

**ASZPARAGINSAVAT ÉS HISZTIDINT EGYARÁNT
TARTALMAZÓ HEXAPEPTID
ÁTMENETIFÉM-KOMPLEXEI**
TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Raics Mária

I. Vegyész MSc

Témavezető: dr. Kállay Csilla

tudományos főmunkatárs

Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar,
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
Debrecen, 2012.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi előzmények.....	5
2.1. A vizsgált fémionok biológiai jelentősége	5
2.2. A vizsgált fémionok koordinációs kémiája	6
2.3. A peptidek koordinációs kémiája	8
2.3.1. Hisztidintartalmú peptidek koordinációs kémiája	11
2.3.2. Aszparaginsavat tartalmazó peptidek koordinációs kémiája.....	15
3. Kísérleti körülmények és vizsgálati módszerek	17
3.1. pH-potenciometria.....	17
3.2. UV-Vis spektrofotometria.....	18
3.3. CD-spektroszkópia	20
3.4. Felhasznált vegyszerek.....	20
3.4.1. Szilárd fázisú peptidszintézis	21
4. Kísérleti eredmények és értékelésük.....	22
4.1. A ligandum sav-bázis tulajdonságai.....	24
4.2. A ligandum Cu(II)-komplexei.....	24
4.3. A ligandum Ni(II)-komplexei.....	33
4.4. A ligandum Zn(II)-komplexei	37
5. Összefoglalás	39
6. Irodalomjegyzék	41

A dolgozatban előforduló rövidítések és magyarázatuk

A vagy Ala	alanin
Ac	acetyl (védőcsoport)
D vagy Asp	aszparaginsav
DIPEA	N,N-diizopropil-etilamin
DMF	dimetil-formamid
DODT	2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol
Fmoc	9-fluorenil-metiloxi-karbonil (védőcsoport)
G vagy Gly	glicin
H vagy His	hisztidin
HOBt	N-hidroxi-benzotiazol
Im(N)	imidazolnitrogén
K vagy Lys	lizin
M vagy Met	metionin
N ⁻	deprotonált amidnitrogén
N vagy Asn	aszparagin
NMP	N-metil-pirrolidin
Q vagy Gln	glutamin
SPARC	Secreted Protein, Acidic and Rich in Cystein
T vagy Thr	treonin
TBTU	2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium tetrafluoroborát
TFA	trifluorecetsav
TIS	triizopropil-szilán
Trt	trityl (trifenil-metil)
X vagy Xaa	tetszőleges/nem koordinálódó oldalláncot tartalmazó aminosav
Z	benzil-oxi-karbonil (védőcsoport)

1. Bevezetés

Régóta ismert, hogy egyes fémek nélkülözhetetlenek az élő szervezet számára: részt vesznek a szerves molekulák szintézisében, szállításában, valamint katalitikus szerepet játszanak a biológiai rendszerek sav-bázis és redoxi folyamataiban. Más elemek ugyanakkor igen kis koncentrációban is veszélyesnek bizonyultak valamennyi szervezet számára. Ma már tudjuk, hogy a fémionok megkötésében a szerves anyagok közül a fehérjék bírnak kiemelkedő jelentőséggel.

A metalloproteinekben a fémionok – főként a réz, cink, vas és nikkel ionok – megkötésére a peptidlánc oldalláncbeli donorcsoportjai szolgálnak, mint például a hisztidin imidazolnitrogénje vagy az aszparaginsav karboxilátcsoportja. Ezen biológiailag jelentős vegyületek kötőhelyei modellezhetők olyan egyszerűbb rendszerekkel, amelyek központi ionként egy átmenetifém-iont, ligandumként aminosavat, peptidet vagy a fentiek valamilyen származékát tartalmazzák.

A Debreceni Egyetem Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában több évtizede foglalkoznak ilyen jellegű vizsgálatokkal, melyek az utóbbi időben egyes neurodegeneratív betegségek – Alzheimer-, Parkinson-kór vagy prionbetegség – kialakulásához köthető fehérjék fragmenseinek fémionokkal való kölcsönhatására fókuszálnak. A kóros sejtekben ugyanis megnövekedett fémion koncentráció tapasztalható, azonban kérdéses, hogy ez a jelenség az említett fehérjék konformációváltozásának oka vagy következménye.

A hisztidin aminosavak fémmegkötő képessége mindazonáltal jelentősnek bizonyult a fenti esetekben, emellett az aszparaginsavat is kiemelhetjük, mely az Alzheimer-kór kapcsán tanulmányozott amyloid- β egyik fontos donorcsoportja. Az irodalomban már nagyrészt ismert, ezen aminosavak helyzete hogyan befolyásolja a komplexképződést. Ugyanakkor az aszparaginsav és a hisztidin egyidejű jelenléte változatos koordinációs viszonyokat kínálhat az egyes fémionok számára.

Az általunk tanulmányozott AlaAlaAspAlaAlaHis-NH₂ ligandum elkülönült kelátképző csoportokat tartalmaz, így egyrészt lehetőség nyílik a ligandum N-terminális részén az egyszerű peptidekben is megvalósuló (NH₂,CO) koordináció kialakulására, illetve a harmadik helyen található aszparaginsav révén az XXDX tetrapeptideknél előforduló (NH₂,N⁻,N⁻, β -COO⁻) koordinációjú fémkomplexek keletkezése szintén elképzelhető. Mivel a

ligandum C-terminális hisztidint tartalmaz, az imidazolnitrogén kötődését követően az amidnitrogének az N-terminus felé haladva deprotonálódhatnak és koordinálódhatnak.

Ennek tükrében indokolt a ligandum viselkedését többféle, az élő szervezetben jelentős szerepet betöltő fémion jelenlétében is megvizsgálni, és a preferált kötőhelyeket, koordinációs módokat elkülöníteni.

2. Irodalmi előzmények

2.1. A vizsgált fémionok biológiai jelentősége [1,2]

A réz a harmadik legfontosabb nyomelem a vas és a cink után, nyomnyi mennyiségben csaknem az összes élő szervezet számára nélkülözhetetlen redoxi folyamatokat katalizáló, oxigénszállító- és tároló, elektrontranszfer, oxidáz és reduktáz funkciója révén [3,4,5]. Egy ember szervezetében mintegy 100 mg réz található, leggyakrabban rézproteinek formájában. Ezen fehérjék hatásmechanizmusuk alapján három fő típusba sorolhatók [6]: a kék-réz-proteinekben (I. típus) egyetlen rézion körül egy erősen torzult (2N, 2S) típusú koordináció alakul ki, mely átmenetet jelent a Cu(II)-re jellemző tetragonálisan torzult oktaéderes (4N), illetve a Cu(I) tetraéderes (4S) koordinációja között. Ennek megfelelően a fémion igen hajlamos redoxi átalakulásokra, ami főként a növényi fotoszintézis során betöltött elektronszállító funkcióban (pl. plasztocianin) nyilvánul meg. A típus intenzív kék színe a 600 nm körüli Cu-S töltésátviteli sávól származik.

A II. típus, vagyis a nemkék-rézproteinek esetében (pl. Cu, Zn-szuperoxid-diszmutáz) a szabályos monomer Cu(II)-komplexeznél előforduló, közel síknégyszetes koordináció alakul ki, emellett gyenge axiális kölcsönhatások is jelentkeznek.

A III. típusba az ESR-inaktív rézproteinek tartoznak. Egyik altípusukban két, a fehérjékhez hisztidin oldalláncokon keresztül kapcsolódó Cu(I)-ion helyezkedik el egymástól 360 pm távolságra, ami oxigénmolekula szállítását és aktiválását teszi lehetővé (pl. hemocianin). A másik altípus esetében egymáshoz közel helyezkedik el két Cu(II)-ion, mely elrendeződés megtalálható pl. a lakkáz vagy ceruloplazmin szerkezetében.

Bizonyos rézkomplexek a gyógyászatban kapnak szerepet, DNS-szintézist gátló, ezáltal rákellenes, vagy a sejtöregedésért felelős szuperoxid anion eltávolító hatásuk miatt [7].

A nikkell biológiai szerepe kevésbé ismert; az emberi szervezet átlagosan kb. 7-10 mg mennyiségben tartalmazza. Elsőként a baktériumokban, növényekben, illetve egyes magasabb

rendű élőlényekben előforduló ureáz enzimben mutatták ki, azóta számos enzim nikkeltartalmát azonosították (nikkel-vas hidrogenázok, metil-S-koenzim-M reduktáz, koenzim F_{430} , CO-dehidrogenáz, acetilkoenzim-A szintáz, illetve nemrég a Ni(II)-szuperoxid-dizmutáz esetében). A karbamid hidrolízisét végző ureáz enzim aktív centrumában két – egymáshoz egy aminocsoportján karbamilált lizinen keresztül kapcsolódó – nikkel(II)ion is található [9], amelyekhez két-két imidazolgyűrű és egy-egy vízmolekula koordinálódik [2]. Kén donoratomokra is bőségesen akad példa, így a $CO \rightarrow CO_2$ reverzibilis oxidációját katalizáló CO-dehidrogenáz vagy a CODH/acetilkoenzim-A szintáz enzimek aktív centrumában. Noha többnyire a +2-es oxidációs szám preferált, a szén-dioxid $\rightarrow$ metán reakcióban közreműködő metil-S-koenzim-M reduktáz vagy a koenzim F_{430} esetében a nikkel oxidációs állapota +1.

A cink mint második legfontosabb nyomelem valamennyi élő szervezetben megtalálható [5,10,11]. Az emberi szervezet kb. 2 g cinket tartalmaz, mely enzim formájában csaknem az összes sejtben előfordul. Ezen enzimekben a cink(II)ion a peptidlánchoz a hisztidin, aszparaginsav, glutaminsav vagy cisztein O, N vagy S donoratomjai segítségével kötődik.

A cink a biológiai rendszerekben katalitikus (szénsavanhidráz, karboxi-peptidáz, máj-alkohol dehidrogenáz) és szerkezetalkító funkcióval (pl. alkohol dehidrogenáz, aszpartát-transzkarbamoiláz, Cu, Zn szuperoxid dizmutáz) is rendelkezik. Utóbbi esetben a Zn(II)-ion négy koordinációs helyét az említett donoratomok foglalják el leggyakrabban, az enzim működéséhez szükséges merev elrendeződést hozva ezzel létre. Azokban az enzimekben, amelyekben a cinknek katalitikus szerepe van, a fémionhoz közel tetraéderesen három aminosav – főként a hisztidin – oldallánca mellett víz vagy OH^- ion koordinálódik [12]. Ez a momentum az enzimműködés szempontjából jelentős.

Meg kell még említenünk az ún. "cink ujjakat": ezek olyan, általában $[2N_{Im}, 2S]$ koordinációval jellemezhető cinktartalmú fehérjék, melyek a DNS bázisszekvenciájának felismerésében nélkülözhetetlenek [13].

2.2. A vizsgált fémionok koordinációs kémiája [1,14]

A rézkomplexeiben a fémion oxidációs száma 0 és +4 között változik, zömében a +2-es fordul elő. A d^{10} elektronkonfigurációjú Cu(I)-ion a Cu(II)-ion nagy hidratációs energiája miatt vizes oldatban könnyen diszproporcionálódik, ám kis oldékonyságú

vegyületek formájában vagy π -akceptor ligandumokkal ezen oxidációs állapot is stabilizálható szintelen, diamágneses komplexeket eredményezve. Ligandumszámtól függően lineáris, trigonális planáris vagy tetraéderes geometria alakulhat ki, kelátképzők jelenlétében azonban ez torzulhat.

A d^9 elektronkonfigurációjú Cu(II)-ion koordinációs száma komplexeiben négy, öt vagy hat, síknégyszetes vagy – pl. peptidekkel – tetragonálisan torzult oktaéderes geometria jellemzi (Jahn-Teller hatás). A komplexek kék vagy zöld színűek, egy széles elnyelési sávval, a monomer komplexek 1,75-2,20 BM mágneses momentummal rendelkeznek. A 3d-átmeneti fémeket tekintve a Cu(II)-komplexek termodinamikai stabilitása kiugró, amit az Irving-Williams sor is példáz: $Mn(II) < Fe(II) < Co(II) < Ni(II) < Cu(II) > Zn(II)$ [1,2].

A nikkell oxidációs száma komplexeiben szintén 0-tól +4-ig terjed. Leggyakoribb a +2-es állapot, de a Ni(0) π -akceptor ligandumokkal stabilizálható: ez esetben elsősorban diamágneses, tetraéderes komplexek alakulnak ki, melyek oktaéderes Ni(II)-komplekszé oxidálódhatnak.

A +2-es oxidációs állapotban a nikkell elektronkonfigurációja d^8 . Négyes koordinációs számmal síknégyszetes geometriájú, többnyire diamágneses komplexek keletkeznek, sárga, vörös vagy barna színnel, ritkábban kék vagy zöld színű tetraéderes komplexek, melyek általában paramágneses tulajdonságúak. Bizonyos foszfinszármazékokkal alkotott komplexeknél a síknégyszetes és a tetraéderes forma egyensúlya alakul ki. Ugyancsak egyensúlyi folyamatban bekövetkezhet a síknégyszetes forma (monomer) agglomerizációja, mely paramágneses polimer kialakulásához vezethet.

Ötös koordinációs számmal négyszetes piramisos vagy trigonális bipiramisos Ni(II)-komplexek keletkezhetnek, melyek lehetnek paramágnesesek vagy diamágnesesek. A hatos koordinációs számú komplexek oktaéderesek, melyek könnyen kialakulhatnak N, S vagy O donoratomot tartalmazó ligandumokkal, leggyakrabban a koordinált vízmolekulák helyettesítésével. Oktaéderes komplex keletkezhet síknégyszetes Ni(II)-komplexek koordinálódó oldószerezrel vagy ligandumfelesleggel bekövetkező egyensúlyi reakciójában is.

A cinknek gyakorlatilag csak a +2-es oxidációs állapota létezik, főként oktaéderes és tetraéderes komplexeket képez.

Vizes oldatában valószínűleg leggyakrabban $[Zn(H_2O)_6]^{2+}$ akvakomplex formájában fordul elő, ám számottevő hidrolízise során $[Zn(OH)(H_2O)_x]^+$ és $[Zn_2(OH)(H_2O)_x]^{3+}$ hidroxokomplexei keletkeznek, illetve bázikus (vagy hidroxó) sóként kiválhat az oldatból. A pH növelésével $[Zn(OH)_4]^{2-}$ komplex képződése mellett az említett csapadék feloldódhat.

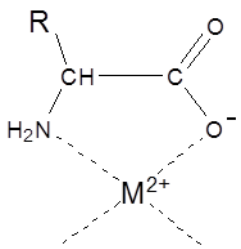
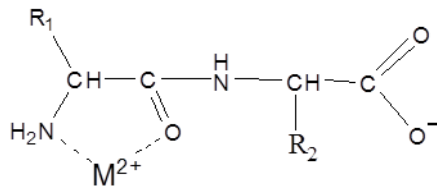
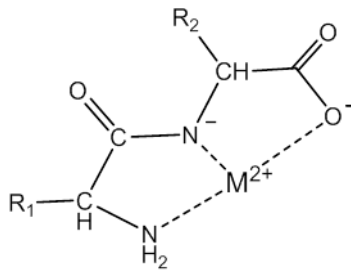
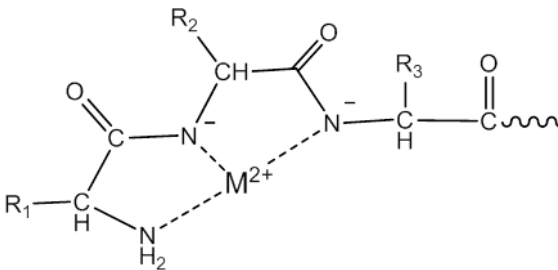
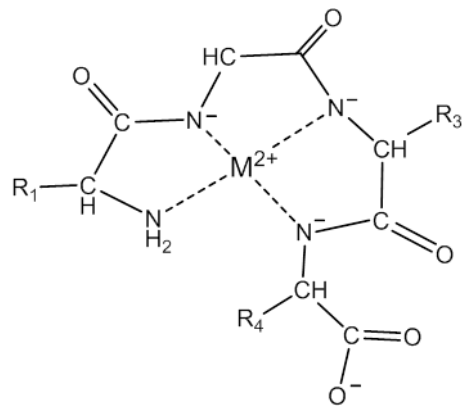
A leginkább előforduló tetraédes komplexek számos O-donor ligandummal kialakulhatnak, ám N-donorokkal (pl. ammónia, aminok) stabilabb komplexek képződnek. Nagyobb koordinációs számú komplexek sokszor a tetraédes formával vannak egyensúlyban. 5-ös koordináció esetén torzult trigonális bipiramisos vagy közelítőleg négyzetes piramisos geometria is kialakulhat. A hatnál nagyobb koordinációs szám-értékek ritkák.

