

Doktori (Ph.D.) értekezés

Simon Ida Noémi

**FEHÉRJÉK FÉMKÖTŐ TULAJDONSÁGAINAK MODELLEZÉSE
TÖBBCÉLÚ FELHASZNÁLÁSRA ALKALMAS PEPTIDEK
FÉMKOMPLEXEIVEL**

Témavezetők:

Dr. Gajda Tamás

Dr. Gyurcsik Béla



Szegedi Tudományegyetem

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

MTA-SZTE Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport

2008

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Célkitűzések	3
3. Irodalmi előzmények	6
3.1. A fémionok szerepe az élő szervezetben; metalloenzimek.....	6
3.1.1 Réztartalmú enzimek	7
3.1.2. Cinktartalmú enzimek	11
3.1.3. Nikkeltartalmú enzimek.....	14
3.2. A modellrendszerek általános jellemzői.....	15
3.2.1. A fémionok tulajdonságai	16
3.2.2. A peptidtípusú ligandumok sajátosságai	17
3.3. A hisztidintartalmú peptidek fémkomplexei	19
3.3.1. Az egy hisztidint tartalmazó peptidek réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)komplexei	19
3.3.2. Több hisztidint tartalmazó, C- és N-terminális csoportokon védett oligopeptidek réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)komplexei	25
3.3.3. Prolin beépítése a peptidszekvenciába.....	27
4. Vizsgált ligandumok:.....	30
5. Kísérleti- és vizsgálati módszerek	32
5.1. Szilárd fázisú peptidszintézis (SPPS).....	32
5.2. Folyadékkromatográfia (HPLC).....	34
5.3. pH-potenciometria.....	34
5.4. UV/látható spektrofotometria.....	36
5.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia	36
5.6. ESR spektroszkópia	38
5.7. Tömegspektrometria (ESI-MS).....	38
5.8. Molekuláris biológiai módszerek	39
5.8.1. Fehérjék előállítására kidolgozott módszer Glutathion S-transferáz gén-fúziós rendszer segítségével.....	40
5.8.2. Fémionkötő tulajdonságok vizsgálata nikkel-affinitás kromatográfiával	41
5.9. Fehérje-kristallográfia.....	41
5.10. Aktivitásvizsgálatok oxidatív reakciókban.....	43
5.10.1. Pirokatechin-oxidáz aktivitás mérése	43
5.10.2. Szuperoxid-dizmutáz aktivitás mérése	45
5.11. Hidrolitikus aktivitás vizsgálatok.....	46
5.11.1. Aktivált foszfátészter hidrolízise.....	46
5.11.2. DNS hidrolízisének vizsgálata	48
6. Kísérleti eredmények és értékelésük	50
6.1. A HisGlyGly, GlyHisGly, GlyGlyHis, HisAlaAla, AlaHisAla, AlaAlaHis, Ac-HisGlyGly-NH₂ tripeptidek réz(II)komplexeinek CD spektroszkópiái vizsgálata.....	50
6.1.1 Réz(II)- Xaa-Xaa-His komplexek	51
6.1.2. Réz(II)-Xaa-His-Xaa komplexek	55
6.1.3. Réz(II)-His-Xaa-Xaa komplexek	57
6.1.4. Réz(II)-Ac-His-Gly-Gly-NH ₂ komplexek.....	61
6.1.5. Réz(II)-tripeptid rendszerekkel kapcsolatos eredmények összefoglalása.....	63
6.2. Hisztidinben gazdag peptidkomplexek oldatkémiai viselkedése	64
6.2.1. Az Ac-HisProHisHis-NH ₂ ligandum réz(II)-, cink(II)- és nikkel(II)komplexei	65
6.2.2. Ac-HisProHisProHis-NH ₂ és Ac-LysHisProHisProHisGln-NH ₂ ligandumok réz(II)- és cink(II)komplexei	72
6.3. Fehérjék fémkötő helyeinek modellezése a P20 és P24 oligopeptidek segítségével....	81
6.3.1. A GST-P20 és GST-P24 fúziós fehérjék előállítása	83
6.3.2. A GST-P20 és GST-P24 fúziós fehérje fémkötő tulajdonságai	84
6.3.3. A GST-P20 fúziós fehérje kristályosítása.....	87

6.3.4. Ac-P20-NH ₂ oldategyensúlyi viszonyai.....	88
6.4. Katalitikus aktivitás vizsgálatok.....	93
6.4.1. Pirokatechin-oxidáz aktivitás vizsgálata.....	93
6.4.2. SOD aktivitás vizsgálata.....	95
6.4.3. Hidrolitikus aktivitás-vizsgálat – aktivált foszfátészter átésztereződése.....	99
6.4.4. DNS hidrolízisének vizsgálata.....	102
7. Összefoglalás.....	106
8. Summary.....	110
9. Rövidítések.....	114
10. Hivatkozott közlemények jegyzéke.....	115
Függelék.....	i
F.1. A GST-fúziós fehérjék előállítása és tisztítása ioncsere, illetve affinitás kromatográfiával.....	i
F.2. A mikrobiológiai munka során használt oldatok és a gélek elkészítéséhez szükséges anyagok.....	iv
F.3. A mikrobiológiai munka során használt GST fúziós fehérje kristályszerkezete.....	vi
F.4. A GST-P20 szekvenciája.....	vi
F.5. A GST-P24 szekvenciája.....	vi
F.6. Ac-P20-NH ₂ tömegspektruma.....	vii
A disszertáció alapját képező közlemények.....	viii
Egyéb közlemények.....	viii
Konferenciák.....	viii
Köszönetnyilvánítás.....	xi

1. Bevezetés

A biológiai folyamatokban a különböző kémiai reakciók végbemenetelét katalizátorok segítik elő, amelyek meghatározzák a kémiai átalakulások mechanizmusát, és csökkentik a reakciók lejátszódásához szükséges aktiválási energiát. Ezen biokatalizátorok legnagyobb része speciális fehérje, melyeket enzimeknek nevezünk. Az eddigi ismereteink alapján, a természetben előforduló enzimek egyharmada tartalmaz fémion(oka)t. Az átmenetifémek első sorában található elemek, a Sc és Ti kivételével, fontos szerepet játszanak a biológiai rendszerekben. Több ezer ún. metalloenzim szerkezetének és aktivitásának kialakításában vesznek részt, amire a részlegesen betöltött d pályák miatt kialakuló változatos oxidációs állapot, és koordinációs geometria nyújt lehetőséget. Mivel a metalloenzimek a biokémiai folyamatok minden szintjén meghatározó szerepet játszanak, szerkezetük és működésük leírása alapvető fontosságú a biológiai rendszerek megismerését illetően.

A fémionok az enzim által katalizált reakciót többek között a fehérje szerkezetének stabilizálásával, a szubsztrátmolekula megkötésével és elektrosztatikus aktiválásával, elektron akceptor illetve -donor sajátosságuk révén, a támadó (például nukleofil hidroxidion) reaktáns kialakításával, illetve a reakciók során keletkezett intermedierek stabilizálásával segíthetik elő. A hidrolitikus enzimek leggyakoribb alkotóeleme a cink(II)-, illetve a magnézium(II)ion, míg a redoxifolyamatok katalízisében a vas-, réz- és mangánionok kapnak leginkább szerepet.

A modellvegyületek tanulmányozása, szem előtt tartva e rendszerek korlátait, lehetővé teszi, hogy a metalloenzimek működéséről pontosabb képet kaphassunk. A koordinációs és a bioszervetlen kémia területén, az átmenetifém-komplexek vizsgálata révén a fémionok szerepét a biológiai rendszerekben, illetve több konkrét enzimátikus mechanizmust is sikerült feltérképezni.

A kis molekulatömegű modellvegyületek számos előnnyel bírnak a természetes makromolekuláris rendszerekkel szemben: viszonylag olcsón és egyszerűen előállíthatók nagy mennyiségben, és méretük miatt is könnyebben tanulmányozhatók. Amíg az egyéb szerves szintetikus modellvegyületek fémkomplexei révén meglehetősen sikeresnek bizonyult egyes enzimek szerkezeti és funkcionális megközelítése, addig jóval kevesebb ismeret áll rendelkezésünkre a fehérjék fémionkötő helyeinek kis peptidmolekulákkal történő sikeres modellezésére. Ennek egyik oka, hogy a kis peptidok fémion-koordinációja során például a réz(II)ionok már fiziológiás pH-n amid-nitrogén deprotonálódást indukálnak, míg a cink(II)ionokat tartalmazó oldatokból az esetek többségében a fémion teljes vagy részleges hidrolízise miatt csapadék válik ki. Ugyanakkor a természetes enzimek aktív központjában a fémionok szinte kizárólag a fehérjék aminosav-oldalláncain található donorcsoportokhoz (His-imidazol-N, Cys-tiolát-S, Met-tioéter-S, Glu-, Asp-karboxilát-O, Gln-, Asn-karbonil-O) kötődnek. Ezenkívül, amíg a fehérjék a molekulán belüli kölcsönhatások révén jól meghatározott térbeli szerkezetet, s így a fémionok részére megfelelő "üregek" kialakítására képesek, addig erre a kisméretű peptidmolekulák esetén nincs mód.

