelenlétét kell feltételeznünk: a spektrumon és a 6. táblázatban csillaggal jelölt $Cu_2H_4L^*$ részecske a komplex azon izomerjét jelöli, melyben a két réz(II)ion antiferromágneses kölcsönhatásban áll egymással. A másik izomer izolált réz(II)centrumokat tartalmaz és spektruma jó közelítéssel leírható a CuH_2L^1 részecske egyedi spektrumával. Az ESR mérések kiértékelése arra utal, hogy a pH 8-9 felett képződő kétmagvú komplexek azonos (nagyon hasonló) ESR paraméterekkel rendelkeznek. A spektrumok hasonlóságából hasonló szerkezetre következtethetünk, ami ellentmondani látszik az UV-Vis és CD eredményeknek, melyek a $Cu_2H_5L^1 = Cu_2H_6L^1 + H^+$ átalakulás során egy hatodik amidnitrogén deprotonálódását és – főleg a CD spektrumok – jelentős szerkezeti átrendeződést mutatnak. Azonban az ESR méréseket 77 K-en végeztük, így az oldat fagyási hőmérsékletén (263-243 K) fennálló egyensúlyi viszonyok eltérhetnek a 298 K-en meghatározottaktól, s ez jelentősen befolyásolhatja a $Cu_2H_6L^1$ részecske eloszlásgörbáját. Ezért ebben az esetben a 298 K-en felvett UV-Vis és CD méréseink alapján levont következtetéseinket tartjuk meghatározónak.

5. Összefoglalás

Tudományos diákköri munkám kapcsán oldategyensúlyi és szerkezetvizsgálati méréseket végeztünk két terminális végein védett, a humán ZnT3 fehérje MBS1 fémkötő szakaszára vonatkozó peptiddel. Különböző ligandum-fém arányoknál vizsgáltuk a peptidek kölcsönhatását Zn^{2+} és Ni^{2+} ionokkal, valamint az L^1 jelű ligandum esetén Cu^{2+} ionokkal is. Felderítettük az Ac-RHQAGPPHSR-NH₂ szekvenciájú L^1 ligandum oldategyensúlyi viszonyait és jellemeztük a képződő komplexek stabilitását a fent említett fémionok

jelenlétében. Hasonló méréseket végeztünk a ciklikus L^2 peptid esetén $c(\text{Ac-CKLHQAGPPHSHGSRGA EYAPLEEGPEEK-NH}_2)$, majd összevetettük a kapott adatokat. Ezek alapján levontuk következtetéseinket a fémkötő hely szerkezetének a koordinációra gyakorolt hatására vonatkozóan. Végül össze kívántuk hasonlítani az MBS1 fragmens fémkötő sajátságait a humán ZnT3 másik két kötőhelyét modellező, korábban tanulmányozott peptidek (Ac-PFHHCHRD-NH_2 – MBS3, $\text{Ac-KAHEFGHSLGLDHSK-NH}_2$ – MBS2) eredményeivel.

Mérési eredményeink alapján elmondható, hogy semleges pH-n mindkét peptid- Zn^{2+} rendszer esetében a 3 His-oldallánc által koordinált komplex a domináns: L^1 esetén ez a ZnL összetételű, $\log K = 4,48$ stabilitási állandóval jellemezhető részecske. Ehhez nagyon hasonló a már korábban vizsgált $\text{Ac-KAHEFGHSLGLDHSK-NH}_2$ szekvenciájú peptid megfelelő ZnH_2L komplexének értéke ($\log K = 4,47$), mindkettő meglehetősen kis cink-affinitást jelez a ligandumra nézve. Az L^2 ligandum $\{3N_{im}\}$ koordinációjú domináns komplexe a ZnH_3L , ($\log K = 5,93$), kissé megnövekedett stabilitással rendelkezik a kisebb fragmenshez képest, amit vagy a gyűrű preorganizált szerkezete, vagy kiegészítő O-donorcsoport(ok) koordinációja eredményez (pl. amid-O). Ez a másfél nagyságrendbeli stabilitásnövekedés jelentős, ám a fehérje harmadik, MBS3 kötőhelyet modellező Ac-PFHHCHRD-NH_2 peptid semleges pH-n képződő ZnL komplexének megfelelő értékétől még így is messze elmarad ($\log K = 8,50$). Ráadásul ez utóbbi (MBS3) kötőhely a cink-nikkel összehasonlításban cinkre szelektívnek bizonyult, hisz míg az MBS1 és MBS2 kötőhelyet modellező peptidek kb. azonos stabilitású komplexeket képeztek cinkkel és nikkellel a semleges pH-tartományban, addig az MBS3 ZnL komplexe két nagyságrenddel stabilabb, mint a NiL . Hasonló mondható el a cink-réz összehasonlításban is. Bár az MBS3 peptid redoxireakciót ad a réz(II)ionnal, MBS1 és MBS2 peptidek CuL komplexei kisebb stabilitásúak ($\log K \sim 7,7 - 7,8$), mint az MBS3 ZnL komplexe. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a ZnT3 fehérje elsődleges fémkötő helye nem a széles körben feltételezett His-gazdag hurok (MBS1), hanem a fehérje –PFHHCHRD– szekvenciával rendelkező N-terminális része (MBS3) lehet. Mindazonáltal, MBS1 és MBS2 fragmensek szerepet játszhatnak a ZnT3 működési mechanizmusában – például cink-szenzorként – de az elsődleges cink(II)-megkötő funkció (az irodalmi hivatkozásokkal szemben) feltehetően az MBS3 fémkötő szekvenciához köthető.