2.3. A peptidek koordinációs kémiája [15,16]

Az egyszerű aminosavak amino- és/vagy karboxilátcsoportjukkal is koordinálódhatnak a fémionhoz. A legtöbb átmenetifémion ML komplexe esetén a bidentát kötődés figyelhető meg. Lehetőség van arra is, hogy ugyanezzel a koordinációval kettő, illetve három aminosav kötődjön a fémionhoz, ML_2 és ML_3 összetételű komplexet alakítva ki.

Amíg az aminosavak esetén lehetőség van arra, hogy az amino-és karboxilátcsoport ugyanahhoz a fémionhoz koordinálódjon, öttagú kelátgyűrűt alkotva (*1.a ábra*), ML összetételű fém-peptid komplex esetén a fémionhoz a peptid aminocsoportja és a karbonilcsoport kapcsolódik, a láncvégi karboxilátcsoport pedig nem vesz részt a koordinációban (*1.b ábra*). Az aminocsoporttal az amidnitrogén is kelátképző helyzetben van. A koordináció létrejöttéhez azonban az amidnitrogén deprotonálódása szükséges. Ez szabad ligandum esetében $pH = 14$ felett játszódik le, ugyanakkor számos fémion (Pd(II)-, Cu(II)-, Ni(II)-ionok) is elősegítheti a deprotonálódást és az amidnitrogén koordinációját. Így ha a peptid egyik amidnitrogénje deprotonálódik, MLH_{-1} összetételű komplexek keletkeznek.

Dipeptidek esetében a fémionhoz az aminocsoport nitrogénje, az amidcsoport nitrogénje és a közel eső láncvégi karboxilátcsoport oxigénje is koordinálódhat, kettős kelátgyűrűt alakítva ki (*1.c ábra*). Tri- és tetrapeptidekben két, illetve három amidnitrogén deprotonálódhat, így fémionokhoz kötődve MLH_{-2} (*1.d ábra*) és MLH_{-3} (*1.e ábra*) összetételű komplexek képződnek.

 1. a Aminosavaknál kialakuló (NH₂, COO⁻) koordináció (ML összetétel)	 1. b Peptiddel kialakuló (NH₂, CO) koordináció (ML összetétel)	 1. c Dipeptiddel képződő (NH₂, N⁻, COO⁻) koordináció (MLH₁ komplexben)
 1. d Peptidekkel képződő (NH₂, N⁻, N⁻) koordináció (MLH₂ összetétel)	 1. e Tetrapeptiddel kialakuló (NH₂, N⁻, N⁻, N⁻) koordináció (MLH₃ összetétel)	

1. ábra Aminosavval (a) és peptidekkel (b-e) kialakuló komplexek lehetséges szerkezete

Cu(II)-peptid komplexek

A Cu(II)-ionok egyszerű peptidekkel általában tetragonális komplexeket képeznek. Diglicinnel savas tartományban CuL és CuLH_{-1} összetételű komplexek keletkeznek, (NH_2, CO) , illetve $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \alpha\text{-COO}^-)$ koordinációval. Utóbbi esetben a fémion egyik koordinációs helye szabadon marad, ami lúgos tartományban változatos összetételű részecskék kialakulását teszi lehetővé [17,18,19]. A $\text{Cu}_2\text{LH}_{-1}$ komplexben a második ligandum az amino- és karbonilcsoporton keresztül axiális-ekvatoriális irányban koordinálódik, azonban a pH 9 körül megkezdődik a CuLH_{-1} komplex hidrolízise: vegyes hidroxokomplexek képződnek, mely a spektrum vörös irányú eltolódását eredményezi. Erősen lúgos tartományban vagy 100-1000-szeres ligandumfelesleg esetén megjelenik a 4N-es koordinációjú $\text{Cu}(\text{LH}_{-1})_2$ komplex is, melyben mindkét ligandum amino- és amidnitrogénje koordinálódik [19,20,21].

A Gly_3 és Gly_4 peptidek [22,23,24] az amidnitrogének egymást követő deprotonálódásával és koordinációjával CuLH_{-1} , CuLH_{-2} és CuLH_{-3} komplexeket képezhetnek. A Gly_3 CuLH_{-2} komplexében az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \alpha\text{-COO}^-)$ koordináció, telítve a fémion koordinációs szféráját, akadályozza a biszkomplexek kialakulását, illetve a hidrolízist pH 11,9 felé tolja el. A Gly_4 peptid CuLH_{-3} összetételű, 4N-es komplexében a Cu(II)-ion koordinációs helyei ugyancsak foglaltak, így a peptidlánc növelésével nem alakul ki újabb Cu(II)- N^- koordináció (ezt bizonyítja a Cu(II): Gly_5 rendszer röntgendiffrakciós vizsgálata [25]). Azonban az oldalláncbeli donorcsoportok nagymértékben befolyásolják a komplexképződést.

Ni(II)-komplexek

Egyszerű tri-és tetrapeptidek esetében savas tartományban (NH_2, CO) koordinációjú Ni(II)-komplexek vannak jelen az oldatban, míg gyengén lúgos tartományban a Ni(II) képes elősegíteni az amidnitrogének egymást követő deprotonálódását és koordinációját [26,27,28,29], 3N-es és 4N-es komplexeket hozva létre. Az 1N-es NiL komplexek általában oktaéderecek, míg a két vagy három deprotonálódott amidnitrogént tartalmazók síknégyszetesecek [27,29,34,35]. Ez kooperatív koordinációt eredményez, így pH 8,5 körül az 1N-es komplexeket felváltják a 3N-es, 4N-es komplexek, míg a NiLH_{-2} komplex nem mutatható ki az oldatban [15,26,32,33].

Ni(II)-ionokkal gyakran képződnek biszligandumú komplexek, melyeket a Ni(II):Gly₂ rendszerben is sikerült kimutatni [26,30,31]. A biszkomplexekben pH 10 körül mindkét ligandum amidnitrogénjei deprotonálódnak, tridentát koordinációt alakítva ki.

A Ni(II) oligoglicin komplexeiben ugyanolyan koordinációs módok valósulnak meg, mint a Cu(II) esetében, kivéve a ligandum axiális koordinációját. Mindemellett a tri- és tetrapeptidek oldategyensúlyi vizsgálata a deprotonált komplexek lassú képződése és – a deprotonált amidnitrogének számával növekvő – inertsége [36] miatt kifejezetten nehézkes.

Zn(II)-komplexek

Egyszerű peptidekkel a Zn(II) pH ~ 5 felett ZnL összetételű komplexeket képez [37], melyekben a kelátgyűrű a terminális aminocsoport és a karbonilcsoport részvételével alakul ki. A pH növelésével az amidnitrogén deprotonálódása nem következik be, mely a cink(II) esetében a kristálytér-stabilizációs energia hiányára és hidroxokomplex-képzési hajlamára vezethető vissza. Ehelyett polimer szerkezetű hidroxohidas komplexek keletkezése feltételezhető, majd Zn(OH)₂ csapadék válik ki az oldatból.

2.3.1. Hisztidintartalmú peptidek koordinációs kémiaja [8,38,39,40]

Hisztidintartalmú peptidek esetében a komplexképződését nagyban befolyásolja a fémion minősége, a hisztidin-oldalláncok száma és pozíciója, a szabad aminocsoport jelenléte, valamint a fémion és a koordinálódó ligandum aránya. Mivel az általam vizsgált ligandum csak egy hisztidint tartalmaz, ebben a részben csak az egy hisztidint tartalmazó peptidek komplexképzését foglalom össze.

N-terminális hisztidint tartalmazó peptidek esetében hisztaminszerű, (NH₂,N(Im)) koordináció alakul ki Cu(II)-, Ni(II)-, vagy Zn(II)-ionokkal (2. a ábra). A stabilis, hattagú kelát képződése a Cu(II)-ionok esetében késlelteti, míg Ni(II)-ionok jelenlétében megakadályozza az amidnitrogének deprotonálódását. (Lúgos pH-n a Zn(II)-ion hidrolízise következik be [41].) Ennek megfelelően a HG, HM [42] és HGG [43] ligandumokkal NiL és NiL₂ komplexek keletkezhetnek, Cu(II) jelenlétében viszont lejátszódik a HG ligandum első amidnitrogénjének deprotonálódása. Az 1:1 arány mellett képződő Cu₂LH₂ dimerben az egyik ligandum (NH₂,N⁻,COO⁻) koordinációja és a másik ligandum imidazolnitrogénjének kötődése telíti a fémion koordinációs szféráját (hosszabb peptideknél a kizárólagos

dimerizáció sztérikusan gátolt [44], ugyanakkor a deprotonált amidnitrogének koordinálódhatnak). A ligandumfelesleg mellett képződő CuL_2 komplexben a ligandumok közötti sztérikus vagy nemkovalens kölcsönhatást mutatták ki a HXX szekvenciájú peptidek vizsgálata során (X: A vagy G) [45].

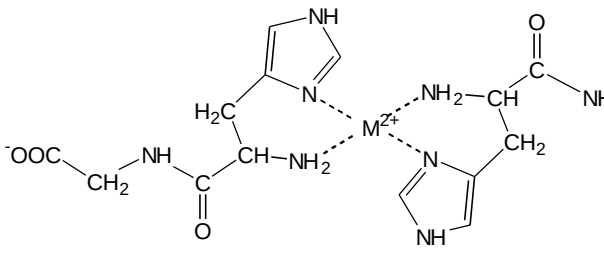
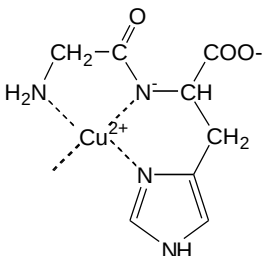
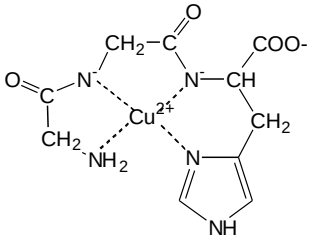
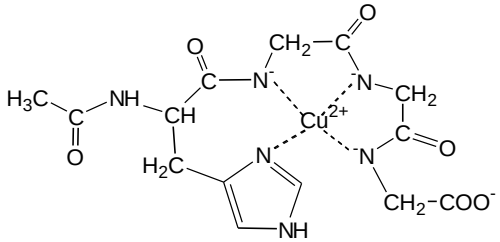
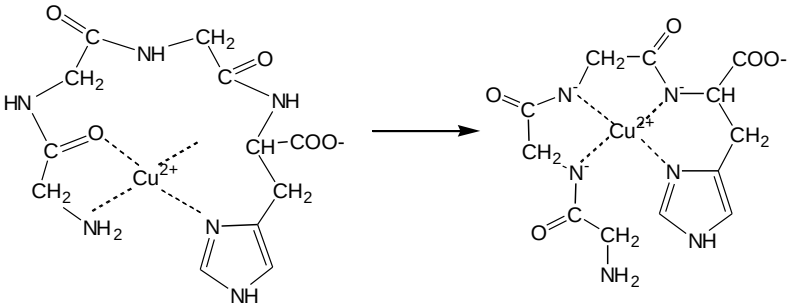
A láncban második helyen hisztidint tartalmazó peptideknél (XH szekvencia) ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})$) koordinációval (5,6) tagú csatolt kelátrendszer alakulhat ki (2.b ábra). A GH [46,47], AH, AHA [48], GHK [49], GHG [47] ligandumok esetében leírt, stabilis $[\text{CuLH}_{-1}]$ komplexben a fémion negyedik koordinációs helyét egy másik ligandum foglalhatja el (amino-, vagy imidazolnitrogénjével kapcsolódva). A Ni(II)-ionok hasonlóan viselkednek, viszont az amidnitrogén deprotonálódása pH~6-7-re tolódik a Cu(II)-ionoknál tapasztalt pH 4-es értékkel szemben. Noha Zn(II)-ionok jelenlétében az amidnitrogének deprotonálódása helyett a fémion hidrolízise megy végbe többnyire, XH szekvenciájú peptideknél az imidazolnitrogén horgonycsoportként képes indukálni az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját a fentivel egyező koordinációs mód kialakításával [52,53,54]. A fémion koordinációs szférája nem telítődik, ami újabb ligandum vagy OH^- belépését teszi lehetővé.

"Albumin modelleknek" nevezzük azon peptideket, amelyekben a hisztidin aminosav a harmadik helyet foglalja el (XXH vagy XXHX szekvencia [50,55,56,57,58]) – a szállítandó Cu(II)-, Ni(II)-ionok megkötésében ugyanis az albumin DAH szegmense vesz részt. (Emellett XXH szekvenciájú peptidek vesznek részt a DNS szekvenciájának felismerésében, specifikus hasításában, illetve megjelennek a SPARC peptidfragmensében.) A GGH Cu(II)- vagy Ni(II)-ionokkal kialakuló MLH_2 komplexe kiugró stabilitással bír, mivel az amidnitrogének kooperatív deprotonálódása során 5,5,6-tagú csatolt kelátrendszer jön létre ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})$) koordinációval (2.c ábra). A Ni(II)-ion esetében az amidnitrogének deprotonálódása nagyobb pH-n játszódik le, illetve megfigyelhető a paramágneses, oktaédes geometriájú komplex diamágneses, síknégyzetes komplexszé történő átalakulása is. Zn(II)-ion és GGH kölcsönhatása során az amino- és imidazolnitrogének koordinációját, illetve a pH emelésével a fémion hidrolízisét figyelték meg [41].

Amennyiben a hisztidin a peptid N-terminusától számított negyedik, vagy annál távolabbi pozícióban található, ML összetételű makrokelátok [59] (2.e ábra), illetve az amidnitrogének lépcsőzetes deprotonálódásával Cu(II)-, vagy Ni(II)-ionok esetén MLH_{-1} , MLH_{-2} és MLH_{-3} komplexek képződhetnek [59,60,61]. Az ML komplex esetén az imidazolnitrogén, a terminális aminocsoport, esetleg az utóbbival kelátképző helyzetben levő

karbonilcsoport koordinálódhat, stabilitása azonban csökken a makrokelát méretének növekedésével. Penta-, hexapeptidek amidnitrogénjeinek deprotonálódása többnyire az N-terminus felől megy végbe, $((\text{NH}_2, 3 \text{ N}^-)$ koordinációval), ennél nagyobb peptideknél a folyamat a C-terminus felől játszódik le $(\text{N}(\text{Im}), 3 \text{ N}^-)$ koordinációt alakítva ki.

Terminális aminosocsoport hiányában az imidazolnitrogén horgonydonorként indukálhatja az amidnitrogének deprotonálódását. A hisztidint különböző helyzetben tartalmazó N-terminálisan védett tetrapeptidek vizsgálatakor azt találták [46,62,63,64], hogy abban a peptidben, mely első helyen tartalmazza a hisztidint, az amidnitrogének rendhagyó módon a C-terminus irányába deprotonálódnak, míg a többiben a szokásos módon az N-terminus felé, csatolt kelátrendszer kialakításával (2.d ábra).