A megfelelő funkciós csoportokkal ellátott, köztes mérettartományba eső, ún. oligopeptid-molekulák segítségével várhatóan a fenti problémák áthidalhatók. Ilyenek lehetnek az általunk vizsgálni kívánt hisztidinben gazdag peptidek, melyekben az aminosav-sorrend, vagyis a fémionkötő helyek száma és egymáshoz viszonyított helye megfelelő tervezéssel könnyen módosítható a szilárd fázisú szintézis során. A peptidek modellvegyületként történő alkalmazásának előnye még, hogy e molekulák a fehérjékhez hasonlóan aminosavakból épülnek fel, nem testidegen anyagok, és genetikailag kódolhatók. Így biotechnológiai eszközök segítségével viszonylag egyszerűen és olcsón tudunk a fémion-megkötő peptidekből olyan molekulákat összeállítani, melyek (i) mesterséges enzimekként a természetes enzimektől eltérő specifikusságot, funkciót és/vagy nagyobb hatékonyságot mutatnak, illetve (ii) toxikus fémionakkumuláció révén környezeti remediációra (szennyező anyagok biológiai lebontása mikroorganizmusokkal) alkalmasak. Napjainkban széles körben kutatják ezen területeket, és e kutatások sikeréhez, reményeink szerint jelen doktori disszertáció anyaga is távlati szinten hozzájárulhat.

2. Célkitűzések

1. A több hisztidint tartalmazó peptidek koordinációs kémiája igen bonyolult. A peptidek tagszámának növelésével a vizsgálati módszerek lehetőségei is korlátozottabbá válnak egyrészt a rendelkezésre álló viszonylag kis anyagmennyiségek, másrészt a molekulák nagyobb mérete miatt. A cirkuláris dikroizmus spektroszkópia, amit a fehérjék tanulmányozásában is gyakran alkalmaznak, a peptidkomplexek vizsgálatának hatékony módszere. Ismert, hogy a fémion-koordináció típusa már a kis tagszámú hisztidin-tartalmú peptidkomplexeknél is erősen függ a hisztidinnek az aminosav-sorrendben elfoglalt helyétől. **Célul tűztük ki ezért, (i) hogy az egyszerű hisztidintartalmú tripeptidek réz(II)komplexeiben kialakuló lehetséges kötéstípusokat jobban megismerjük; (ii) hogy a CD spektroszkópia segítségével a spektrumok alakja, előjele és intenzitása, valamint a koordináció módja közötti kapcsolatot jobban megértsük, és ezen összefüggéseket a bonyolultabb rendszerek értékelése során alkalmazhassuk.** Az e vonatkozásban vizsgált tripeptidek a következők voltak: HisGlyGly, GlyHisGly, GlyGlyHis, HisAlaAla, AlaHisAla, AlaAlaHis, Ac-HisGlyGly-NH₂.

2. A kis tagszámú, hisztidintartalmú peptidek fémion-koordinációja a bioszervetlen kémia egyik legérdekesebben vizsgált területe [1–4], mivel a hisztidin a metalloenzimek aktív központjában szinte kivétel nélkül megtalálható. Azonban mint ismeretes, a réz(II)ionok a kis tagszámú peptideknél általában hisztidin jelenlétében is amid-nitrogén deprotonálódást idéznek elő már fiziológiás pH-n. Ez néhány fehérje (például a humán szérum albumin, vagy a prion fehérjék) fémion körül kialakított szerkezetének felderítésében igen nagy segítséget jelentett, de lényegesen csökkenti a fémion Lewis-sav jellegét, valamint stabilizálja a Cu^{II} oxidációs állapotot és így a katalízisre való hajlamot. Ezért a metalloenzimek modellezésében nagy jelentőségük lehet a több hisztidint tartalmazó peptideknek, amelyek várhatóan a fiziológiás pH körüli tartományban csupán az imidazol-nitrogéneknek keresztül koordinálnak a fémionokhoz. **A disszertációm fő irányvonalát a fentiek alapján hisztidinben gazdag oligopeptidek előállítása, réz(II)-, cink(II)- és esetenként nikkel(II)komplexeinek tanulmányozása alkotja. E modellvegyületeken keresztül egyrészt a fémionok megkötődésének szerkezeti és termodinamikai viszonyait tanulmányozhatjuk, másrészt enzimek funkcionális modellezésére nyújtanak lehetőséget.**

Mivel célunk a fehérjék és főként a metalloenzimek fémionkötő tulajdonságainak modellezése, olyan rendszerek vizsgálatát tervezzük, amelyek a lehető legjobban tükrözik a természetben előforduló viszonyokat. A tanulmányozott peptidmolekulák N-terminális végét ezért acetilcsoporttal védtük, C-terminális végük pedig a szokásos karboxilcsoport helyett savamidcsoportot tartalmazott. Így meggátolható a C-terminális karboxil-, valamint az N-terminális aminocsoport koordinációja. Az utóbbi például N-terminális helyzetben lévő hisztidin esetén igen stabilis hisztamintípusú (NH₂ és ImN) koordinációban vesz részt, ám az acetilezés miatt ehelyett a hisztidin oldallánc (ImN) koordinációja vizsgálható. A munkánk kezdetén már ismert irodalmi eredmények azt mutatták, hogy a nem védett

hisztidinben gazdag peptidek réz(II)komplexeinek képződése során nagy termodinamikai stabilitást biztosító, öt- és hattagú kelátgyűrűk alakulnak ki, az esetek többségében már fiziológiás pH-n, az amid-nitrogén koordinációja révén. Jelenleg is több kutatócsoport foglalkozik ilyen típusú peptidek fémkomplexeinek tanulmányozásával. A napvilágot látott újabb eredmények is arra utaltak, hogy három, vagy akár több hisztidin beépítése a peptidláncba védett peptidek esetén sem képes megakadályozni az amid-nitrogén koordinációját a réz(II)- és nikkel(II)komplexekben. Ugyanakkor a cink(II)ionok ezen ligandumok többségével is csapadékot képeztek. Megfelelő megoldásnak tűnt egy vagy több prolin beépítése a peptidszekvenciába, ugyanis a szekunder amidkötést kialakító prolin töréspontot jelent a sorozatos amid-nitrogén koordinációban. A poláros oldallánccal rendelkező aminosavak beépítésével a vízzoldhatóság növelése volt a célunk. **A kísérleti munkánk során ezért a következő hisztidinben gazdag, prolin aminosava(ka)t tartalmazó oligopeptideket állítottuk elő: Ac-HisProHisHis-NH₂, Ac-HisProHisProHis-NH₂ és Ac-LysHisProHisProHisGln-NH₂.**

3. Sok esetben a kistagszámú peptidek fémkomplexeinek enzimmodellként való alkalmazása korlátokba ütközik, mivel a koordinációs mód és a kinetikai sajátságok nagymértékben különböznek a natív enzimekétől. Emellett a természetes enzimekben gyakran két- vagy többmagvú aktív központok találhatók. **Célunk volt ezért, hogy nagyobb tagszámú peptideket is vizsgáljunk, amelyek alkalmasak lehetnek két fémion megkötésére is.** E peptidek további előnye lehet, hogy rendelkezhetnek stabilis másodlagos szerkezettel. Így a fémion a peptid által részben előre kialakított üregben helyezkedhet el, ami a komplex kinetikai stabilitásának növekedését eredményezheti.

E területen első lépésként a bíforsav-foszfataáz enzimek aktív centrumának modellezését terveztük. Ezen enzimes család tagjai kétmagvú aktív központtal rendelkeznek, mely igen hatékonyan bizonyul a hidrolitikus katalízisben, valamint e fémionkötő hely az evolúció során változatlan maradt. A bíforsav-foszfataáz enzimek aktív központjának mintájára nemzetközi együttműködés keretén belül olyan oligopeptideket tervezünk, amelyek képesek lehetnek stabil gerinckonformáció kialakítására, és bennük két fémion (vas(III)- és cink(II)ion) részére található kötőhely. **Molekuláris dinamikai számítások alapján egy 20 és egy 24 aminosavból álló oligopeptidet választottunk ki vizsgálataink célpontjául, melyek aminosav-sorrendje:**

P20:

TyrLysAspProProThrAspHisLeuAspGlnArgValLeuAspLeuProHisHisAsn, és

P24:

AspProProGlnValProHisLeuTyrGlyLeuPheGlnIleAsnAspThrValHisGlyCysCysHisAsn.