6. Irodalomjegyzék

- [1] R.J. Cousins, J.P. Liuzzi, L.A. Lichten, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 24085–24089.
- [2] C. J. Frederickson, D. D. Moncrieff, *Biol. Signals*, **1994**, 3, 127–139.
- [3] A. Gaither, D. J. Eide, *BioMetals*, **2001**, 14, 251–270,
- [4] T. Kambea, Y.Yamaguchi-Iwai, R. Sasakib, M. Nagaoa, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, 61, 49–68.
- [5] R.A. Colvin, C.P. Fontaine, M. Laskowski, D. Thomas, *Eur. J. Pharmacology*, **2003**, 479, 171- 185.
- [6] J. Lee, T. B. Cole, R. D. Palmiter, J. Koh, *J. Neurosci.* **2004**, 24(13), 3453–3459.
- [7] P. A. Adlard, J. M. Parncutt, D. I. Finkelstein, A. I. Bush, *J. Neurosci.*, **2010**, 30(5), 1631–1636.
- [8] <http://expasy.org/sprot/>
- [9] A. Kolozsi, A. Jancsó, N.V. Nagy, T. Gajda, *J. Inorg. Biochem.* **2009**, 103, 940-947.
- [10] Paksi Z., Jancso A., Pacello F., Nagy N., Battistoni A., Gajda T., *J. Inorg. Biochem.* **2008**, 102, 1700-1710.
- [11] I. Sóvágó, K. Ösz, *Dalton Trans.*, **2006**, 3841–3854.
- [12] Cs. Kállay, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, *Inorg. Chim. Acta*, **2009**, 362, 935-945.
- [13] S. A. Daignault, A.P. Arnold, A.A. Isab, D.L. Rabenstein, *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 3984-3988.
- [14] Cs. Kállay, K. Ösz, A. Dávid, Z. Valastyán, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, I. Sóvágó, *Dalton Trans.* **2007**, 4040–4047.
- [15] Kinga Kulon, Daniela Valensin, Wojciech Kamysz, Rafał Nadolny, Elena Gaggelli, Gianni Valensin, Henryk Kozłowski, *Dalton Trans.*, **2008**, 5323–5330.
- [16] P. Gockel, R. Vogler, M. Gelinsky, A. Meißner, H. Albrich, H. Vahrenkamp, *Inorganica Chimica Acta*, **2001**, 323, 16–22.
- [17] J. Brasun, C. Gabbiani, M. Ginanneschi, L. Messori, M. Orfei, J. Swiatek-Kozłowska, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 2016–2021.
- [18] J. Brasun, A. Matera-Witkiewicz, E. Kamysz, W. Kamysz, S. Ołdziej, *Polyhedron*, **2010**, 29, 1535-1542.
- [19] F. J. C. Rosotti, H. Rosotti, *The determination of stability constants*, McGraw-Hill Book Co., New York, **1962**, 149.

- [20] E. Högfeldt, *Stability Constants of Metal-Ion Complexes*, Part A. Inorganic Ligands, Pergamon, New York, **1982**, 32.
- [21] L. Zékány, I. Nagypál, G. Peintler, *PSEQUAD for chemical equilibria*, Technical Software Distributors: Baltimore, MD, **1991**.
- [22] Gyurcsik B., Tóth E: Hisztidintartalmú peptidek és fémkomplexeik a mikroállandók tükrében, *1. Nemzeti konferencia*, Sopron 2011. május 22-25. – poszter
- [23] N. I. Jakab, A. Jancsó, T. Gajda, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, *102*, 1438-1448.
- [24] I. N. Jakab, O. Lőrincz, A. Jancsó, Tamás Gajda, B. Gyurcsik, *Dalton Trans.*, **2008**, 6987-6995.
- [25] A. Jancsó, A. Kolozsi, B. Gyurcsik, N.V. Nagy, T. Gajda, *J. Inorg. Biochem.*, **2009**, *103*, 1634–1643.
- [26] M. A. Zoroddu, M. Peana, T. Kowalik-Jankowska, H. Kozłowski, M. Costa, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, *98*, 931-939.
- [27] T. Gajda, B. Henry, A. Aubry, J.-J. Delpuech, *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 586-593.
- [28] A. Jancsó, Z. Paksi, N. Jakab, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, T. Gajda, *Dalton Trans.*, **2005**, 3187-3194.
- [29] E. Prenesti, P.G. Daniele, M. Prencipe, G. Ostacoli, *Polyhedron*, **1999**, *18*, 3233–3241.
- [30] M. Handa, T. Idehara, K. Nakano, K. Kasuga, M. Mikuriya, N. Matsumoto, M. Kodera and S. Kida, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1992**, *65*, 3241.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Kiss Tamás tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette, hogy tudományos diákköri munkámat a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken elkészítsem.

Köszönetem szeretném kifejezni Dr. Gajda Tamás egyetemi tanárnak, aki témavezetőmként felügyelte, iránymutatásaival segítette munkámat, kérdéseimet készséggel megválaszolta.

Köszönettel tartozom Árus Dávid PhD hallgatónak, aki a mérések kivitelezésében mindvégig segítségemre volt, az eredmények kiértékelési módjaival megismertetett, munkámban állandó támogatást nyújtott.

Valamint köszönetet mondok Szűcsné Tóth Katalin vegyésztechnikusnak, akihez méréseim során tanácsért mindig fordulhattam.