 2.a ($\text{NH}_2, \text{N}(\text{Im})$) (hisztaminszerű) koordináció ($\text{Cu}(\text{II})$ vagy $\text{Ni}(\text{II})$; HG 1:2 rendszer)	 2.b ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})$) koordináció a $\text{Cu}(\text{II})$:GH rendszerben
 2.c ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})$) koordináció CuLH_2 összetételénél ($\text{Cu}(\text{II})$:GGH rendszer)	 2.d Aminoterminusokon védett peptideknél kialakuló ($\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})$) koordináció CuLH_3 összetételénél ($\text{Cu}(\text{II})$:Ac-HGGG rendszer)
 2.e Makrokolát és a lúgos közegben kialakuló ($\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}(\text{Im})$) koordináció CuLH_3 összetételénél ($\text{Cu}(\text{II})$:GGGH rendszerben)	

2. ábra Egy hisztidint tartalmazó peptidek lehetséges fémkomplexeinek szerkezete

2.3.2. Aszparaginsavat tartalmazó peptidek koordinációs kémiája [15]

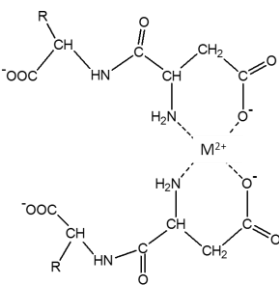
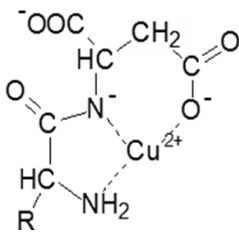
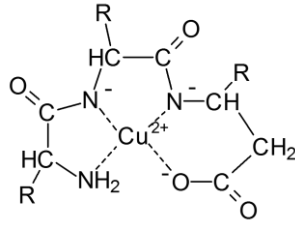
Aszparaginsavtartalmú peptidek esetében az említett aminosav száma és peptidlánc-beli helyzete jelentős hatással van a kialakult komplexek stabilitására.

Az N-terminális aszparaginsavat tartalmazó peptideknél ($\text{NH}_2, \beta\text{-COO}^-$) koordinációval hattagú kelátgyűrű alakulhat ki: savas pH-n az ML és ML_2 komplexek esetében ez az ún. β -alaninszerű koordináció a preferáltabb a dipeptidszerű (NH_2, CO) koordinációhoz képest. A pH emelésével a deprotonálódott amidnitrogének koordinálódhatnak (dipeptidszerű koordináció), de ez a folyamat kissé gátolt a Gly_2 -hez képest [65]. A Ni(II) esetében a pH 7-ig egyeduralgó NiL komplex stabilitása két nagyságrenddel nagyobb az egyszerű peptidek ML komplexeihez képest. Az oligoglicin peptidekkel ellentétben, itt az igen stabilis NiL_2 komplex is megjelenik. (Mindkét komplex oktaéderes geometriájú, ennek megfelelően az ekvatoriális koordinációt kedvelő Cu(II)-ion esetében biszkomplex nem képződik [66].) Így pH 9 felett az amidnitrogének deprotonálódásával kevés NiLH_{-1} részecske keletkezhet, NiLH_{-2} komplex pedig nem alakul ki [67]. Zn(II)-ionok és DXXX szekvenciájú peptidek kölcsönhatása során a ZnL összetételű komplex mellett a koordinálódott vízmolekulák deprotonálódásával képződő ZnLH_{-1} és ZnLH_{-2} vegyes hidroxokomplexek is megjelennek. A kialakuló ($\text{NH}_2, \beta\text{-COO}^-$) koordináció (illetve feltehetőleg az első aminosavrész karbonilcsoportjával való kölcsönhatás) következtében polimer szerkezetű komplexek csupán pH 10 felett jelennek meg, az amidnitrogének deprotonálódása azonban nem megy végbe [67].

Láncközi aszparaginsavat tartalmazó, biológiailag jelentős vegyületeket is modellező tri- tetra- és pentapeptidek vizsgálata során ($\text{N}^-, \beta\text{-COO}^-$) koordinációjú, hattagú kelátgyűrű kialakulását állapították meg. Amennyiben az aszparaginsav a láncban a második helyet foglalja el, elősegítheti az első amidnitrogén deprotonálódását és fémionhoz való koordinálódását, emellett jelentősen akadályozhatja a láncban utána következő amidnitrogén deprotonálódását [68,69,70]. Az így kialakuló MLH_{-1} Cu(II)-ionok esetében egyeduralgó pH 4,5-9,5 tartományban [67,71]. Ni(II)-ionoknál ez a komplex nem mutatható ki, illetve a NiLH_{-2} komplex jelenléte a NiLH_{-3} képződését nagyobb pH-tartományok felé tolja el. Zn(II)-ionok esetében a $\beta\text{-COO}^-$ csoport kisebb mértékű stabilizációja folytán pH 7 körül hidrolitikus folyamatok indulnak meg, az amidnitrogének deprotonálódása nem következik be.

A peptidszekvenciában harmadik helyen álló aszparaginsav jelenléte az amidnitrogének kooperatív deprotonálódását segítheti elő. Cu(II)-ionok jelenlétében sem az $(\text{NH}_2, \text{N}^-)$ koordinációjú 2N komplex, sem az egyszerű peptideknél tárgyalt 4N komplex nem mutatható ki: erősen lúgos tartományban $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \beta\text{-COO}^-)$ koordinációjú CuLH_2 komplex képződik, tri-, tetra- és pentapeptidek esetében is [72,73,74,75]. A stabilis koordináció miatt az aszparaginsavat követő amidnitrogén deprotonálódása nem játszódik le a mérhető pH-tartományban. Ni(II) és XXDX peptidek komplexképződése során 2N komplexek szintén nem mutathatók ki, azonban a 3N-es NiLH_2 komplexből az aszparaginsavat követő amidnitrogén deprotonálódásával a 4N-es NiLH_3 összetételű részecske keletkezik – jöllehet az Ala_4 -hez képest nagyobb pH-n [67,68]. Mindkét komplex síknégyszetes geometriájú. Zn(II)-ionok esetében az amidnitrogének deprotonálódása nem játszódik le, illetve mivel a $\beta\text{-COO}^-$ csoporttal való kölcsönhatás sem elég erős, pH 7 körül megkezdődik a fémion hidrolízise [67].

A C-terminális aszparaginsav $\beta\text{-COO}^-$ csoportja a Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-ionok ML komplexének stabilitását növeli egy egyszerű dipeptidéhez képest. Ennek köszönhetően a Cu(II)- és Ni(II)-ionok esetében az amidnitrogén deprotonálódása és kötődése nagyobb pH-n játszódik le [66,67,71].

 3. a N-terminális aszparaginsavat tartalmazó peptideknél kialakuló biskomplex $2(\text{NH}_2, \beta\text{-COO}^-)$ koordináció (ML_2 összetétel)	 3. b XD szekvenciájú dipeptid Cu(II)-ionokkal képzett, $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \beta\text{-COO}^-)$ koordinációjú komplexe (CuLH_1 összetétel)	 3. c XXD szekvencia esetén megvalósuló $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \beta\text{-COO}^-)$ koordinációjú CuLH_2 összetételű komplex szerkezete
---	--	---

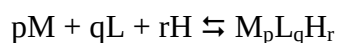
3. ábra Aszparaginsavtartalmú peptidekkel kialakuló komplexek lehetséges szerkezete

3. Kísérleti körülmények és vizsgálati módszerek

3.1. pH-potenciometria

A pH-potenciometria savak, bázisok koncentrációjának meghatározása mellett gyenge elektrolitok savi disszociációs viszonyainak, valamint oldatfázisban lejátszódó – a koordináció során a ligandum protonálódási egyensúlyának megváltozásával járó – komplexképződési folyamatok tanulmányozására is alkalmas. A mérések során a titrált minta pH-ját követjük nyomon az ismert koncentrációjú mérőoldat térfogatának függvényében. (A pH-értékeket a diffúziós potenciál okozta eltérések miatt az Irving-faktorról korrigálhatjuk [76].)

Az alábbi egyenlet alapján felírható általánosan a képződött komplex stabilitási állandója, mely felhasználásával további információkat nyújtó, lépcsőzetes egyensúlyra vonatkozó állandókat képezhetünk.



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

M : fémion

L : ligandum

H : hidrogénion

A savi disszociációs állandók (pK) és a komplexek stabilitási állandóinak ($\lg \beta_{pqr}$) meghatározásához a SUPERQUAD [77] és a Tanszéken kifejlesztett PSEQUAD [78] programokat használjuk.

A SUPERQUAD program a mérési adatsor, a minta kiindulási térfogata, a lúgkoncentráció, a vízionszorzat, a reaktánsok (H, L) száma, becsült anyagmennyisége és finomítandó állandóik felhasználásával a pK -értékek, illetve a titrálási görbe ekvivalenciapontjai alapján a hidrogénion (H) és ligandum (L) pontos koncentrációjának meghatározására is alkalmas.

A PSEQUAD program bemenő paraméterei a mérési adatsor, a minta kiindulási térfogata, a lúgkoncentráció, a vízionszorzat, az Irving-faktor, a komponensek (H, L, M) és asszociátumok (hidrogénkomplex, fémkomplex, esetleg hidroxokomplex) száma, utóbbiak sztöchiometriai összetétele, finomítandó állandóik, illetve a komponensek teljes koncentrációja.

Az említett programok a tömeghatás törvényét alapul véve, a legkisebb négyzetek módszerével iterációs lépésekben finomítják a megadott kezdeti állandókat a térfogatváltozás

figyelembevételével. A pH-metriás eredmények legjobb illesztését adó modellek, számolt stabilitási állandók mellett a program feltünteti a standard deviációkat is.

A vizsgált rendszerek eloszlási diagramjait a MEDUSA program az asszociátumok összetétele, stabilitási állandói és a komponensek teljes koncentrációja alapján számolta ki [79].

A titrált mintáink kiindulási térfogata $3,00 \text{ cm}^3$ volt, melyben a ligandum koncentrációja $\sim 1,5 \text{ mM}$ (a fémionhoz képest ekvimoláris, illetve fele mennyiségben vagy kb. kétszeres feleslegben). A mintában a KCl-koncentrációja $0,2 \text{ M}$, ami közel azonos a mérőoldat koncentrációjával, de a fémion és a ligandum koncentrációjánál jóval nagyobb. Így a titrálás során az ionerősség nem változik számottevően.

A ligandumok vizsgálatakor az alábbi módon jártunk el: Az ultratermosztáttal biztosított 25°C hőmérsékletű, mágneses keverővel kevertetett, kezdetben savas pH-jú mintához a pontosan ismert $\sim 0,2 \text{ M}$ koncentrációjú KOH-oldatot MOL-AcS típusú bürettából egy 1 cm^3 végtérfogatú Hamilton-fecskendő adagolta a MOLSPIN program által számítógépesen vezérelt léptetőmotor segítségével. A minta O_2 - és CO_2 -mentesítését argon bevezetésével oldottuk meg. A pH-méréshez MOLSPIN pH-mérőt és egy hozzá csatlakozó Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektrodát használtunk. Utóbbit $0,050 \text{ M}$ kálium-hidrogén-ftalát oldatra kalibráltuk, melynek pH-ja 25°C -on $4,008$. Ha a pH-érték változása 9 másodpercen belül $0,03 \text{ mV}$ -nál kisebb volt, akkor a pH érték rögzítése után a program újabb, egységnyi térfogatú mérőoldatot adagolt a mintához.

3.2. UV-Vis spektrofotometria

A komplex vegyületekben a fémion d pályái a közeledő ligandum elektromos erőterével való kölcsönhatása folytán különböző energiára tesznek szert. Amennyiben a pályák közti elektronátmenethez szükséges energia a látható fény tartományába esik, a komplex színes. A kapott spektrum alapján a komplex geometriájára, a donorumok minőségére, számára nézve nyerhetünk információt. Híg oldatoknál és nemszelektív abszorpció esetében az abszorbancia arányos a koncentrációval (Lambert-Beer törvény).

A d^9 elektronkonfigurációjú Cu(II)-ion esetében [80] az oktaédes komplexek energiája kétfelé hasad az energiadiagramon, ami a geometria tetragonális torzulása következtében további két-két energiaszintre hasadhat. A háromféle energiájú d-d átmenet: $d_{xz} (d_{yz}) \rightarrow d_{x^2-y^2}$, $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ és a $d_{z^2} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ gyakran azonban egyetlen sávva olvad össze,

melynek jellemzőit egyaránt befolyásolja a donortom és a nem koordinálódó szubsztituensek minősége, mennyisége [81] (1. táblázat), a koordináció módja vagy a kelátképződés jelensége. Ha a $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ komplexben levő négy ekvatoriálisan elhelyezkedő vízmolekulát a O- vagy N-donorokkal helyettesítjük, az elnyelés maximuma nagyobb energiánál jelentkezik. Vörös eltolódást tapasztalhatunk, amennyiben kelátképződés van az egyik axiális pozícióval.

1. táblázat Cu(II)-komplexek spektrális paramétereinek és a koordinált nitrogénatomok száma közti összefüggés

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

A Ni(II) esetében [80] a 6-os koordinációs számú komplexeknek látható tartományban az alábbi három, kis intenzitású ($\epsilon < 30 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) spinmegengedett d-d átmenete van: $\lambda_1 = 1430-770 \text{ nm}$ ($^3\text{A}_2 \rightarrow ^3\text{T}_2$), $\lambda_2 = 910-500 \text{ nm}$ ($^3\text{A}_2 \rightarrow ^3\text{T}_1(\text{F})$ átmenet) és $\lambda_3 = (^3\text{A}_2 \rightarrow ^3\text{T}_1(\text{P})$ átmenet). A geometria torzulása miatt a középső sáv felhasadhat, emellett a spintiltott $^3\text{A}_2 \rightarrow ^1\text{E}$ átmenet vállként megjelenhet valamelyik csúcson. A tetraédes Ni(II)-komplexek intenzívebb elnyeléssel rendelkeznek ($\epsilon = 100-1000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), az elnyelési maximum látható tartományban 900-500 nm. Az erős terű ligandumokkal (pl. peptid amidnitrogénjéhez való kapcsolódással) képződő síknégyszetes geometriájú komplexek 550-400 nm tartományban $\epsilon = 50-500 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ értékkel jellemezhetők, a 430 nm alatti – gyakran töltésátviteli eredetű – sáv ennél is nagyobb intenzitású.

A ligandum Cu(II)-és Ni(II)-komplexeinek vizsgálatokor Perkin Elmer Lambda 25 típusú, kétsugaras fotométert használtunk, melyben a sugárforrás wolfram, illetve 326 nm alatt deutérium lámpa volt. A spektrumokat a Cu(II)-komplexek esetében $\lambda = 250-800 \text{ nm}$, a Ni(II)-komplexeknél $\lambda = 250-1100 \text{ nm}$ tartományban vettük föl 1,000 cm-es kvarcküvetében 1:2, 1:1 és 2:1 fémion:ligandum aránynál különböző pH-kon. A szkennelés 960 nm/perc sebességgel, 1 nm-ként történt.