Célul tűztük ki ezen peptidek előállítását és fémionkötő sajátságainak tanulmányozását. A szintézishez elsőként a mikrobiológiai úton történő előállítást választottuk, az ún. rekombináns DNS technológiát alkalmazva. Ennek során a peptidet kódoló gént beépítjük egy hordozó DNS-be (*plazmid vektor*), majd ezt baktériumokba juttatva (*transzformálás*), azok a célpeptidet termelni kezdik (*kifejezés*). Az ún. GST génfúziós rendszert alkalmazva, az előállított peptid N-terminális részén egy *Glutathion S-*

transzferáz (GST) fehérjemolekula található (*fúziós fehérje*). A fúziós GST-P20 és GST-P24 fehérje fémionkötő tulajdonságainak vizsgálatára UV-CD spektroszkópiás, illetve affinitás-kromatográfiai méréseket terveztünk. A fehérjerész esetleges zavaró hatásának kiküszöbölése érdekében, szilárd fázisú peptidszintézissel is előállítható az N-, és C-terminális részein védett peptidmolekula, melynek fémkomplexeit oldategyensúlyi, UV/látható- és CD spektroszkópiai módszerekkel tanulmányozhatjuk.

4. A foszforsavészteráz enzimek, azaz a természetes makromolekuláris szubsztrátok (DNS, RNS, foszforilált fehérjék) foszforsav-észter kötéseinek hidrolitikus hasításáért felelős enzimek biológiai szerepe igen jelentős és szerteágazó. Ezen molekulák meghatározó jelentőségűek a nukleinsavak metabolizmusában, a szervezet energiaháztartásában, vagy a különböző fehérje, illetve enzimaktiválási folyamatokban.

Munkánk egyik célja foszforsav-diészteráz - ezen belül nukleáz - enzimek funkcionális modelljeinek kialakítása volt, amelyek modell-szubsztrátok (például aktivált foszfátészter kötést tartalmazó vegyületek), illetve természetes makromolekuláris szubsztrátok (például cirkuláris DNS) hidrolízisét képesek elősegíteni. E célból a fenti 2. pont alatt felsorolt ligandumok cink(II)- és réz(II)komplexeinek, valamint a 3. pont alatti peptidek vas(III)/cink(II) kétmagvú komplexeinek hidrolitikus aktivitását tanulmányoztuk.

A vizsgált rendszerek réz(II)komplexei redoxireakciók katalizálására kitűnő lehetőséget nyújthatnak, a réz(II)ion reverzibilis oxidációja és redukciója révén a katalitikus ciklus során. **A 2. pontban felsorolt ligandumok réz(II)komplexei alkalmasak lehetnek a szuperoxid-dizmutáz (SOD) vagy pirokatechin-oxidáz enzimek funkcionális modellezésére is, melynek vizsgálata szintén doktori munkám célját képezte.**

3. Irodalmi előzmények

3.1. A fémionok szerepe az élő szervezetben; metalloenzimek

Az élő szervezetben a fémionok számos folyamatban vesznek részt. Szabályozó szerepet játszanak például a sejtek közötti gyors információáramlásban és a metabolikus folyamatokban (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}). Szerkezet-stabilizáló hatásuk révén nemcsak a csontok és fogak keménységéért felelősek, de segítenek kialakítani a fehérjék funkcionális térbeli elrendeződését (Ca^{2+} , Zn^{2+}). Elektron-szállító láncok részei, mint például a vastartalmú citokrómokban és ferredoxinokban, vagy a „kék réz” típusú azurin és plasztocianin metalloproteinekben. A leggyakoribb redoxirendszerek alkotói a $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{IV}}$, $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$, $\text{Mn}^{\text{II}}/\text{Mn}^{\text{III}}/\text{Mn}^{\text{IV}}$, $\text{Mo}^{\text{IV}}/\text{Mo}^{\text{V}}/\text{Mo}^{\text{VI}}$, $\text{Co}^{\text{I}}/\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{III}}$, $\text{Ni}^{\text{I}}/\text{Ni}^{\text{II}}/\text{Ni}^{\text{III}}$, ahol a szokatlan oxidációs állapotokat a bioligandumok stabilizálják. A fémionok különböző metallokoenzimekben és metalloenzimekben betöltött szerepe is nélkülözhetetlen. Csak néhány példát említve: a B_{12} koenzim nélkülözhetetlen eleme a Co, a karboxipeptidázoké és az alkohol dehidrogenázoké a Zn, a szuperoxid-dizmutáz enzimeké a Cu és Zn, az ureázoké a Ni vagy a citokróm P-450 enzimé a Fe. Az O_2 szállítását és tárolását a vastartalmú hemoglobin, hemeritrin, és mioglobin, illetve a réztartalmú hemocianin végzik. Az egyéb kismolekulák, mint például a molekuláris nitrogén, hidrogén, metán, CO és CO_2 megkötésében, aktiválásában és átalakításában is szerepet játszanak a különböző átmenetifémionok, mint a Fe, Mn, Mo, V, Ni vagy Cu [5,6].

E fejezetben a metalloenzimekkel foglalkozunk részletesebben, de a teljesség igénye nélkül. Előtte azonban tekintsük át az enzimek legfontosabb jellemzőit. Az enzimek hatékony és specifikus biokatalizátorok, mind a reakció típusát tekintve, mind pedig a reaktáns (szubsztrát) kiválasztásában. Számos enzim katalitikus aktivitása a fehérje mellett jelen lévő kismolekulák jelenlététől függ, melyeket *kofaktoroknak* nevezünk. Ezek két csoportba oszthatók: (i) fémionok és komplexeik, illetve (ii) kis szerves molekulák. Az enzimeket leggyakrabban az általuk katalizált reakció típusa szerint a következő hat csoportba sorolják: (1) oxido-reduktázok (redoxireakciók katalizálása), (2) transzferázok (csoport átvitel, szállítás), (3) hidrolázok (hidrolízis), (4) liázok (kettős kötés kialakítása), (5) izomerázok (izomer átalakulások), (6) ligázok (kötés kialakítása) [7]. Az enzimek ezen információt általában a nevükben hordozzák, az általuk specifikusan kötött szubsztrátra utaló jelölések mellett.

A szubsztrát az enzim egy specifikus részéhez kötődik, amely vagy maga az aktív központ, vagy egy ahhoz közeli szubsztrátkötőhely. A fehérje szerkezetében kialakított csatornák polárosságuk, illetve töltésük révén a szubsztrát megkötését segítik elő. A szubsztrát reverzibilisen, többnyire gyenge másodlagos kötésekkel kapcsolódik az enzimhez. A jellemző specifikus szubsztrát megkötés klasszikus módon egy kulcs-zár modellel írható le, bár az újabb elképzelések szerint ez egy dinamikus felismerési folyamat, melynek során az aktív központ a szubsztrát bekötődése után veszi fel az átmeneti állapotra jellemző alakját. Az enzimek nagy hatékonysága többek között annak tulajdonítható, hogy képesek a szubsztrátot olyan formában megkötni, hogy annak geometriája és elektroneloszlása a lejátszódó reakció átmeneti állapotának megfelelően alakul. Az aktív központ mindig egy háromdimenziós rés vagy üreg,

melyet néhány, az aminosav-sorrend alapján általában egymástól távol elhelyezkedő aminosav-oldallánc alakít ki.

Ma már sok olyan enzim szerkezetét ismerjük, melyek egy vagy több fémiont tartalmaznak az aktív központjukban vagy annak közvetlen közelében. Ezekben a metalloenzimekben a fémion vagy fémionok állandóan jelen vannak, és részt vesznek az enzim szerkezetének kialakításában, a szubsztrát megkötésében, illetve a katalízisben. Egyes enzimek aktív központjában két, esetenként három fémion található, melyeknek együttműködése elősegíti a hatékony katalitikus aktivitást. Legtöbbször a fémionoknak nem azonos szerep jut. Az egyik lehet szubsztrátkötőhely, vagy szerkezetstabilizáló szerepe van, míg a másik a katalízisben vesz részt, de az is előfordulhat, hogy a katalitikus ciklus során a fémionok szerepe felcserélődik. Az egymáshoz viszonylag közel elhelyezkedő fémionok helyzetét μ -oxo-, hidroxo-, vagy egyéb fehérje funkciós csoportokon keresztül létrejövő hidak stabilizálhatják.

A továbbiakban a fémionok szerinti csoportosításban néhány jellemző, és/vagy a dolgozatban a későbbiekben is szereplő enzimet mutatunk be röviden.

3.1.1 Réztartalmú enzimek

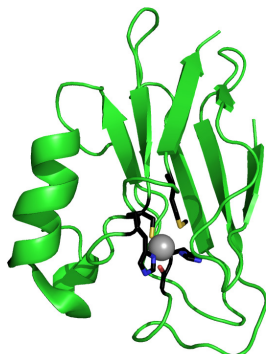
Az élő szervezetben a legtöbb vastartalmú enzimnek megvan a réztartalmú hasonló funkciójú analógja (többnyire alacsonyabb rendű élőlények esetén), mint például a reverzibilis O_2 megkötésre és szállításra alkalmas hemoglobin és hemeritrin párja a rézet tartalmazó hemocianin, az elektron-transzfer végző citokrómoké a „kék réz” fehérjék, vagy az oxidázok, oxigenázok és peroxidázok párjaként például az amin-oxidázok, lakkázok, kvercetin-dioxigenáz vagy a szuperoxid-dizmutáz enzimek.

A rézionoknak nagy az affinitása a N és S donoratomokhoz, így a réztartalmú enzimek esetében a hisztidin aminosav imidazolgyűrűjének nitrogén atomja(i) a legfontosabb fémkötő helyek, mind a Cu^I , mind a Cu^{II} oxidációs állapotok esetén. A cisztein tiol- és esetenként a metionin tioéter csoportjának S donoratomjai is szerepet játszhatnak a koordinációban.

Szerkezeti és spektroszkópai adatok alapján, a réz-fehérjéket korábban három, napjainkban leginkább négy csoportba sorolják: (i) I-es típusú, ún. „kék réz” fehérjék, (ii) II-es típusú, ún. „nem kék réz” fehérjék, (iii) III-as típusú, kétmagvú réz központot tartalmazó fehérjék, valamint (iv) a három vagy négy réz alegységet tartalmazó IV-es típusú rézfehérjék. Azonban a citokróm-c oxidázokban található, két különböző rézközpontot például Cu_A és Cu_B néven említi az irodalom. A különböző típusokat vegyesen tartalmazó enzimek csoportja is ismert.

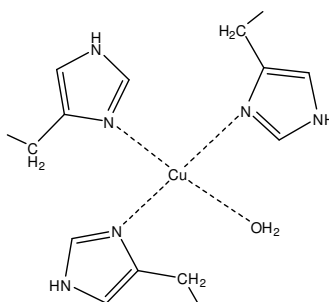
Az I-es típusú rézfehérjék az elektron szállításában vesznek részt, nevüket intenzív kék színükről kapták, mely az S^- (Cys) $\rightarrow Cu^{II}$ ligandum-fém töltésátviteli átmenetnek köszönhető $\lambda_{max} \sim 600$ nm körül, $3000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ körüli moláris abszorbanciával, szemben a $d-d$ átmenetek $200 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ -nél kisebb ϵ értékével. Ezen enzimekben a rézion körüli koordinációs szféra erősen torzult tetraéderes (3+1), vagy trigonális bipiramisos (3+1+1) szerkezetű. Ez sem a Cu^I sem a Cu^{II} oxidációs állapotoknak nem kedvez, ami lehetővé teszi a gyors elektronfelvételt, illetve átadást. A „kék réz” fehérjékben, mint például az azurin, a plasztocianin, illetve a sztellacianin kristályszerkezetének vizsgálatából kiderült, a fémion körül három erősen kötődő ekvatoriális ligandum, két hisztidin

imidazol-nitrogénje ($2 \times \text{ImN}$) és egy cisztein tiolát (S^-) donoratomja, közel síkháromszöges geometriát alakít ki, amit egy metionin tioétercsoportja egészít ki tetraéderessé. Az azurinokban e szerkezet torzult trigonális bipiramissá egészül ki egy peptidkötés karbonil-oxigénjének koordinációja révén (**3.1.1. ábra**).



3.1.1. ábra: Az azurin ábrája az 1AZU pdb¹ kristályszerkezet alapján. A két imidazolgyűrű és egy tiolátcsoport, által alkotott háromszög felett egy metionin tioétercsoportja míg alatta peptidkötés karboniloxigénje kiemelve látható a rézionnal a középpontban. Az ábra a PyMol programmal készült (PyMOL, DeLano Scientific LLC; <http://www.delanoscientific.com>)

Az II-es típusú „nem kék réz” fehérjék közé tartoznak olyan *oxidáz* enzimek (az oxidáz funkció az O_2 redukcióját jelenti – reaktív köztitermékeken keresztül – végső lépésként víz keletkezésével), mint például az amin-oxidázok ($\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$), valamint *oxigenáz* enzimek (az O_2 -molekula oxigénatomjai belépnek a szubsztrátmolekulába, ezáltal oxidálják azt), melyeknek fontos képviselője például a kvercetin-2,3-dioxigenáz ($\text{O}_2 \rightarrow 2$ szubsztrát-O). Ezen metalloenzimek aktív központjának közös jellemzője a három imidazol-nitrogén koordinációja, amint az a **3.1.2. ábrán** látható. A monomer réz(II)komplexek síknégyzetes vagy erősen torzult oktaéderes elrendeződést mutatnak, erős ekvatoriális és gyenge axiális kölcsönhatásokkal. A *d-d* átmeneteknek megfelelően kis moláris abszorpciós koefficienssel ($\epsilon < 200 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$) és jellemző Cu^{II} (d^9) ESR spektrummal rendelkeznek.



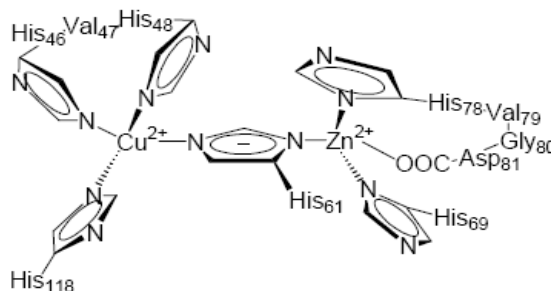
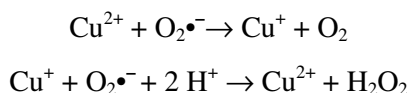
3.1.2. ábra: II-es típusú rézfehérjék aktív központjának sematikus ábrája

A „nem kék réz” fehérjék egy további jelentős képviselője az élő szervezetre rendkívül káros szuperoxid-gyökök lebontásáért felelős Cu,Zn-szuperoxid-dizmutáz (Cu,Zn-SOD) enzim. Szerkezete jól ismert: két, viszonylag kis ($2 \times 16 \text{ kDa}$) alegységből áll. Ezekben egy-egy réz(II)- és cink(II)ion található, melyeket egy hisztidin imidazoláto-hidas formában köt össze. A fémionokhoz koordinálódó

¹ A fehérjék publikált kristályszerkezeti adatai a Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> honlapján hozzáférhetőek. Az atomi koordinátákat a pdb állományok tartalmazzák.

további aminosavak oldalláncai: három hisztidin imidazol-nitrogénje a réz(II)- és két hisztidin imidazol-nitrogénje, valamint egy aszparaginsav karboxilcsoportja a cink(II)ion körül (**3.1.3. ábra**). A réz(II)ionhoz valószínűleg egy vízmolekula is koordinálódik, így a fémion körüli geometria négyzetes piramisos elrendeződést mutat, míg a cink(II)ionhoz torzult síknégyzetes geometria rendelhető [6,8,9]. A SOD enzimek a szuperoxid-gyökanion diszproporcionálódását ($2\text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{O}_2 + \text{O}_2^{2-}$) katalizálják. A reakció során hidrogén-peroxid is keletkezik, melynek diszproporciója O_2 és H_2O végtermékek keletkezését eredményezi kataláz vagy peroxidáz enzimek közreműködésével.

A Cu,Zn-SOD által katalizált folyamat leegyszerűsített mechanizmusa a következő reakcióegyenletekkel írható le:

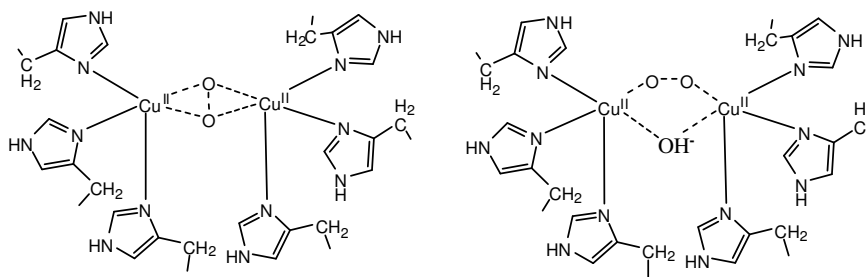


3.1.3. ábra: A Cu,Zn-szuperoxid dizmutáz aktív központja [10]

A réz(II)ion az első lépésben O_2 -né oxidálja az első, a második lépésben pedig a réz(I)ion peroxiddá redukálja a második szuperoxid-gyökaniont. Tehát az enzim egyetlen katalitikus ciklus során két szuperoxid-gyökaniont képes átalakítani, miközben a réz oxidációs állapota a $\text{Cu}^{\text{II}} \rightarrow \text{Cu}^{\text{I}} \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}$, geometriája pedig a négyzetes piramis $\rightarrow$ torzult tetraéder $\rightarrow$ négyzetes piramis változásokon megy át. Feltételezhetően a két fémiont összekapcsoló imidazoláto-híd az enzim működése során felbomlik, majd újra visszaalakul. Ebben a folyamatban a cink(II)ionnak fontos szerepe van, mivel hatására marad a hisztidin olyan helyzetben, hogy az imidazoláto-híd ismét kialakulhasson a katalitikus ciklus végén.