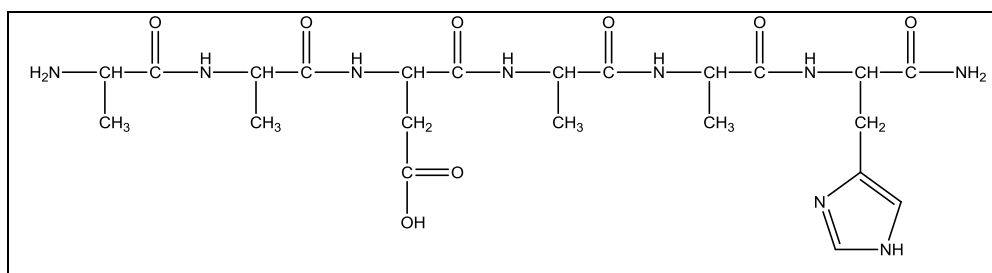
3.3. CD-spektroszkópia [82]

A síkban polarizált fény egy balra és egy jobbra cirkulárisan polarizált fénysugár összege, mely komponensek egy optikailag aktív anyagon áthaladva eltérő módon abszorbeálódnak (cirkuláris dikroizmus vagy Cotton-effektus). A kétféle fénysugár abszorpciójának különbségét a hullámhossz függvényében ábrázolva a CD-görbéhez jutunk, melyen a maximumok helye közel esik az elektrongerjesztési spektrum maximumaihoz. A vizsgált fémkomplexek optikai aktivitását okozhatja a ligandum vagy maga a komplex (a központi atom és a donoratomok elhelyezkedése) aszimmetriája. A CD-spektrumokban az intenzitás értéke függ a kromofor csoportok és a kiralitáscentrum közti távolságtól, a donoratom minőségétől, illetve nemkoordinálódó oldalláncok esetében a jelek intenzitása összeadódik. A fémionhoz koordinálódó donorcsoportokat tekintve a királis információ továbbításának mértéke az alábbi módon csökken: amidnitrogén > karboxilátotigén > aminonitrogén.

A CD-méréseket a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén végeztük, a JASCO-810 spektrométer segítségével. A spektrumok felvétele $\lambda=280-800$ nm és 220-300 nm tartományban 1,000 cm és 1,00 mm úthosszú küvettában történt, 1:2, 1:1 és 2:1 fémion:ligandum aránynál.

3.4. Felhasznált vegyszerek

A vizsgált ligandum szerkezetét a 4. ábra mutatja.



4. ábra A vizsgált AADAH-NH₂ ligandum szerkezete

A vizsgált ligandumot szilárd fázisú peptidszintézissel állítottuk elő, az ehhez szükséges vegyszereket: az Amide Rink típusú gyantát (0,71 mmol/ekvivalens; AM Resin 200-400 mesh, 0,25 mmol), a felhasznált aminosavszármazékokat, a DMF, piperidin, DIPEA és TFA anyagokat a

MERCK Kft.-től, a TIS-t, HOBt-t, dietil-étert és NMP-t a Sigma Aldrich Kft.-től, míg a diklórmétánt a Spektrum 3D Kft.-től vásároltuk.

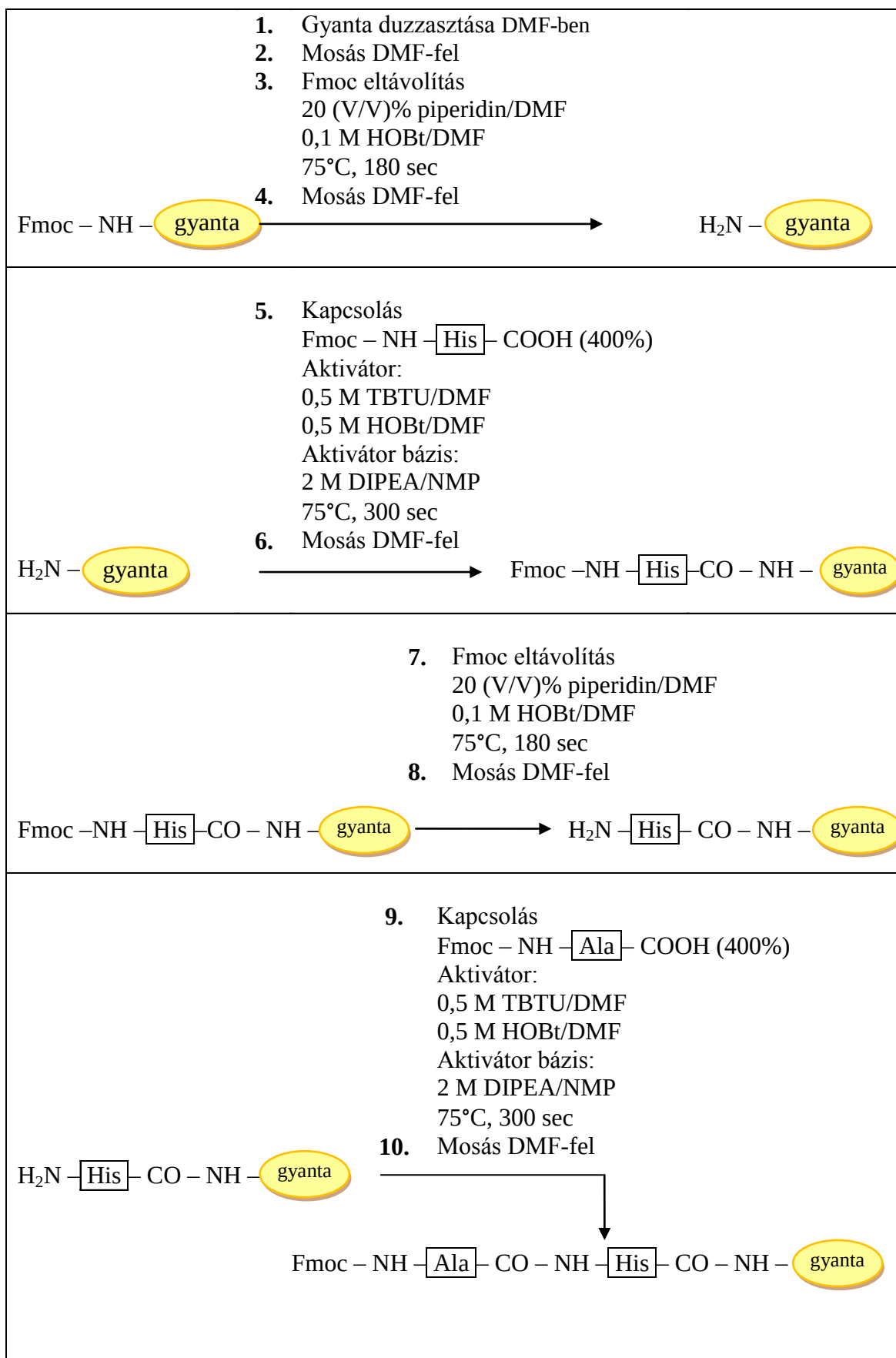
A Reanal gyártmányú CuCl_2 , NiCl_2 - és ZnCl_2 -oldatok fémion-koncentrációját gravimetriásan, oxinát formájában, a ZnCl_2 -oldat H^+ -koncentrációját pH-potenciometriásan határozták meg. Az oldatkészítéshez minden esetben háromszor ioncserélt vizet használtunk.

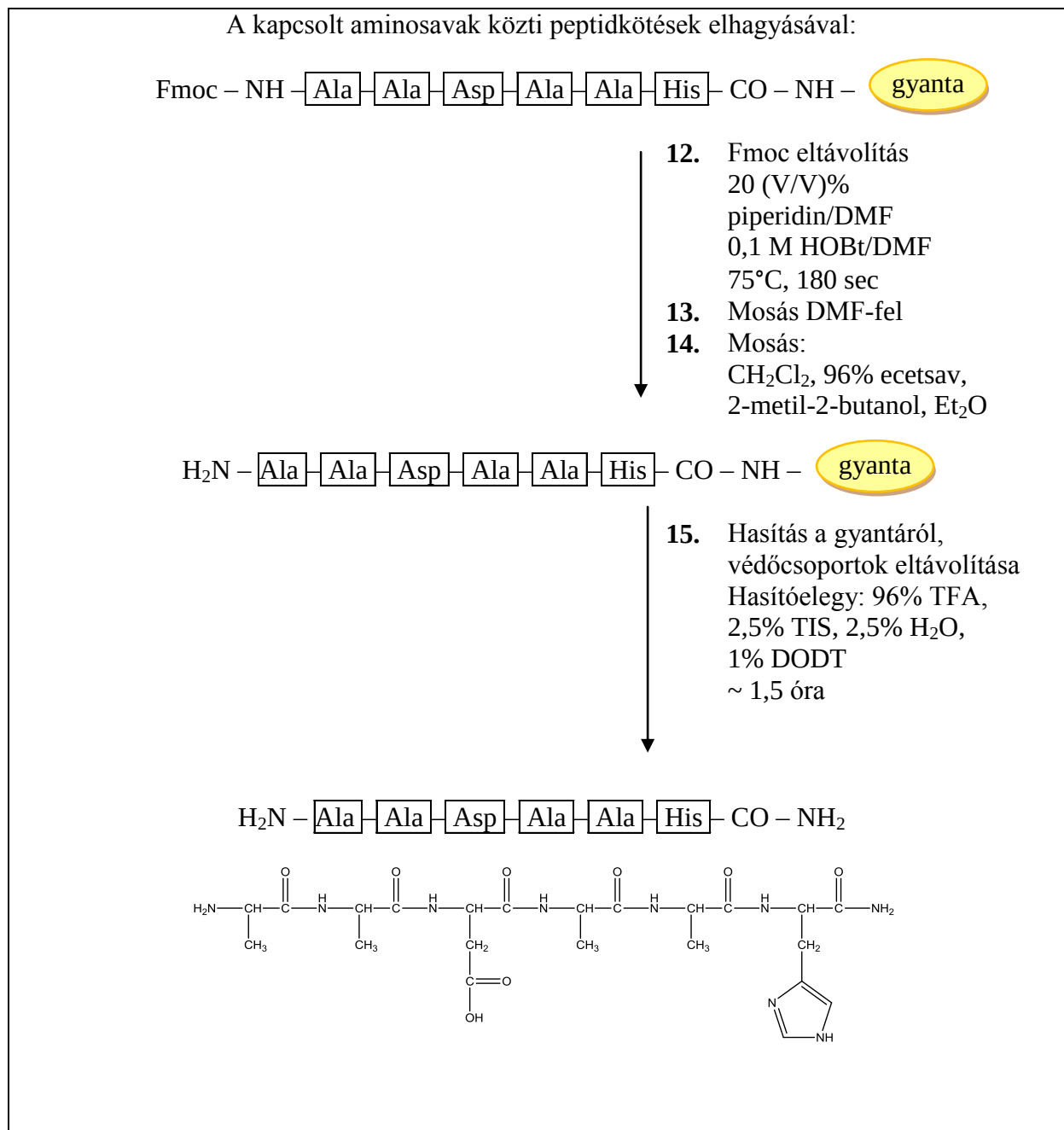
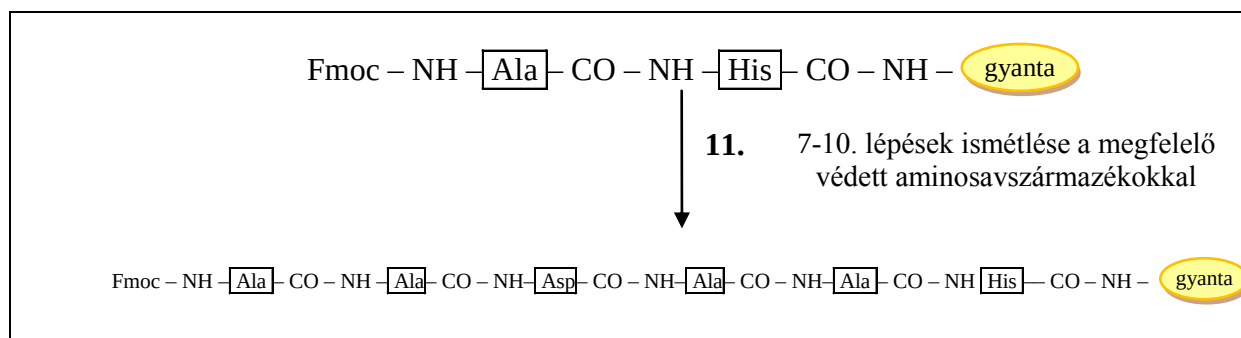
A KOH mérőoldatot úgy készítettük, hogy a szükséges szilárd KOH (Merck típusú) kétszeres mennyiségéhez kiforralt, CO_2 -tól argon átbuborékoltatásával mentesített háromszor ioncserélt vizet adtunk, amivel a KOH felét elmostuk, a maradékot pedig feloldottuk. A lúgoldat pontos koncentrációját Aldrich gyártmányú kálium-hidrogén-ftalát ismert koncentrációjú oldatát titrálva, a titrálási görbe Gran-féle linearizálásával határoztuk meg [83].

3.4.1. Szilárd fázisú peptidszintézis

A vizsgált AADAAH- NH_2 ligandumot a Tanszéken található Liberty-1 készülékkel állítottuk elő szilárd fázisú peptidszintézissel. A Merrifield nevéhez köthető módszer során oldhatatlan gyantaszemcséhez kapcsoltnak építjük az oligopeptidet annak C-terminusa felől, így az egyes aminosavak kapcsolását követő szűréskor gyakorlatilag nincsen anyagvesztés. Ez azért is fontos, mert a hibás szekvencia elkerüléséhez 100%-os konverziót kell biztosítani, ami háromszoros-ötszörös aminosavfelesleget, illetve kapcsolószer (aktivátor) alkalmazását kívánja meg.

Míthogy több reaktív centrum van jelen, a Fmoc/tBu stratégiát követve a gyanta és az aminosavszármazékok aminocsoportját a piperidines hasítással eltávolítható Fmoc csoport, a kapcsolandó aminosavszármazékok funkciós csoportjait terc-butil csoportok védik (a hisztidin esetében tritil csoportot használtunk). A nagyenergiájú peptidkötés létrehozásához a karboxilcsoport aktiválása szükséges, esetünkben ez HOBt-vel, illetve a hőmérséklet emelésével (mikrohullám) történt. A gyantához kapcsolt peptidláncot diklórmétánnal, 96%-os ecetsavval, 2-metil-2-butanollal és dietil-éterrel mostuk, majd a peptidet trifluoecetsavval hasítottuk le a gyantáról. Az oldathoz hideg étert adva világos, szilárd anyag vált ki, melyet éterrel mostunk, szárítás után vízben feloldottunk és liofilizáltunk. Tisztaságáról pH-potenciometriásan, HPLC-vel és tömegspektrometriás vizsgálatokkal győződünk meg.





5. ábra A ligandum előállításának lépései

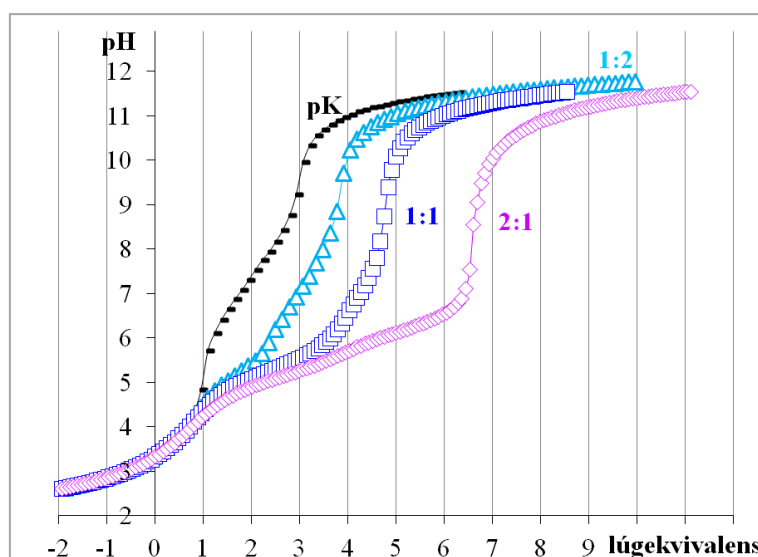
4. Kísérleti eredmények és értékelésük

4.1. A ligandum sav-bázis tulajdonságai

A vizsgált ligandum három deprotonálódási állandóval jellemezhető, melyek a 2. táblázatban találhatók. A legkisebb deprotonálódási állandó az aszparaginsav karboxilátcsoportjához, a közbeső az imidazolnitrogén hidrogénjéhez, míg a legnagyobb az aminocsoporthoz rendelhető. Utóbbi két funkciós csoport deprotonálódási folyamatai egymással átfedő lépésekben játszódnak le.