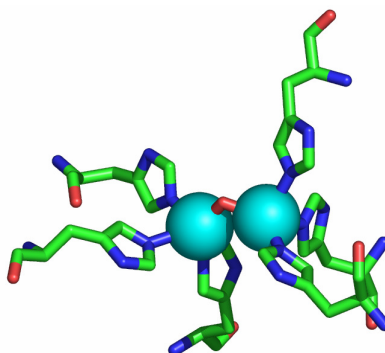
Az III-as típusú rézfehérjék kétmagvú aktív központtal rendelkeznek, ezért a réz(II)iont tartalmazó formájukban is ESR inaktívak az antiferromágneses kölcsönhatásnak köszönhetően. Főként az O_2 szállításában és aktiválásában vesznek részt (hemocianin), de ide tartozik a monooxygenázok közül a tirozináz ($\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{szubsztrát-O}$) enzim is. A hemocianin redukált formájában, az aktív központban két réz(I)ion található, három-három hisztidinnel körülvéve, és egy-egy üres koordinációs hellyel, ahová az O_2 molekula többféle módon is koordinálódhat. Egyik feltételezés szerint, amint az a **3.1.4. ábrán** bal oldalon látható, az O_2^{2-} $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -hídként köti össze a két réz(II)iont, de feltételezhető peroxo-hidas elrendeződés $\mu\text{-}\eta^1\text{:}\eta^1$ formában is (jobb oldali ábra), ahol a fémionokat egy második

ligandum, például egy hidroxidion is hídként kötheti össze. A Cu–Cu távolság jellemzően 360 pm körüli, és az oxigén felvételt követően intenzív abszorpciós sávok jelentkeznek 350 és 600 nm körül az $O_2^{2-} \rightarrow Cu^{II}$ töltésátviteli átmenetnek köszönhetően.



3.1.4. ábra: III-as típusú rézfehérjék csoportjába tartozó hemocianin aktív központjában az O_2 molekula feltételezett megkötődési módjai

A csoport egyik, a továbbiak szempontjából jelentős képviselői a pirokatechin-oxidáz enzimek, melyek a különböző *orto*-difenolok kételektronos oxidációját katalizálják a megfelelő *orto*-kinonná. A termék autopolimerizációja a vöröstől a sötétbarna színig terjedő melanin képződését eredményezi, miközben az O_2 -molekula vízzé redukálódik. Bernt Krebs és munkatársai meghatározták az édesburgonyából izolált pirokatechin-oxidáz háromdimenziós szerkezetét az oxidált $Cu^{II}-Cu^{II}$ és a redukált Cu^I-Cu^I formában is [11]. Az aktív központban lévő mindkét rézion (CuA és CuB) három-három hisztidin oldallánchoz koordinálódik (**3.1.5. ábra**). Az oxidált formában a két fémion egymástól 2,9 Å távolságban helyezkedik el, és a hat imidazol-nitrogénen kívül egy hídligandumként szereplő oldószermolekula, valószínűleg hidroxidion, egészíti ki a trigonális piramisos koordinációs szférát mindkét Cu^{II} körül. Az enzim redukciója során a két fémion közötti távolság jelentősen megnő (4,4 Å), míg a hisztidinek esetén csak kismértékű mozgás figyelhető meg. A katalitikus ciklus során az oldószermolekulát kiszorítja az O_2 , amely peroxidként, $\mu-\eta^2:\eta^2$ hidas formában (hasonlóan a 3.1.4 bal oldali ábrán látottakhoz) kötődik a két $Cu(I)$ ionhoz, így a két fémion közti távolság $\sim 3,8$ Å lesz. Ezt követően a szerzők a pirokatechin-szubsztrát egyik hidroxidcsoportjának deprotonálódását és így monodentát koordinációját valószínűsítik a CuB fémionhoz, miközben annak geometriája jelentősen torzul. A szubsztrát deprotonálódásában valószínűleg szerepe van egy a fémion közelében levő glutaminsavnak is. A CuA koordinációs szférájának ekvatoriális síkjában az O_2^{2-} helyezkedik el. A $turner$ enzim- O_2^{2-} -szubsztrát komplexben az intramolekuláris elektrontranszfer folyamattal párhuzamosan a peroxidsz csoport protonálódása az O–O kötés felhasadását eredményezi. Az aktív központ közelében lévő glutaminsav, valamint a szubsztrát második, nem koordinálódó hidroxilcsoportjának protonja vízmolekula képződését eredményezik, miközben az *o*-kinon termék keletkezik. Ezt követően a hídligandum protonálásával, egy oldószermolekulával újra kialakul a hidroxó-hidas $Cu^{II}-Cu^{II}$ fémközpont. A feltételezések szerint egy újabb szubsztrátmolekula oxidációja eredményezi a rézközpont visszaalakulását a Cu^I-Cu^I állapotba, és ezzel megismétlődhet a katalitikus ciklus.



3.1.5. ábra: A pirokatechin-oxidáz kétmagvú aktív központja a kristályszerkezete alapján. Mindkét réz(II)ion körül trigonális piramisos elrendeződés figyelhető meg három-három hisztidin nitrogén donoratomja és egy oldószermolekula részvételével [11]. Az ábra a PyMol programmal készült

Jónéhány olyan réztartalmú enzimet ismerünk, melyek a fenti csoportok egyikébe sem sorolhatók, ugyanis vagy a rézközpontok újabb típusát tartalmazzák, vagy többféle típusú réz különböző kombinációi találhatók meg aktív központjukban változatos elrendeződést és funkciót alakítva ki.

3.1.2. Cinktartalmú enzimek

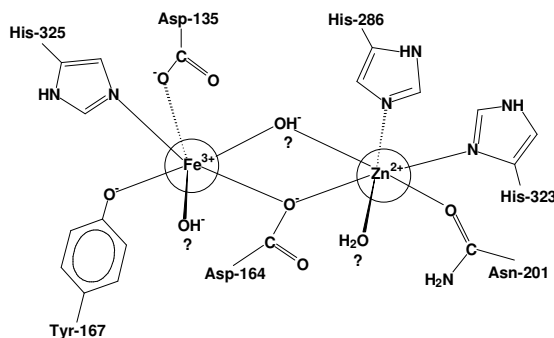
Az emberi szervezetben, a vasat követően, a cink a második leggyakoribb átmenetifém. Fiziológias körülmények között mindig Zn^{II} formában van jelen. Diamágneses és komplexeiben színtelen, a lezárt d^{10} elektron konfigurációnak köszönhetően [12]. A cink(II)ionok, mind termodinamikailag, mind kinetikailag viszonylag stabilis kötéseket alakítanak ki a fehérjékben lévő aminosav-oldalláncokkal (His-ImN, Cys- S^- , glutamát- O^-), viszont gyors ligandumcsere valósul meg az ilyen komplexekben kötött vízmolekulák esetében. Emellett a fémion redoxi szempontból inert, de viszonylag erős Lewis-savként viselkedik (bár Lewis-sav jellegét a hozzá kötődő ligandumok határozzák meg). A cink(II)ionok további jellemzője, hogy a telített d -pályák miatt komplexeiben nincs kristálytér stabilizáció, így a koordinációs szám és a térszerkezet könnyen megváltoztatható, nincs kitüntetett stabilitású koordinációs geometria.

Mindezek a cink(II)ionokat különösen alkalmassá teszik hidrolitikus folyamatok katalízisére a biológiai rendszerekben. A Lewis-sav jellegük miatt a cink(II)ionok képesek fiziológias pH-n a vízmolekulát polarizálni, ezáltal annak pK_s értékét jelentősen lecsökkenteni. Ily módon nukleofil sajátosságú hidroxidion képződik, ami szükséges a hatékony hidrolízishez. A peptid- vagy észterkötések hidrolízise mellett, a fordított irányú, kondenzációs reakciók lejárásához (például az RNS polimerizációját) is képesek katalizálni. A legismertebb hidrolitikus enzimek közé tartoznak a szénsavanhidráz, a karboxipeptidáz A, a mátrix metalloproteinázok, a termolizin, a foszfoprotein-foszfátáz I, az alkalikus-foszfátáz, a bíforsav-foszfátázok, a különböző cinktartalmú nukleázok (HNH nukleázok). A katalitikus funkciók mellett a cink(II)ionok szerkezetalakító sajátossága is igen fontos. Egy példa erre a fentebb már említett Cu,Zn-SOD. Az úgynevezett „cink ujj-fehérjék” pedig a fémion koordinációja révén olyan szerkezetet vesznek fel, aminek segítségével specifikus DNS bázisszekvenciákhoz kötődnek, s így a genetikai információ RNS-be történő átírását szabályozzák (Transzkripció Aktiváló Faktorok).

A szénsavanhidráz ~ 30 kDa molekulatömegű, egyetlen cink(II)iont tartalmaz, és a CO₂ hidratálását katalizálja, ~ 7 – 8 nagyságrenddel gyorsítva a reakciót (mindkét irányban) fiziológiai körülmények között: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Katalitikus hatékonysága a diffúziógátolt határértékhez közelít. Az enzim aktív központjában a három hisztidin mellett egy vízmolekula koordinálódik tetraédes geometriában a pozitív töltésű fémionhoz. Az enzim működésének kulcslépése a fémionhoz kötött vízmolekula deprotonálódása, melyet a cink(II)ion segít elő. Lewis-savas jellege révén, magához vonzza a víz oxigénjének egyik nemkötő elektronpárját, csökkentve ez által az O–H kötés erősségét, és így több mint 7 nagyságrenddel csökkentve a víz pK_s értékét (pK_s ≈ 7). A cink(II)ion szerepe a széndioxid hidrolízisében a vízmolekuláról a proton leszakítása, a szubsztrát megkötése és megfelelő irányítása, hogy reakcióba léphessen a hidroxidionnal, majd a hidrogénkarbonát ion lecserélése egy újabb vízmolekulára.

A *bíborsav-foszfatazok* (BSF) is a cinktartalmú hidrolitikus enzimek egyik családját alkotják. Ezen enzimek fémion-tartalmú glikoproteinek. Baktériumokban, növényekben és emlősökben is előfordulnak. Arilfoszfátok, foszforsavanhidridek, illetve foszfoproteinek foszforilált szerin- és tirozincsoportjainak hidrolízisét katalizálják savas pH optimummal (pH ~ 4,9 – 6). A foszforsav-monoészteráz funkciójuk mellett a vasanyagcsere folyamatokban is részt vehetnek. Általánosan jellemző ezen enzimekre, hogy aktív központjukban mindegyikük két átmenetifémiont, egy Fe^{III}-t és egy M^{II}-t (ahol M^{II} = Fe^{II}, Zn^{II}, Mn^{II}) tartalmaz. Megkülönböztető fizikai sajátságuk az 560 nm-nél jelentkező fényelnyelésük, ami a O⁻(Tyr) → Fe^{III} töltésátvitelnek tulajdonítható [13–15]. Ez az elektronátmenet felelős a jellegzetes bíbor színért, melyről az enzimes család a nevét is kapta. A különböző növényekből és állatokból izolált enzimek szerkezetét és működési mechanizmusát Krebs és munkatársai vizsgálták részletesen [16–21].

A spanyolbabból és édesburgonyából származó bíborsav-foszfataz enzimek kristályosítása és röntgendiffrakciós módszerrel meghatározott szerkezete alapján, az aktív központban a vas(III)- és a cink(II)ionok egymástól 3,3 Å távolságra találhatók. A vas(III)ionhoz egy tirozin, egy hisztidin, egy aszparaginsav és egy terminális hidroxidion koordinálódik, míg a cink(II)ionnak egy aszparagin, két hisztidin, és egy terminális víz liganduma van (3.1.6. ábra). A két fémiont egy aszparaginsav karboxilát-oxigénje és egy hidroxidhíd köti össze. A fémionok körüli szabad koordinációs helyeket víz és/vagy hidroxidionok foglalják el [17,19,22].



3.1.6. ábra: A spanyolbabban található bíborsav-foszfataz aktív központjának sematikus ábrája (a kérdőjelek a proton bizonytalanságából erednek) [23]

Az egymástól nagyon különböző élőlények enzimeinek aktív központjában is ugyanazok az aminosavak találhatók, tehát a bíforsav-foszfatazokban kialakult fémionkötőhely jól definiált, és az evolúció során változatlanul megmaradt. A **3.1.7. ábrán** a különböző élőlényekből származó BSF enzimek aminosav-sorrendjét hasonlítottuk össze. Fehér színnel emeltük ki azokat az aminosavakat, melyek szerepet játszanak a fémionok megkötésében.

Emlősök:

Uf	10	VAVG	DWGGVPN	26	ILSLG	DNF	YFTG	28	VLAG	NHDHLG	84	VAG	HYPVW	26	YLCG	DHN	NLQ
bs BSF	9	VAVG	DWGGVPN	26	VXSXG	DNF	YFSX	28	XXAG	NHDHXG	74	VAG	HYPVW	26	YXCG	DHN	NXQ
emberi BSF	10	VAVG	DWGGVPN	26	ILSLG	DNF	YFTG	28	VLAG	NHDHLG	84	VAG	HYPVW	26	YLCG	DHN	NLQ
patkány BSF	9	VAVG	DWGGVPN	26	IMSLG	DNF	YFTG	28	VLAG	NHDHLG	86	VAG	HYPVW	26	YXCG	DHN	NXQ
egér BSF	9	VAVG	DWGGVPN	26	IMSLG	DNF	YFTG	28	VLAG	NHDHLG	86	VAG	HYPVW	26	YXCG	DHN	NXQ

Növények:

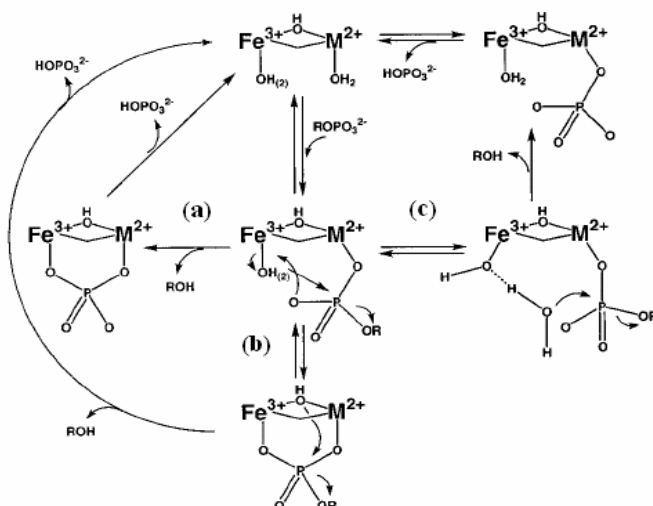
kbBSF	131	GLIG	DLGQSF	17	VLFVG	DLS	YADR	26	WTAG	NHEIEF	76	VLM	HSPPLY	28	VFAG	HVHAYE
atBSF	164	GLIG	DLGQTYD	17	VLFVG	DLS	YADR	26	WTAG	NHEIDF	76	VLV	HSPFY	28	VFAG	HVHAYE

Baktérium:

afBSF	164	AVLND	MGYTNA	17	AWHGG	DLS	YADD	78	VLPG	NHEASC	147	VMS	HPRMPY	26	YLSG	HVHWYE
-------	-----	-------	--------	----	-------	-----	------	----	------	--------	-----	-----	--------	----	------	--------

3.1.7. ábra: A különböző élőlényekből származó BSF enzimek aminosav-sorrendjének összehasonlítása (Uf – uteroferin, at – *A. thaliana*, af – *A. ficuum*); az ábrán az aminosavak egybetűs kódjai szerepelnek; a számok a fehérjelánc adott részén fel nem tüntetett aminosav egységek számát adják meg. [17]

A BSF enzimek működési mechanizmusa még nem tisztázott. A **3.1.8. ábra** szerint első lépésként mindig a kétvegyértékű fémion és a foszfátészter között jön létre koordináció, vagyis a szubsztrát megkötéséért a cink(II)ion a felelős. A vas(III)ion által generált hidroxidion bázisként viselkedik. Vagy közvetlenül ez a hidroxidion (*a* mechanizmus a **3.1.8. ábrán**), vagy egy a közreműködésével deprotonálódó vízmolekula (*c* mechanizmus) lesz a nukleofil reaktáns az észter hasításánál.