4.2. A ligandum Cu(II)-komplexei

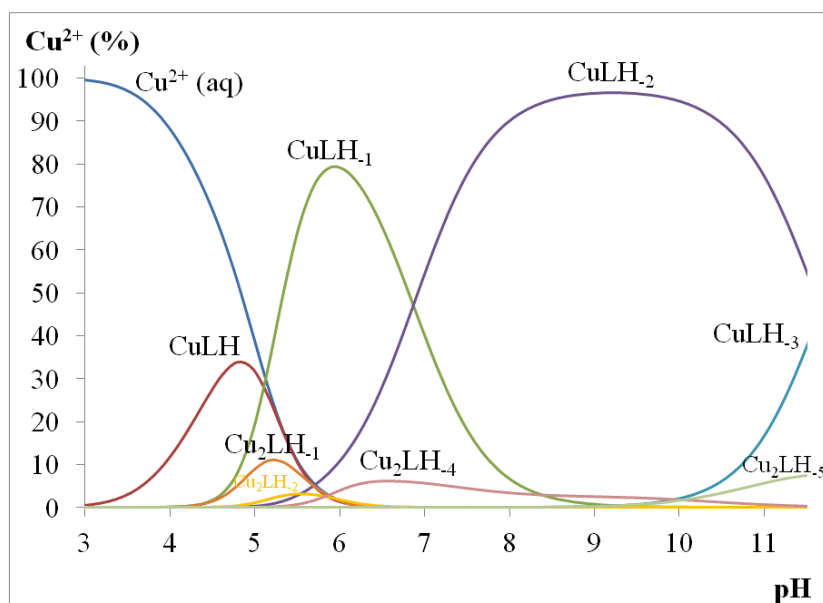
A hexapeptid Cu(II)-ionokkal való komplexképződése pH 4 felett indult meg: a kezdetben halványkék oldat rózsaszínűvé vált, és a pH növelésével a lila egyre sötétebb árnyalataiba ment át. Ahogyan az a titrálási görbéből is látható (6. ábra), számottevő mértékben játszódtak le lúgfogyasztással járó folyamatok, illetve a ligandum az elvárásoknak megfelelően két Cu(II)-ion megkötésére képes. A mérési eredmények legjobb illesztését adó modellt a 3. táblázatban, a Cu(II): ligandum 1:1 és 2:1 rendszer számított eloszlási diagramját a 7. és 11. ábrán tüntettük fel.



6. ábra A Cu(II):AADA AH-NH₂ rendszerek titrálási görbéi
(c(ligandum) ~ 1,5 mM)

A titrálás kezdeti szakaszában a CuLH összetételű komplex van jelen, feltehetőleg (NH₂, CO) koordinációval, melyben az imidazolnitrogén protonált: $\lg \beta \text{ CuLH} - \text{pK}_{\text{Im}} = 6,17$, ami nagyobb, mint az Ala₂ CuL komplexére meghatározott 5,33-as $\lg \beta$ érték [84]. Ez az

aszparaginsav oldalláncbéli karboxilátsoportjával való kölcsönhatásra utal. A spektrumokban nem látható jelentős változás a komplex kis koncentrációja és a képződésével járó kis spektrális effektus miatt.



7. ábra A Cu(II) : AADAAH-NH₂ 1:1 rendszer számított eloszlási diagramja

pH 5,5 és 7 között 1:1 és 1:2 arányoknál a CuLH₁ részecske válik dominánssá: ezen tartományban a hisztidin imidazolnitrogénje még mindig protonált állapotban van (pK görbe ezen szakasza hasonló lefutást mutat), így a komplex – az UV-Vis spektrumokban mutatkozó kicsiny eltolódás alapján – két amidnitrogén közel kooperatív módon történő deprotonálódásával alakulhat ki. A komplex stabilitása nagyobb, mint az Ala₄ ilyen összetételű komplexe [66], vagyis az (NH₂,N⁻,N⁻,β-COO⁻) koordináció stabilitást növelő hatása is jelentkezik.

8-as pH felett az 1:1 és 1:2 rendszerekben a CuLH₂ komplex gyakorlatilag egyeduralgó. A hisztidin imidazolnitrogénjének deprotonálódása az (NH₂,N⁻,N⁻,β-COO⁻) koordinációs mód mellett felveti az (N⁻,N⁻,Im(N)) koordinációjú izomer kialakulásának lehetőségét is. (Az AADA [85] esetében lgβ CuLH₂ = -4,73, az AADAAH-NH₂ ligandumra nézve lgβ CuLH₁ - pK_{Im} = -4,05, ami szintén közel esik az AADAAH-NH₂ ligandum CuLH₂ komplexének - 4,35-ös lg β értékéhez.) A komplex CD-spektruma nem különbözik jelentősen a CuLH₁ komplex spektrumától, ami a koordinációs mód azonosságát sejteti.

2. táblázat Az AADAAH-NH₂ ligandum deprotonálódási állandói

pK₁	3,50(3)
pK₂	6,57(1)
pK₃	8,05(1)

3. táblázat Az AADAAH-NH₂ ligandum átmenetifém-komplexeinek stabilitási állandói

	Cu(II)	Ni(II)	Zn(II)
MLH	12,74(2)	10,88(5)	10,72(5)
ML	–	4,91(1)	4,45(1)
MLH₁	2,52(1)	–	–4,05(5)
MLH₂	–4,35(3)	–10,43(1)	–13,20(4)
MLH₃	(–16,02(4))	–20,19(2)	–
M₂LH₁	5,12(4)	–	–
M₂LH₂	–0,80(7)	–7,57(4)	–
M₂LH₃	–	–	–
M₂LH₄	–12,47(2)	–	–
M₂LH₅	–22,52 (3)	–	–
pK(MLH/ML)	[5,11]	5,97	6,27
pK(ML/MLH₁)	[5,11]	[7,67]	8,50
pK(MLH₁/MLH₂)	6,87	[7,67]	9,15
pK(MLH₂/MLH₃)	11,67	9,76	–
pK(M₂LH₁/M₂LH₂)	5,92	–	–
pK(M₂LH₂/M₂LH₃)	[5,83]	–	–
pK(M₂LH₃/M₂LH₄)	[5,83]	–	–
pK(M₂LH₄/M₂LH₅)	10,05	–	–
lgβ(ML)–pK_{amino}	–	–3,14	–3,60

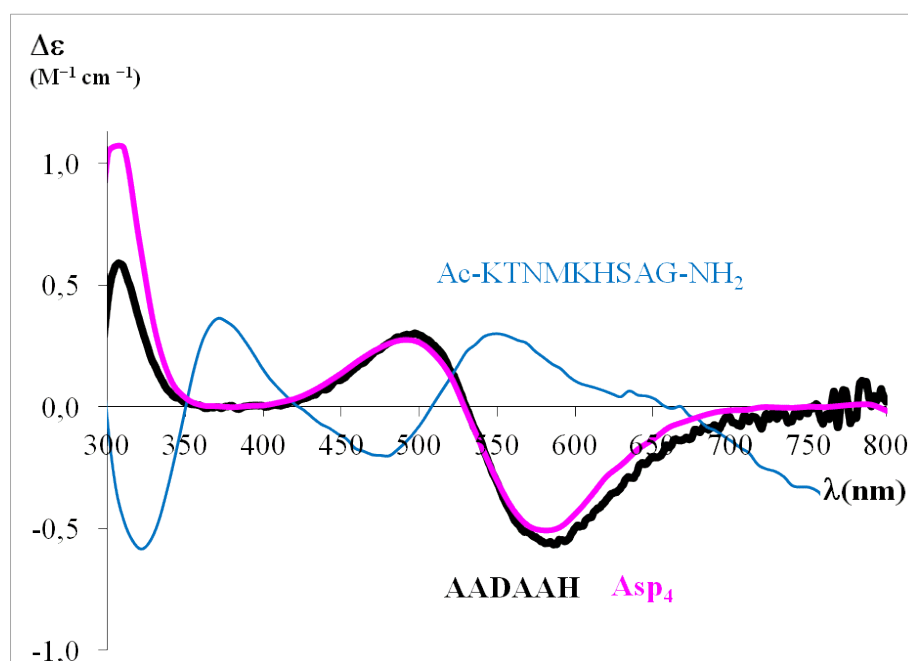
4. táblázat Az AADAAH-NH₂ ligandum Cu(II)- és Ni(II)-ionokkal képződő főbb komplexeinek spektrális paraméterei

	UV-Vis $\lambda_{\max} (\epsilon)$ [nm (M ⁻¹ cm ⁻¹)]	CD $\lambda_{\max} (\Delta\epsilon)$ [nm (M ⁻¹ cm ⁻¹)]
CuLH₁	565 (125)	590 (-0,51) 495 (+0,15) 310 (+0,63)
CuLH₂	549 (149)	590 (-0,55) 494 (+0,30) 310 (+0,58)
Cu₂LH₄	555 (108)	613 (-0,15) 527 (+0,36) 336 (-0,55)
Cu₂LH₅	539 (142)	668 (+0,17) 558 (-0,49) ^{széles sáv} 341 (-0,30) 303 (+0,45)
NiLH₂	438 (238)	493 (-2,07) 425 (1,41)
NiLH₃	413 (219)	462 (-3,03) ^{széles sáv}

5. táblázat Az Asp₃ és Asp₄ ligandumok NiLH₂ komplexének spektrális jellemzői [86]
(koordináció módja: (NH₂, N⁺, N⁻, β-COO⁻))

	UV-Vis $\lambda_{\max} (\epsilon)$ [nm (M ⁻¹ cm ⁻¹)]	CD $\lambda_{\max} (\Delta\epsilon)$ [nm (M ⁻¹ cm ⁻¹)]
Asp₃	440 (265)	492 (-2,60) 422 (+0,88) 232 (-5,08)
Asp₄	438 (229)	499 (-2,10) 426 (+1,55) 234 (-12,19)

A 8. ábrán az Asp₄ (NH₂,N⁻,N⁻,β-COO⁻) koordinációjú CuLH₂ komplexének, az Ac-KTNMKHSAG-NH₂ (N⁻,N⁻,Im(N)) koordinációjú CuL komplexének, és a vizsgált AADA AH-NH₂ ligandum CuLH₂ komplexének CD-spektrumait vethetjük össze [86,87] (az Ac-KTNMKHSAG-NH₂ CuL komplexében két deprotonált amidnitrogén és két protonált lizin is található, utóbbiak nem vesznek részt a koordinációban). A kérdéses szerkezet CD-spektruma jó egyezést mutat az Asp₄ (NH₂,N⁻,N⁻,β-COO⁻) koordinációjú komplexének spektrumával, eszerint ezen pH-tartományban a hisztidin mint horgonycsoport nem tud versenyezni az aminocsoportról induló koordinációval.



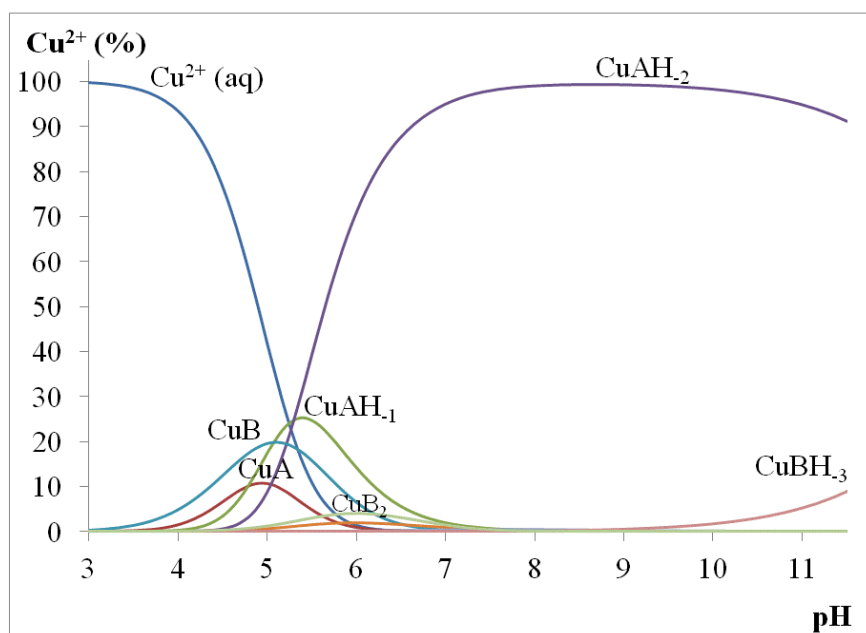
8. ábra A vizsgált AADA AH-NH₂ ligandum CuLH₂ komplexének, az Ac-KTNMKHSAG-NH₂ (N⁻,N⁻,Im(N)) koordinációjú CuL komplexének [87] és az Asp₄ (NH₂,N⁻,N⁻,β-COO⁻) koordinációjú CuLH₂ komplexének [86] CD-spektrumai

A pH további növelésével CuLH₃ összetételű komplex képződik. A komplex stabilitási állandója pH-potenciometriásan nem határozható meg pontosan, mivel a képződésére vonatkozó deprotonálódási állandó 11,67. Bár ebből kifolyólag a komplex a vizsgált pH-tartományban igen kis mennyiségben képződik, UV-Vis és CD-spektrumokban látható változásokból arra következtethetünk, hogy 11-es pH-n valóban megjelenik ez a részecske. A λ_{max} kék eltolódása arra utal, hogy nem hidroxokomplex, hanem a nagyobb energiával jellemezhető 4N-es komplex, amelyben (NH₂,N⁻,N⁻,N⁻) vagy (N⁻,N⁻,N⁻,Im(N))

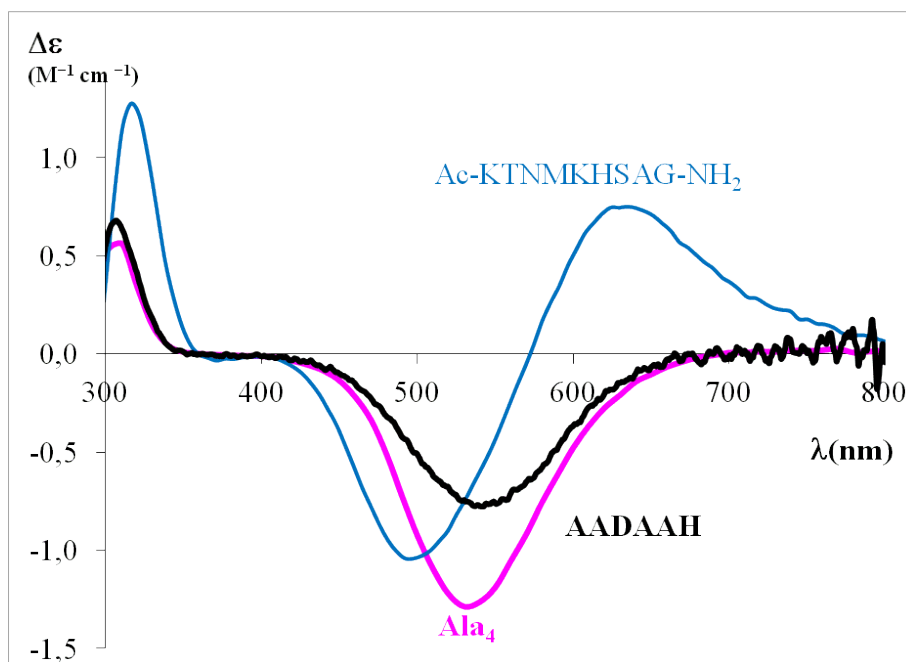
koordináció jöhet létre. Az előbbi esetben a harmadik helyen aszparaginsavat tartalmazó tetrapeptidekkel ellentétben az oldalláncbeli karboxilátcsoport kiszorul a Cu(II)-ion koordinációs szférájából és azt a harmadik deprotonálódott amidnitrogén foglalja el. Az utóbbi esetben a ligandum C-terminális részén történik a kötődés, az imidazolnitrogén koordinálódását követően az N-terminális irányban haladva koordinálódik három amidnitrogén. Így (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer alakul ki.

A kétféle koordinációs mód preferáltsága a hexapeptid N- és C-terminális részét külön-külön modellező NH₂-AADA [85] és Ac-GGGH [46] ligandumokkal vizsgálható. A Cu(II) : NH₂-AADA : Ac-GGGH = 1:1:1 arányú oldatában képződő komplexek eloszlása a 9. ábrán látható. Megállapítható, hogy pH 7 és 11 között szinte csak az AADA ligandummal képződő CuLH₂ komplex van jelen, amelyben (NH₂,N⁻,N⁻,β-COO⁻) koordináció valósul meg. pH 11 felett ugyanakkor nagyon kis mennyiségben (kb. 10%) megjelenik az Ac-GGGH ligandummal képződő CuLH₃ komplex is, amelyben (N⁻,N⁻, N⁻,Im(N)) koordináció alakul ki. A Cu(II)-AADA-AH-NH₂ rendszerben a pH 11 felett képződő CuLH₃ komplex mennyisége megegyezik a modellrendszerben képződővel, ami alapján a (N⁻,N⁻,N⁻,Im(N)) koordinációval képződő izomer képződése sem zárható ki. Az elnyelési maximumok helyei (4. táblázat) az Ala₄ CuLH₃ komplexének λ_{max} értékeivel [88] mutatnak egyezést, illetve a spektrumok hasonló lefutása is az (NH₂,N⁻,N⁻,N⁻) koordinációs módot támasztják alá (10. ábra).

Ahogy már említettük, az 1:2 rendszer az 1:1-hez hasonló arányban köti meg a Cu(II)-ionokat, vagyis a jelenlévő ligandumok közel fele nem vett részt a komplexképződésben.

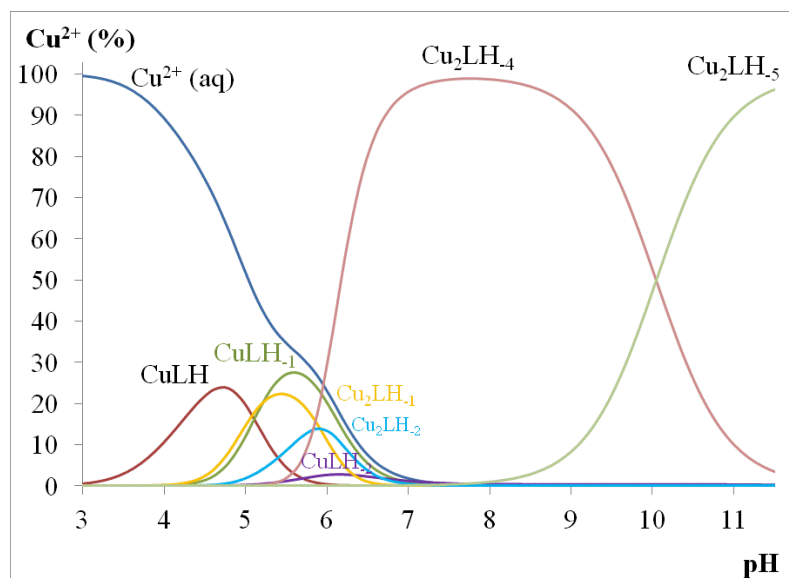


9. ábra A Cu(II)-ion megoszlása az elkülönült kötőhelyeket modellező AADA (A) és Ac-GGGH (B) ligandumok között (Cu(II) : NH₂-AADA : Ac-GGGH = 1:1:1) [46,85]



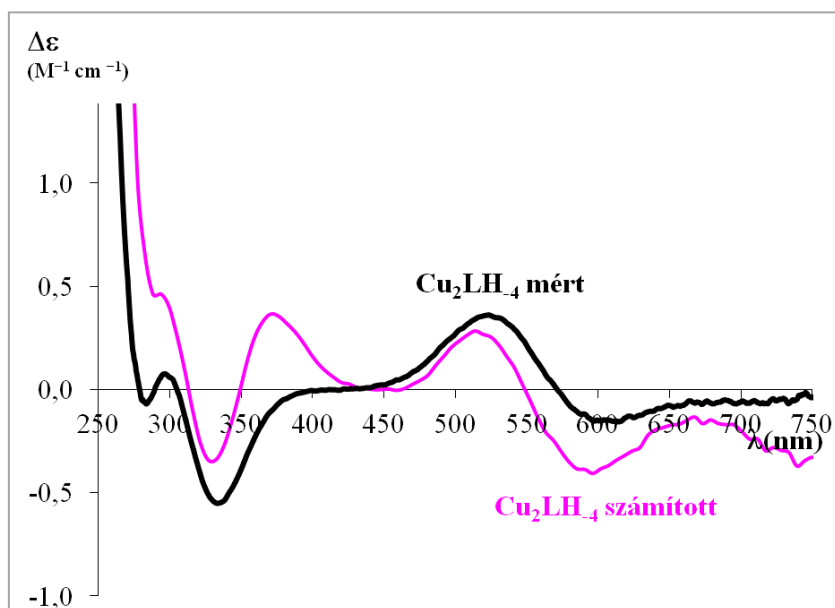
10. ábra A vizsgált AADA AH-NH₂ ligandum CuLH₃ komplexének (becsült intenzitásérték), az Ala₄ CuLH₃ (NH₂, N⁻, N⁻, N⁻) koordinációjú CuLH₃ komplexének [88], illetve az Ac-KTNMKHSAG-NH₂ (N⁻, N⁻, N⁻, Im(N)) koordinációjú CuLH₁ komplexének [87] CD-spektruma

Közel kétszeres fémfelesleg esetében a ligandum megköti a Cu(II)-ionokat: a pH 5-6 között képződő $\text{Cu}_2\text{LH}_{-1}$ és $\text{Cu}_2\text{LH}_{-2}$ komplexek mennyisége elhanyagolható, míg pH 6-10 tartományban túlnyomórészt a Cu_2LH_4 összetételű komplex van jelen. Ezen komplexben az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \beta\text{-COO}^-)$ és az $(\text{N}^-, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N}))$ koordinációs módok együttesen megvalósulhatnak. Emellett felvetődhet annak a lehetősége is, hogy a szokásostól eltérő módon az aszparaginsavat követő amidnitrogén deprotonálódik, és a $\beta\text{-COO}^-$ -csoportot kiszorítva, a Cu(II)-ionhoz koordinálódik. A rendszer CD-spektrumában pH 9,4-től kezdve a Cu_2LH_4 komplexhez rendelhető maximumok csökkenni kezdenek, és a Cu_2LH_5 összetételnek megfelelő részecske spektruma ráépül az előző komplex spektrumára. A feltételezett koordinációs módok ez esetben a $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \beta\text{-COO}^-)$ és az $(\text{Im}(\text{N}), \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-)$.



11. ábra A Cu(II):AADA AH-NH2 2:1 rendszer számított eloszlási diagramja

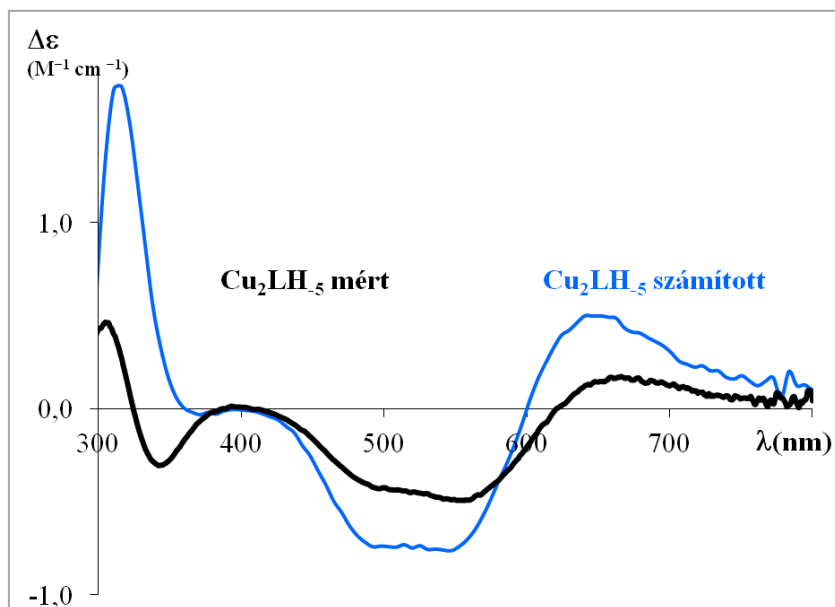
Ha a Cu_2LH_4 komplex spektrumát képezzük a ligandum CuLH_2 komplexének és egy $(\text{N}^-, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N}))$ koordinációjú komplex spektrumának összegéből, és ezt összevetjük a mért adatokkal (12. ábra), azt láthatjuk, hogy a két spektrum lefutásában jelentős a hasonlóság, egyedül a $\lambda = 370 \text{ nm}$ -nél található maximumnál mutatkozik eltérést. Ez alapján a komplexben a fent leírt koordináció feltételezhető. Ugyanakkor a ligandum Cu_2LH_5 mért és számított spektrumának menete megegyezik (13. ábra), ami az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \beta\text{-COO}^-)$ és az $(\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N}))$ koordináció egyidejű létezésére való feltételezéseinket (ezáltal a Cu_2LH_4 komplexre javasolt koordinációt is) megerősíti, azonban ezen koordinációs módok egyértelmű bizonyításához ESR-vizsgálatok szükségesek.



12. ábra Az AADA AH-NH₂ ligandum Cu₂LH₄ komplexének mért (fekete) és számított (rózsaszín) spektruma.

A számított spektrumban az alábbi komplexek spektrumát összegeztük:

- az AADA AH-NH₂ ligandum CuLH₂ komplexe – (NH₂, N⁻, N⁻, β-COO⁻) koordináció
- az az Ac-KTNMKHSAG-NH₂ ligandum CuL komplexe – (N⁻, N⁻, Im(N)) koordináció [87]



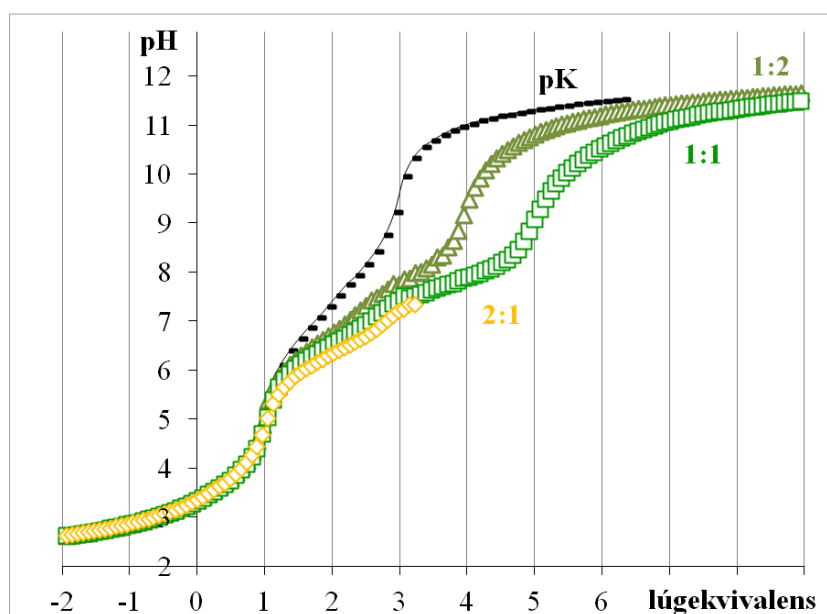
13. ábra Az AADA AH-NH₂ ligandum Cu₂LH₅ komplexének mért (fekete) és számított (kék) spektruma.

A számított spektrum az alábbi komplexek spektrumának összegezésével készült:

- az AADA AH-NH₂ ligandum CuLH₂ komplexe – (NH₂, N⁻, N⁻, β-COO⁻) koordináció
- az Ac-KTNMKHSAG-NH₂ ligandum CuLH₁ komplexe – (N⁻, N⁻, N⁻, Im(N)) koordináció [87]

4.3. A ligandum Ni(II)-komplexei

Ni(II)-ionokkal a komplexképződés pH 5 körül kezdődik, elsőként az (NH₂, CO) koordinációjú komplex jelenik meg az oldatban. Ezen komplexben az imidazolnitrogén protonált (NiLH), bár stabilitása elmarad a Cu(II)-ion ilyen összetételű komplexétől (a számított stabilitási állandók a 3. táblázatban találhatók). Alapvetően itt sincsen jelentős különbség a kétszeres ligandumfelesleget tartalmazó és az ekvimoláris oldat között a megkötött fémion arányát, pH-függését és a spektrumok lefutását tekintve.



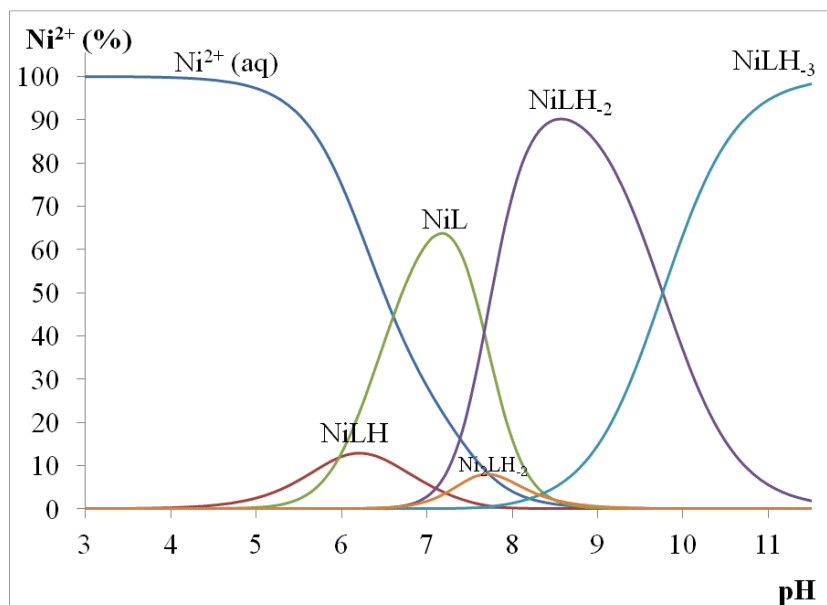
14. ábra A Ni(II) : AADAAH-NH₂ rendszerek titrálási görbéi (c(ligandum) ~ 1,5 mM)

pH 6,5-7,5 tartományban a Ni(II)-ionok (1:2 és 1:1 aránynál) nagyrészt a NiL összetételű komplex formában vannak jelen, melynek stabilitását az (NH₂, CO) koordináció mellett a β -COO⁻ csoport, illetve a deprotonálódott imidazolnitrogén makrokelát formájában ugyancsak növelheti (összehasonlításképpen: a Gly₄ esetében $\lg \beta \text{ NiL} = 3,65$ [89]). A fenti komplexek halványzöldek, oktaéderes geometriájúak és paramágnesesek, ám a pH növelésével élénksárga színű, síknégyzetes geometriájú, diamágneses komplexek keletkeznek. (Ennek köszönhetően meglehetősen időigényes, míg a rendszerben beáll az egyensúly, így a keletkező komplexek stabilitási állandóit nagyobb hibával tudjuk meghatározni.)