3.1.8. ábra: A BSF enzimek működésének feltételezett mechanizmusai [24]

Ez egybevág a savas pH optimummal. A *b* mechanizmus szerint mindkét fémion részt vesz a szubsztrát megkötésében, és a hídként kötődő hidroxidion a támadó nukleofil. A fémionok közelében

lévő további két hisztidin valószínűleg az átmeneti komplex stabilizálásában, valamint a távozó R-O⁻ csoport protonálásában játszik fontos szerepet.

Általában megállapítható, hogy a cinktartalmú metalloenzimek aktív központjában a fémion szerepe a nukleofil hidroxidion képzése és az átmeneti állapot szerkezeti stabilizálása, illetve a szubsztrát megkötése, megfelelő helyzetbe való irányítása és elektrosztatikus aktiválása.

3.1.3. Nikkeltartalmú enzimek

A nikkelt kimutatása a biológiai rendszerekben sokszor nehézségbe ütközik, ugyanis gyakran a fémionnak bioligandumok jelenlétében nincs, vagy csak kis intenzitású abszorpciós spektruma van, és a paramágneses Ni^I (*d*⁹) illetve Ni^{III} (*d*⁷) ESR spektrumai sem mindig egyértelműen detektálhatók, mint ahogy a különböző izotópok Mössbauer spektrumai sem. Napjainkban is nagyon kevés, döntően primitív baktériumokban előforduló, nikkeltartalmú enzimet ismerünk. Általában bonyolult enzimek alkotórésze, mint a metil-koenzim M reduktáz (F₄₃₀ koenzim), és nem ritkán más alkotó elemekkel együtt fordul elő, például a Fe/S klaszter-asszociátumok formájában Ni/Fe és Ni/Fe/Se hidrogenázok ($\text{H}_2 \rightleftharpoons 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$) vagy a CO dehidrogenáz ($\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CO}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$) esetén [25,26].

Az *ureáz* a legismertebb nikkeltartalmú és ezen belül az egyetlen hidrolitikus hatású enzim. Nemcsak baktériumokban, de gombákban és magasabb rendű növényekben is megtalálható, és az élő szervezet ammónia-koncentrációjának megfelelő szinten tartásában játszik szerepet. Az ureáz enzimek működési mechanizmusának tanulmányozása során [27] megállapították, hogy sok metallohidrolázhoz hasonlóan kétmagvú aktív központot tartalmaz, a két nikkell(II)ion egymástól 3,5 Å távolságra van. Mindkét fémionhoz két-két hisztidin imidazol-nitrogénje és egy-egy vízmolekula kötődik. A Ni² koordinációs szférájában egy aszparaginsav karboxilát-oxigénje is megtalálható, és a két nikkelliont egy karbamilált lizin hídként köti össze. A feltételezett mechanizmus szerint a Ni^I felelős a karbamid Lewis-sav aktiválásáért, míg a Ni² a nukleofil reaktánst generálja. Az átmeneti komplex stabilizálásában mindkét fémion részt vesz. Az enzimatisz hidrolízis során a reakció első lépésében karbaminsav képződik, ami spontán módon ammóniává és szén-dioxiddá bomlik: $\text{H}_2\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O} = [\text{H}_2\text{N}-\text{COOH}] + \text{NH}_3 = 2 \text{NH}_3 + \text{CO}_2$.

Az elmúlt évtizedekben részletesen vizsgált Cu,Zn-SOD, Mn-SOD és Fe-SOD enzimek után, az utóbbi években a fentiekhez alapvetően eltérő, aktív központjukban csupán egy nikkelliont tartalmazó szuperoxid-dizmutáz enzimek is ismertté váltak. Viszonylag kisméretű, körülbelül 120 aminosavat tartalmazó, a fent említett enzimsaládoktól eltérő szekvenciájú fehérjék, amelyekben az N-terminális végen jól megőrzött, hat aminosavból álló HCDGPC vagy HCDLPC szekvencia található. A *Streptomyces seoulensis* és *S. coelicolor* baktériumokból izolált *Ni-SOD* enzimek 2004-ben publikált kristályszerkezetéből kiderül [28,29], hogy a nikkellion mind az oxidált Ni^{III}, mind a redukált Ni^{II} formájában ez utóbbi részlet két cisztein alegységének oldalláncjaihoz koordinálódik. A koordinációs szférát az N-terminális hisztidin aminocsoportja és az egyik peptidkötés amid-nitrogénje egészíti ki. Ezáltal a redukált formában a fémion körül síknégyszetes elrendeződés alakul ki, míg az oxidált

formában a geometria torzul az axiális pozícióban koordinálódó hisztidin imidazol-nitrogénje miatt. Az enzim szerkezetének ismerete ellenére, a működési mechanizmusáról jelenleg még nem sokat tudunk.

3.2. A modellrendszerek általános jellemzői

A bioszervetlen kémiai kutatások egyik fő irányvonala a fémion-tartalmú enzimek szerkezetének és működésének felderítése. A bonyolult biokémiai folyamatok megértéséhez nagy segítséget nyújthatnak a kis molekulatömegű modellrendszerek vizsgálatai, melyekkel utánózni tudjuk a makromolekuláris rendszerek szerkezeti, spektrális vagy katalitikus sajátosságait. A modellkomplexekben a koordináció módját a fémion sajátosságain (méret, töltés, elektronkonfiguráció) és a donorcsoportok bázikusságán, hidrofób illetve aromás jellegén túl a koncentráció-viszonyok, és az egyéb körülmények (hőmérséklet, ionerősség, stb.) is befolyásolják. Ez utóbbiak egy része a biológiai rendszerekben egyszerűsödhet a fehérjék által kialakított jól definiált környezet miatt, ott viszont olyan további tényezők, mint például a koncentráció gradiensek, a sejtmembrán permeabilitása, és az egyéb összetevőkkel való kölcsönhatás is meghatározó szerepet játszhat a komplexek képződésében. Mindez azt mutatja, hogy a modellezés során mindig valamiféle kompromisszumot kell keresnünk.

Első pillantásra legegyszerűbb modelleknek a metalloenzimek aktív központjához hasonló oligopeptidok fémkomplexei tűnnek. Az irodalomban mégis szinte kizárólag az egyéb szerves molekulák komplexeiről találhatók ilyen irányú vizsgálatok. Ennek okát érintőlegesen már említettük a bevezetőben, de a későbbiekben még részletesen kifejtjük majd.

Az elmúlt évtizedekben a fémtartalmú foszforsav-észteráz enzimek funkcionális modellezésére számos kísérlet történt [22,30–37]. A foszfátészter kötés hidrolízise (illetve kialakítása) számos alapvető életfunkció feltétele. Ezek közül az egyik fontos szerep a DNS és RNS szintézisében, lebontásában és javításában szereplő nukleáz enzimeknek jut. Ezen enzimek modellezése a fentiekben túl azért kiemelkedő jelentőségű, mert az ún. mesterséges nukleázok ígéretes szerepet játszhatnak a génspecifikus kemoterápiában, illetve géntechnológiában.

A hidrolitikus enzimek mellett, az élő szervezetben képződő szabadgyökök káros hatását gátló szuperoxid-dizmutáz, peroxidáz, illetve kataláz enzimek működésének felderítése, így például a Cu,Zn-SOD, Mn-, Fe- vagy Ni-SOD [9,10,38–44] által katalizált redoxireakciók modellezése is kiterjedt terület.

Az eddigi kutatások jól tükrözik, hogy bár a redoxi és sav-bázis katalízis a mechanizmust tekintve teljesen eltérő, a modellkomplexekkel szemben támasztott általános követelmények, néhány kivételtől eltekintve, mégis hasonlóak. Mindkét esetben szükséges, hogy a fémion körüli koordinációs szféra telítetlen legyen, hogy a könnyen cserélhető vízmolekulák által elfoglalt koordinációs hely(ek)hez a szubsztrát könnyen hozzáférhessen. Előnyt jelent, ha a komplex pozitív töltésű, vagy legalább semleges, ezáltal elősegítve a negatív töltésű szubsztrátmolekulák koordinációját, illetve az átmeneti állapot stabilitását. A viszonylag erős *Lewis*-savként viselkedő központi fémionok a hidrolitikus katalízisben a

nukleofil reaktáns generálását, a redoxi katalízisben pedig, amennyiben az a reakció lejátszódásához szükséges, a szubsztrátmolekula deprotonálódását idézik elő.