Az extra lúgfogyás alapján az amidnitrogének kooperatív deprotonálódásával képződő NiLH₂ komplex jelenlétét feltételeztük, mely a fent említett rendszerekben a fő részecske pH

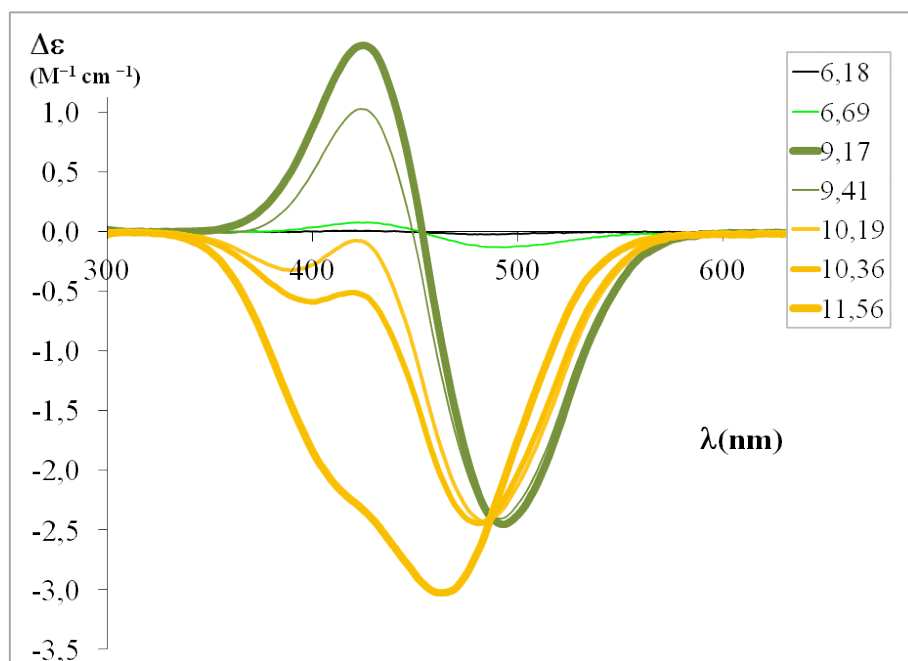
8-9,5 között. Hasonlóan a Cu(II)-komplexhez, kétféle koordinációs mód valósulhat meg ennél az összetételnél: (NH_2 , N^- , N^- , $\beta\text{-COO}^-$) vagy átrendeződéssel az (N^- , N^- , $\text{Im}(\text{N})$) koordináció.

Az UV-Vis és CD spektrális paraméterek megegyeznek az Asp_3 és Asp_4 NiLH_2 komplexének spektrális paramétereivel [86] (4. és 5. táblázat), ami alapján ebben a komplexben is (NH_2 , N^- , N^- , $\beta\text{-COO}^-$) koordináció feltételezhető.

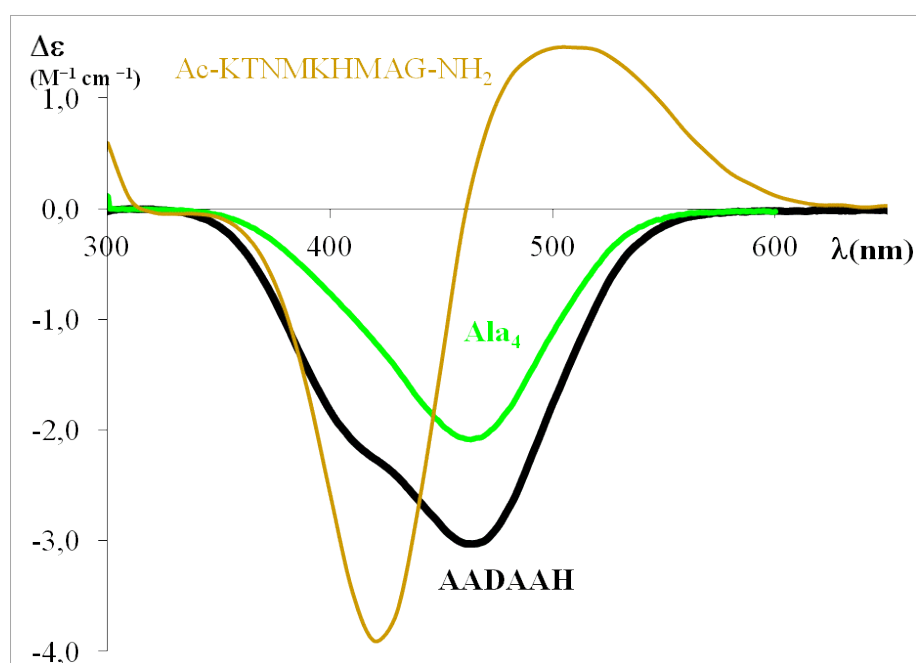


15. ábra A $\text{Ni(II):AADA\AA H-NH}_2$ 1:1 rendszer számított eloszlási diagramja

Lúgos tartományban a NiLH_3 komplex van zömében jelen az oldatban, 1:2 és 1:1 aránynál is, mely a CD-spektrumban a λ_{max} eltolódását, illetve új, kis negatív Cotton-effektussal járó csúcs megjelenését okozza $\lambda \sim 400$ nm-nél (16. ábra) Ehhez az összetételhez, hasonlóan a Cu(II)-ionnál tapasztaltakhoz, koordinációs izomereket rendelhetünk, melyek modelljéül szolgáló ligandumok CD-spektrumait a 17. ábrán láthatjuk.



16. ábra A Ni(II):AADA AH-NH₂ 1:1 rendszer CD-spektrumai. A pH 10,19-es minta jól láthatóan elkülönülő negatív Cotton-effektusai nagyobb pH-n eltolódnak, illetve összeolvadnak



17. ábra A vizsgált AADA AH-NH₂ ligandum NiLH₃ komplexének, az Ac-KTNMKHMAG-NH₂ (N⁻,N⁻,N⁻, Im(N) koordinációjú NiLH₂ komplexének [90] és az Ala₄ (NH₂,N⁻,N⁻,N⁻) koordinációjú NiLH₃ komplexének [88] CD-spektrumai

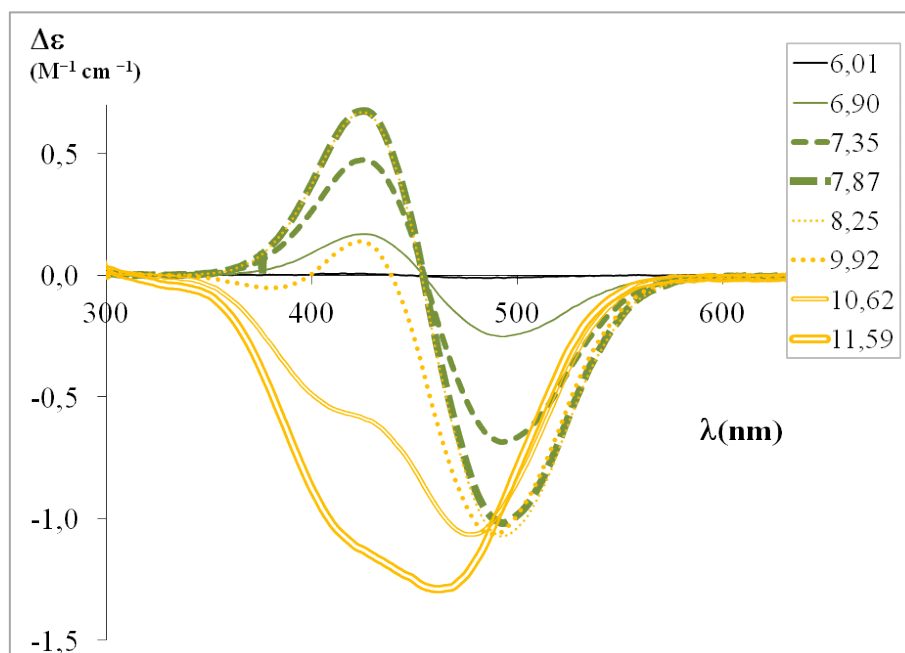
A ligandum NiLH_3 komplexének spektrumának lefutása összességében az Ala_4 ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-$) koordinációjú NiLH_3 komplexéhez hasonló [88], azonban kb. 420 nm-nél egy kis váll jelentkezik, mely adódhat az igen kis mennyiségben képződő, de nagy moláris abszorbanciájú ($\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-$, $\text{Im}(\text{N})$) koordináció jelenlétéből is.

Kétszeres ligandumfelesleg esetén szintén képződnek az oktaéderes NiLH és NiL összetételű komplexek, de a lúgos tartományban a ligandum nem tudja oldatban tartani a fémionokat. Egy részük hidrolízist szenved (fehér színű hidroxocsapadék keletkezik), a maradék a ligandumhoz kötődik az amidnitrogének deprotonálódása révén, síknégyszetes komplexeket eredményezve.

A NiLH_2 , NiLH_3 komplexekben a fent említetteknek megfelelően a fémion többféle módon kötődhet: a $\text{Ni(II):AADA AH-NH}_2$ 2:1 arányú rendszer CD-spektrumaiban (18. ábra) szintén felfedezhetjük a ($\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-$, $\text{Im}(\text{N})$) koordinációjú izomernek tulajdonítható vállat az Ala_4 NiLH_3 komplexére jellemző elnyelési maximum mellett. Noha igen kis effektusokról van szó, láthatjuk, hogy a $\text{pH} = 9,92$ -es minta esetében a kis intenzitású, negatív előjelű csúcs megjelenésével egyidejűleg a ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \beta\text{-COO}^-$) koordinációjú NiLH_2 komplexhez rendelt csúcs is tolódni kezd az ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-$) koordinációhoz rendelhető λ_{max} irányába (a spektrumokban bekövetkező változás ligandumfelesleg mellett és ekvimoláris oldat esetében is megfigyelhető). Itt kell megjegyeznünk, hogy a különböző koordinációjú Cu(II) -komplexek fényelnyelésében nincsen két nagyságrend különbség, ennél fogva a CuLH_3 komplex spektruma esetén a Ni(II) -nél detektálható párhuzamos reakciók az általunk alkalmazott technikákkal nem mutathatók ki.

Az első dinukleáris komplexben, a Ni_2LH_2 komplexben az aminocsoport felől történő koordinációt az imidazolnitrogén egyfogú kötődése egészítheti ki, de – mint láttuk – az amidnitrogének deprotonálódása az imidazolnitrogén felől is haladhat.

Láthatjuk, hogy a Ni(II) -ionok sok tekintetben hasonló módon viselkednek, mint a Cu(II) -ionok, azonban a többmagvú komplexek tanulmányozása kisebb fémfelesleget vagy hígabb oldatot kíván meg.

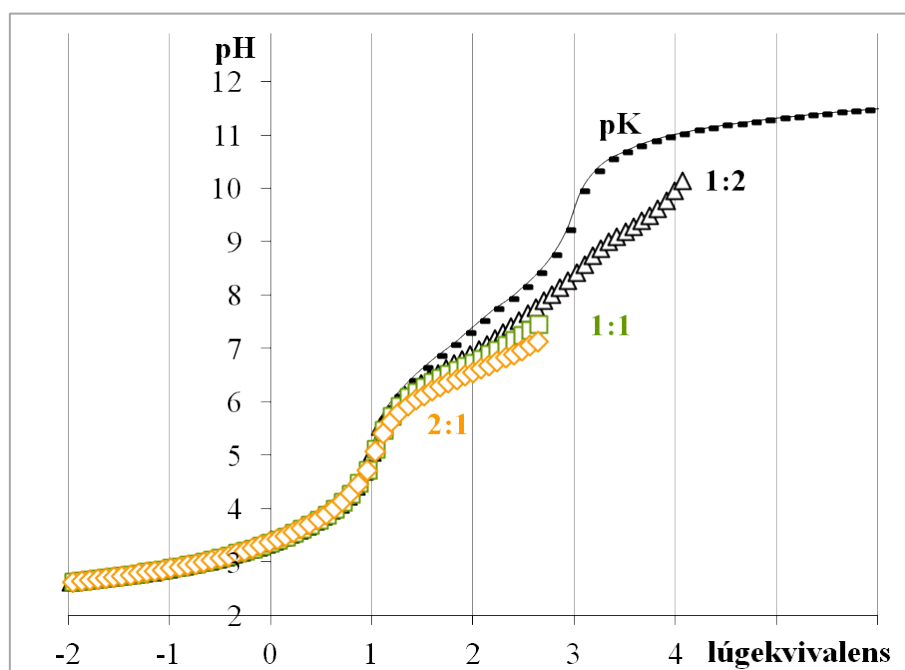


18. ábra A Ni(II):AADAANH₂ 2:1 rendszer CD-spektrumai
(pH 7,35-től csapadékos az oldat)

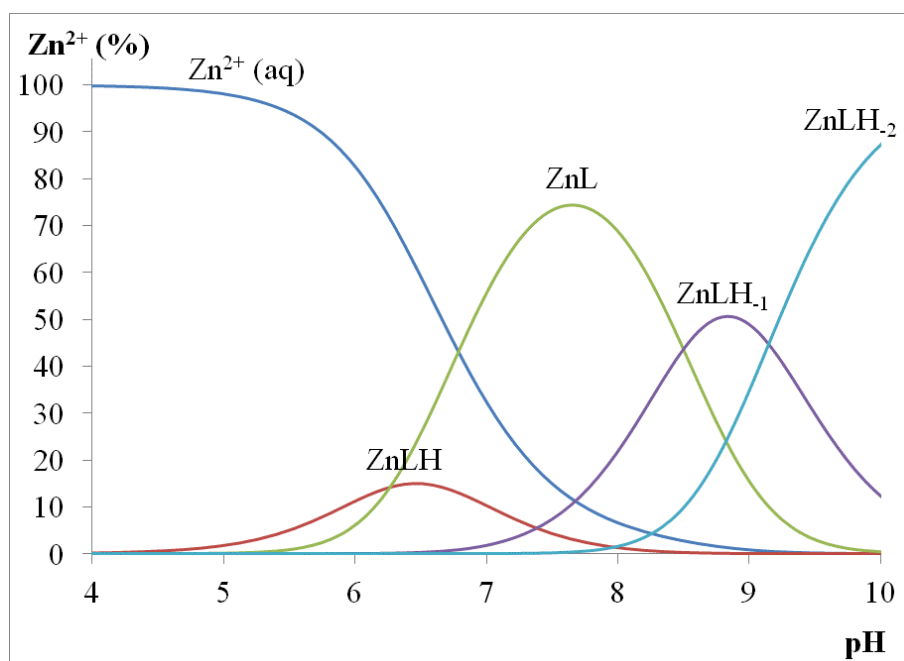
4.4. A ligandum Zn(II)-komplexei

A Zn(II)-AADAANH₂ rendszer komplexképzését 1:2, 1:1 és 2:1 aránynál vizsgáltuk. Mindhárom esetben bekövetkezett a fémion hidrolízise, ugyanakkor a titrálási görbe alapján a lúgfogyasztó folyamatok hasonló mértékben mentek végbe, mint a Ni(II) esetében (19. ábra).

A hexapeptid Zn(II)-ionnal képzett ZnLH és ZnL összetételű komplexének stabilitása a fentieknek megfelelően jó egyezést mutat a Ni(II)-ion ilyen összetételű komplexeinek stabilitásával. A koordinációs mód ez esetben is (NH₂, CO), de emellett a β-COO⁻ csoport és/vagy az imidazolnitrogén részvételével képződött makrokelát stabilizáló hatása is jelentkezhet (a Gly₄ esetében lg β ZnL = 2,96 [37]). A komplexképződés pH ~ 6 körül kezdődik, az oldatban kis mennyiségű ZnLH komplex mutatható ki, melyben az imidazolnitrogén protonált állapotban található. A fiziológias tartományban a ZnL komplex dominál mindhárom vizsgált aránynál, melyet a pH emelésével a fémion hidrolízise követ: vegyes hidroxokomplexei képződnek, majd fehér csapadék válik ki az oldatból.



19. ábra A $\text{Zn(II)} : \text{AADA AH-NH}_2$ rendszerek titrálási görbéi ($c(\text{ligandum}) \sim 1,5 \text{ mM}$)



20. ábra A $\text{Zn(II)}:\text{AADA AH-NH}_2$ 1:2 rendszer számított eloszlási diagramja

5. Összefoglalás

Munkánk során két, a biológiai rendszerekben is fontos fémmegkötő helyet; aszparaginsavat és hisztidint egyaránt tartalmazó peptid átmenetifémionokkal való komplexképzését tanulmányoztuk. Az általunk szintetizált $\text{NH}_2\text{-AlaAlaAspAlaAlaHis-NH}_2$ két egymástól elkülönült fémion-megkötőhelyet tartalmaz. A peptid N-terminális részén az egyszerű peptidekben is megvalósuló koordinációs módok mellett a harmadik helyen található aszparaginsav révén ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \beta\text{-COO}^-$) koordináció alakulhat ki. Ettől függetlenül a C-terminális részen az imidazolnitrogén – mint horgony – kötődésével ($\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N(Im)}$) koordinációjú komplex szintén keletkezhet.

A pH-potenciometriás, UV-Vis és CD-spektroszkópiás vizsgálatok azt mutatják, hogy a tanulmányozott szekvencia savas tartományban Cu(II)- , Ni(II)- és Zn(II)- ionokkal MLH, illetve utóbbi kettővel ML összetételű komplexet is képez, melyek csupán az imidazolnitrogén protonáltságában különböznek egymástól. Mindegyik esetben stabilitásnövekedés volt megfigyelhető az egyszerű peptidekhez képest, ami a karboxilátcsoporttal és/vagy az imidazolnitrogénnel való gyenge kölcsönhatásra utalhat.

A pH emelésével Cu(II)- és Ni(II)- ionok jelenlétében az amidnitrogének kooperatív módon deprotonálódtak. Fiziológiás tartományban a Cu(II)- ionok esetében már ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \beta\text{-COO}^-$) koordinációjú komplexek vannak jelen, a Ni(II)- ionok esetében azonban az amidnitrogének deprotonálódása és az említett koordináció kialakulása kissé nagyobb pH-tartomány felé tolódik, mely során az oktaéderes geometriát síknégyszetes elrendeződés váltja fel.

Erősen lúgos tartományban a karboxilátcsoport nem csak a Ni(II)- , hanem a Cu(II)- ionok esetében is kiszorul a koordinációból, és a soron következő deprotonálódott amidnitrogén koordinálódik a fémionhoz. A Ni(II)- ion esetében igen kicsiny mennyiségű ($\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N(Im)}$) koordinációjú komplexek jelenléte is feltételezhető. A Zn(II)- iont tartalmazó rendszerekben nem következik be az amidnitrogének deprotonálódása, a pH növelése a fémion hidrolíziséhez vezetett.

A hisztidin szerepére ugyanakkor fény derült a kétszeres fémfelesleg alkalmazásakor: a ligandum képes volt a Cu(II)- ionok megkötésére. A kétmagvú Cu_2LH_4 , illetve Cu_2LH_5 összetételű komplexekben az ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \beta\text{-COO}^-$) koordináció kiegészült az imidazol-nitrogénről induló ($\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N(Im)}$), illetve ($\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N(Im)}$) koordinációval. Ni(II)- ionok esetében a fémfelesleg egy része hidrolízist szenvedett, a másik fele a deprotonált

amidnitrogénekhez koordinálódott, miközben kevés kétmagvú komplex is képződhetett. Utóbbi esetében izomer szerkezetek kialakulása feltételezhető, bár az eddigi vizsgálatok az aminotermínus felől induló amidnitrogén deprotonálódást húzzák alá.

A tanulmányozott fémionok ezen ligandummal való komplexképzési sajátságait illetően a későbbiekben további információkat remélünk a Cu(II)-komplexek ESR-spektroszkópiás, úgymint a Ni(II)-és Zn(II)-komplexek NMR-spektroszkópiás vizsgálatával. Emellett a harmadik helyen álló aszparaginsav szerepét kívánjuk mélyebben megérteni annak a hasonló térkitöltésű, nem koordinálódó valinra való kicserélésével.

6. Irodalomjegyzék

1. N.N. Greenwood-A. Earnshaw: *Az elemek kémiája*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2004).
2. Kiss T., Gajda T., Gyurcsik B.: *Bevezetés a bioszervetlen kémiába*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (1999).
3. M.C. Linder: *Biochemistry of Copper*, Plenum Press, New York, p. 1 (1991)
4. K.D. Karlin, Z. Tyeklar (eds.): *Bioinorganic Chemistry of Copper*, Chapman and Hall, New York, p. 506 (1993)
5. W. Kaim, B. Schwedersk: *Bioinorganic Chemistry in Inorganic Elements in The Chemistry of Life*, Wiley, Chichester (1994)
6. N. Kitajima: *Adv. Inorg. Chem.*, **39**, 1, (1992)
7. R.K. Gouch, T.W. Kensler, L.W. Oberlew, J.R.J. Sorenson: *Biochemical and Inorganic Copper Chemistry*, **1**, Adenine, New York, p. 139 (1986)
8. *Nickel and Its Surprising Impact in Nature*, eds. Astrid Sigel, Helmut Sigel and Roland K. O. Sigel, John Wiley and Sons Ltd. (2007)
9. N.E. Dixon, R.L. Blakeley, B. Zerner: *Can. J. Biochem.*, **58**, 469 (1980)
10. A.S. Prasad: *Biochemistry of Zinc*, Plenum Press, New York, p. 303 (1993)
11. D. Bryce-Smith: *Chem. Br.*, **25**, p. 783-6, 1207 (1986)
12. B.L. Vallee, D.S. Auld: *Acc. Chem. Res.*, **26**, 543 (1993)
13. Hadjiliadis, N.D. (ed.), *Cytotoxic, Mutagenic and Carcinogenic Potential of Heavy Metals Related to Human Environment*, Vol. 26, Sarkar, B.: *Design of Proteins with ATCUN motif which Specifically Cleave DNA*, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 477-491 pp. (1997)
14. Folio Bound VIEWS: *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Version 3.1a, John Wiley & Sons, Ltd (1994)
15. I. Sóvágó: *Biocoordination Chemistry in Metal Complexes of Peptides and Derivatives* (ed. K. Burger), Ellis Horwood, Chichester, p.135-184 (1990)
16. T. Kiss: *Complexes of Amino Acids in Biocoordination Chemistry* (ed.: K. Burger), Ellis Horwood, Chichester (1990)
17. A. Kaneda, A.E. Martell, *J. Coord. Chem.*, **4**, 159 (1975)
18. A. Gergely, I. Nagypál, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 104 (1977)
19. E. Farkas, T. Kiss, *Polyhedron*, **8**, 2463 (1989)
20. M. Sheinblatt, E.D. Becker, *J. Biol. Chem.*, **242**, 3159 (1967)
21. H. Kozlowski, *Chem. Phys. Letters*, **46**, 519 (1977)
22. M.K. Kim, A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 914 (1966)
23. H. Dobbie, W.O. Kermack, *Biochem. J.*, **59**, 257 (1955)
24. M.K. Kim, A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 872 (1969)
25. M.T. Barnet, H.C. Freeman, D.A. Buckingham, I. Nan Hsu, D. van der Helm, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1523 (1970)
26. R.B. Martin, M. Chamberlin, J.T. Edsall, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 495 (1960)
27. M.K. Kim, A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5138 (1967)

28. G. Davies, K. Kustin, R.F. Pasternack, *Inorg. Chem.*, **8**, 1535 (1969)
29. T.F. Dorogatti, E.J. Billo, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **37**, 1515 (1975)
30. A. Kaneda, A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 1586 (1977)
31. G. Brookes, L.D. Pettit, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2106 (1975)
32. H. Sigel, R.B. Martin, *Chem. Rev.*, **82**, 385 (1982)
33. R.B. Martin in *Metal Ions in Biological Systems* (Ed.: H. Sigel), **23**, pp. 123-164, Dekker, New York (1988)
34. M.K. Kim, A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 872 (1969)
35. H.C. Freeman, J.M. Guss, R.L. Sinclar, *Acta Cryst. B* **34** 2459 (1978)
36. D.W. Margerum, G.R. Dukes, *Metal Ions in Biological Systems*, **1**, 158 (1974)
37. D.L. Rabenstein, S. Libich, *Inorg. Chem.*, **11**, 2960 (1972)
38. H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, *Coord. Chem. Rev.*, **184**, 319 (1999)
39. H. Sigel, R.B. Martin, *Chem. Rev.*, **82**, 385 (1982)
40. H. Kozłowski, T. Kowalik-Jankowska, M. Jezowska-Bojczuk, *Coord. Chem. Rev.*, **249**, 2323 (2005)
41. A. Myari, G. Malandrinos, Y. Deligiannakis, J.C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, Z. Nagy, I. Sóvágó, *J. Inorg. Biochem.*, **85**, 253 (2001)
42. I. Sóvágó, G. Petocz, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1717 (1987)
43. R. Agarwal, D. Perrin, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 268 (1975)
44. B. Radomska, T. Kiss, I. Sóvágó, *J. Chem. Soc., Chem. Res. (S)*, 156 (1987)
45. N.I. Jakab, B. Gyurcsik, T. Körtvélyesi, I. Vosekalna, J. Jensen, E. Larsen, *J. Inorg. Biochem.*, **101**, 1376 (2007)
46. G.F. Bryce, R.W. Roeske, F.R.N. Gurd, *J. Biol. Chem.*, **240**, 3837 (1965)
47. R. B. Martin, J.T. Edsall, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1107 (1960)
48. S. Bruni, F. Cariati, P.G. Daniele, E. Prenesti, *Spectrochim. Acta, Part A*, **56**, 815 (2000)
49. Ch. Conato, R. Gavioli, R. Huerrini, H. Kozłowski, P. Mlynarz, C. Pasti, F. Pulidori, M. Remelli, *Biochim. Biophys. Acta*, **1526**, 199 (2001)
50. E. Farkas, I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 611 (1984)
51. K. Takehara, Y. Ide, *Inorg. Chim. Acta*, **183**, 195 (1991)
52. I. Sóvágó, E. Farkas and A. Gergely: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2159 (1982).
53. E. Farkas, I. Sóvágó and A. Gergely: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1545 (1983).
54. P.J. Morris and R.B. Martin: *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **33**, 2913 (1971).
55. R.W. Hay, M.M. Hassan C. You-Quan, *J. Inorg. Biochem.*, **52**, 17-25. (1993)
56. T. Gajda, B. Henry, A. Aubry, J-J. Delpuech, *Inorg. Chem.*, **35**, 586-593. (1996)
57. S.J. Lau, T.P.A. Kruck, B. Sarkar, *J. Biol. Chem.*, **249**, 5878-5884. (1974)
58. N. Camerman, A. Camerman, B. Sarkan, *Can. J. Chem.*, **54**, 1309-1316. (1976)
59. K. Várnagy, J. Szabó, I. Sóvágó, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, G. Micera, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 467 (2000)
60. W. Bal, H. Kozłowski, R. Robbins, L.D. Pettit, *Inorg. Chim. Acta*, **231**, 7 (1995)
61. L.D. Pettit, S. Pyburn, W. Bal, H. Kozłowski, M. Bataille, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3565 (1990)
62. G.F. Bryce, R.W. Roeske, F.R.N. Gurd, *J. Biol. Chem.*, **241**, 1439-1448. (1966)

63. D. Sanna, Cs.G. Ágoston, I. Sóvágó, G. Micera, *Polyhedron*, **20**, 937-949. (2001)
64. M. Orfei, M.C. Alcaro, G. Marcon, M. Chelli, M. Ginanneschi, H. Kozlowski, J. Brasun, L. Messori, *J. Inorg. Biochem.*, **97**, 299-307. (2003)
65. B. Decock-Le Reverend, F. Liman, C. Livera, L.D. Pettit, S.I. Pyburn, H. Kozlowski, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 887 (1988)
66. J.-F. Galey, B. Decock Le-Reverand, A. Lebkiri, L.D. Pettit, S.I. Pyburn, H. Kozlowski, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2281 (1991)
67. H. Kozlowski, A. Lebkiri, Ch. O. Onindo and L.D. Pettit, *Polyhedron*, **14**, 211 (1995)
68. B. Decock Le-Reverand, L. Andrianarijaona, C. Livera, L.D. Pettit, I. Steel, H. Kozlowski, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2221 (1986)
69. J.-F. Galey, H. Kozlowski, L.D. Pettit, *J. Inorg. Biochem.*, **44**, 149 (1991)
70. G. Malandrinos, M. Louloudi, Y. Deligiannakis, N. Hadjiliadis, *Inorg. Chem.*, **40**, 4588 (2001)
71. A. Gergely, E. Farkas, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 381 (1982)
72. I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely, *Inorg. Chim. Acta*, **93**, L53 (1984)
73. I. Sóvágó, B. Radomska, I. Schön, O. Nyéki, *Polyhedron*, **9**, 825 (1990)
74. I. Sóvágó, C. Bertalan, L. Göbl, I. Schön, O. Nyéki, *J. Inorg. Biochem.*, **55**, 67 (1994)
75. T. Kowalik-Jankowska, M. Jasionowski, L. Lankiewicz, *J. Inorg. Biochem.*, **76**, 63 (1999)
76. H.M. Irwing, M.G. Miles, L.D. Pettit, *Anal. Chim. Acta*, **38**, 475 (1967)
77. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1196 (1985)
78. L. Zékány, I. Nagypál, (Ed. D. Leggett, Plenum Press, New York) *Computational Methods for Determination of Formation Constants*, 291 (1985)
79. G. Eriksson, *Anal. Chim. Acta*, **112**, 375 (1979)
80. H. Kozlowski, G. Micera, *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids* (eds.: G. Berthon, Marcel Dekker Inc., New York), Vol. **1**, p. 566 (1995)
81. D. Nguyen, R. Seyer, A. Heitz, B. Castro, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 1025 (1985)
82. C.R. Cantor and P.R. Schimmel: *Biophysical Chemistry*, 2, Chapter 8 (1980)
83. G. Gran, *Acta Chem. Scand.*, **4**, 559 (1950)
84. A. Gergely, I. Nagypál, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1109 (1977)
85. B. Decock, A. Lebkiri, C. Livera, L. Pettit, *Inorg. Chim. Acta*, **124**, L19 (1986)
86. Kállay Csilla: Oldalláncban karboxil-és imidazolilcsoportot tartalmazó aminosav-és peptidszármazékok átmenetifém-komplexei (PhD-értekezés, Debreceni Egyetem, 2005).
87. C. Kállay, I.Turi, S. Timári, Z. Nagy, D. Sanna, G. Pappalardo, P. de Bona, E.Rizzarelli, I. Sóvágó, *Monatsh. Chem.*, **142**, 411–419. (2011)
88. Kállay Csilla, nem közölt adatok
89. Cs.G. Ágoston, Zs. Miskolczy, Z. Nagy and I. Sóvágó, *Polyhedron*, **22**, 2607 (2003)
90. I. Turi, C. Kállay, D. Szikszai, G. Pappalardo, G. Di Natale, P. De Bona, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, *J. Inorg. Biochem*, **104**, 885-891 (2010)

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni *Dr. Fábán István* tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette számomra dolgozatom elkészítését a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken.

Nagy köszönettel tartozom témavezetőmnek, *Dr. Kállay Csilla* tudományos főmunkatársnak, aki mindvégig határtalan türelemmel, odafigyeléssel, hasznos tanácsokkal segítette munkámat.

Köszönetemet szeretném kifejezni *Dr. Sóvágó Imre* professzor emeritusnak, aki folyamatosan nyomon követve munkámat, segített a felmerülő kérdések tisztázásában.

Köszönöm *Dr. Várnagy Katalin* egyetemi docensnek a számításokkal és a mérésekkel kapcsolatos problémákban nyújtott segítségét.

Köszönöm *Dr. Kurtán Tibornak* és *Dr. Antus Sándornak*, hogy lehetőséget biztosítottak számomra a CD-mérések elvégzéséhez.

Köszönöm *Dr. Nagy Zoltánnak* az informatikai háttér biztosításában nyújtott segítségét.

Köszönet illeti a *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport* tagjait, akik a laboratóriumi munkával kapcsolatos tanácsok mellett a munkához nyugodt és ösztönző légkört biztosítottak.

Hálával tartozom családomnak türelmükért, biztatásukért, támogatásukért.

Köszönöm az OTKA-NKTH 77586, a TÁMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007, valamint a TÁMOP 4.2.2/B-10/-1-2010-0024 pályázatok támogatását.