A fémionok közül leggyakrabban a cink(II)-, nikkel(II)- és réz(II)ionok komplexeit tanulmányozzák, melyek jól megfelelnek a fenti kritériumoknak. Míg azonban a cink(II)ion kizárólag hidrolitikus, addig a két utóbbi fémion esetében emellett a redoxireakciókban való részvétel is lehetséges. A ligandumok közül a fentiek alapján az aromás nitrogén-donoratomokat tartalmazó vegyületektől várhatunk igen nagy hatékonyságot, mivel az ezekre jellemző π -viszontkoordináció a központi fémion erős *Lewis*-savasságát és a komplex nagy stabilitását eredményezheti. Ezt alátámasztják az irodalomban fellelhető adatok is. Kedvezőtlen viszont a peptidkomplexek esetében a deprotonált amid-nitrogének, vagy a szénhidrátkomplexek esetén az alkoholátion koordinációja, ami lényegesen csökkenti a fémion *Lewis* savasságát, esetenként a komplex negatív töltését eredményezi, illetve stabilizálja a magasabb oxidációs állapotot.

3.2.1. A fémionok tulajdonságai

A **rézion** leggyakrabban Cu^{II} -es oxidációs állapotban alakít ki stabilis komplexeket, de a Cu^{I} és Cu^{III} oxidációs állapotok is ismertek. A fehérjékben leginkább Cu^{I} és Cu^{II} oxidációs állapotban fordul elő. A d^9 -es elektronkonfigurációjú réz(II)ion 4-es, 5-ös és 6-os koordinációs számmal szerepel komplexeiben, többnyire síknégyzetes vagy tetragonálisan torzult oktaédes környezetben. A komplexek geometriájának változásával, a spektrális tulajdonságok is változnak. A $d-d$ átmenetekhez rendelhető λ_{max} értékének becslését segítő empirikus szabályokat a '70-es években Billo [45], később Sigel és Martin [46], majd a több mint 100 rézkomplex spektrális viselkedését figyelembe vevő Prenesti és munkatársai [47,48] állítottak fel. Ezek szerint a donorumok hatása az elnyelési sáv hullámhosszára és intenzitására adott geometria esetén additív módon jelentkezik. Általánosan elmondható, hogy az ekvatoriális síkban a vízmolekulák oxigén- vagy nitrogén-donoratomokra történő cseréje az abszorpció maximumot a kisebb hullámhosszak felé tolja el (kék eltolódás). Az erős terű amid-nitrogének számának növekedése az ekvatoriális koordinációs szférában jelentősen felerősíti a kék eltolódást, ezzel szemben az axiális koordináció kis mértékű eltolódást eredményez a nagyobb hullámhosszak fele (vörös eltolódás). A réz(I)ion d pályái telítettek, szoft jellegénél fogva többnyire a fehérjék kén-donoratomjai stabilizálják.

A **cinkion** gyakorlatilag csak +2-es oxidációs számmal fordul elő, d^{10} elektronkonfigurációja révén változatos geometriájú komplexeket képezve. Leggyakoribb a tetraédes- és oktaédes-, de kelátképző ligandumok jelenlétében gyakran találkozunk torzult elrendeződésekkel is. A cink(II)ionok vizes oldatban könnyen hidrolizálnak különböző vegyes hidroxokomplexek képződése közben.

A nikkeltartalmú modellrendszereket illetően, leggyakoribbak a d^8 elektronkonfigurációjú **nikkel(II)**ionok 4-es, 5-ös és 6-os koordinációs számú komplexei, melyek síknégyzetes, tetraédes,

négyszetes piramisos, trigonális bipiramisos vagy oktaéderes elrendeződést mutatnak. Akár ránézésre is egyértelműen megkülönböztethetőek a kis ligandumterű donorokkal kialakított oktaéderes geometriájú, nagyspínszámú komplexek (általában halványzöld színűek), a két vagy három deprotonálódott peptid-nitrogént tartalmazó síknégyszetes, diamágneses komplexektől (intenzív sárga színű oldatok). A nikkel(III)iont tartalmazó komplexek is stabilizálhatók kelátképző amid- vagy tiolát-ligandumokkal, és ismertek a nikkelion alacsony oxidációs állapotai (+1 vagy 0) is.

3.2.2. A peptidtípusú ligandumok sajátosságai

Ismert, hogy a fehérjékhez a fémionok, kevés kivétellel, az oldalláncokban található donorcsoportokon keresztül koordinálódnak. Az aminosavak közül az aszparaginsav és glutaminsav β - illetve γ -karboxilcsoportot, az aszparagin és glutamin β - illetve γ -karboxamidcsoportot, a szerin hidroxil-, a tirozin fenolos hidroxilcsoportot, a hisztidin imidazol-nitrogéneket, a lizin ε -aminocsoportot, a cisztein tiolcsoportot, míg a metionin tioétercsoportot tartalmaz oldalláncában. Az eddigi ismeretek azt mutatják, hogy a hisztidin és cisztein aminosavak oldalláncai alakítanak ki legerősebb kölcsönhatást a legtöbb átmenetifém-ionnal. Ebből adódóan a fehérjék fémkötő helyeinek nagy részét ezek az aminosavak szolgáltatják.

A hisztidin oldalláncának imidazolgyűrűjében két N atom található (N(1) és N(3), illetve δ és ε jelölésekkel is találkozunk az irodalomban). Ezek közül általában a δ imin-nitrogén koordinálódik a fémionhoz, a kialakuló kisebb tagszámú kelátgyűrű nagyobb stabilitása miatt. A két N együttes koordinációja μ -imidazoláto-híd létrejöttét eredményezi két fémion között, mint például a fentiekben említett Cu,Zn-SOD enzimben (ld. **3.1.3. ábra**).

A fehérjék másik fontos építőköve a cisztein, melynek tiolcsoportja deprotonálódva ($pK_s \approx 8,5$) koordinálódhat a többnyire szoft jellegű fémionokhoz. Emellett a cisztein tiolcsoportja viszonylag könnyen oxidálódik cisztin képződése közben. Az így kialakuló diszulfid-hidaknak nagy a jelentősége a fehérjék térbeli szerkezetének stabilizálásában.

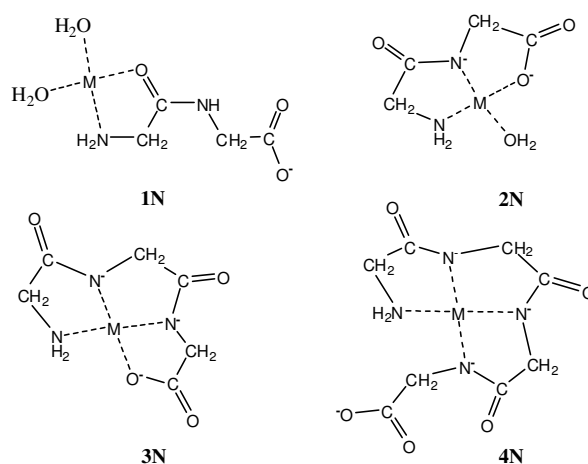
Az aszparaginsav és glutaminsav savas karakterű oldallánci karboxilcsoportján keresztül ($pK_s \approx 4,5$) a hard jellegű fémionokkal képez stabilis komplexeket. A karboxilát a fémionokhoz egyfogú (η^1), kétfogú kelátképző (négytagú kelátgyűrű, η^2), vagy kétfogú hídképző ligandumként (μ - η^1 : η^1) kapcsolódhat.

Az aromás oldalláncot tartalmazó tirozin negatív töltésű fenolátként ($pK_s \approx 10$) többnyire hard jellegű fémionokkal képez kötést, egyfogú ligandumként szerepel.

A fenoláthoz hasonlóan, a gyengén koordinálódó oldallánci csoportokhoz tartozik a lizin ε -amino csoportja is ($pK_s \approx 10,5$), mely nincs megfelelő helyzetben a stabilis 5 vagy 6 tagú kelátgyűrű kialakításához, de lehetőség van makrokelát kialakítására, illetve az aminocsoportnak a dimerek képződésében betöltött híd szerepére is találunk példákat.

Az aszparagin és glutamin aminosavak oldalláncái semleges közegben az amid-oxigén, lúgos közegben pedig képesek a fémion indukálta deprotonálódás során az amid-nitrogénen keresztül koordinálódni. A szerin oldallánci donorcsoportja is lúgos közegben alakít ki stabil komplexeket.

A peptidek és fehérjék savamid kötéseiben az amid-nitrogén erősen bázikus jellegű, protonját csak erősen lúgos közegben adja le ($pK_s \approx 14$). A peptidekben a karboxilcsoport protonálódási állandója az aminosavakhoz képest megközelítőleg egy nagyságrenddel nő ($\lg K \approx 3,4$), az aminocsoporté pedig közel ugyanennyit csökken ($\lg K \approx 8$) az aminosavakban megtalálható intramolekuláris hidrogénkötés gyengülése, illetve megszűnése miatt. A peptidekben az egymástól távol levő N- és C-terminális funkciók csoportok nem tudnak egyetlen fémionnal stabilis kistagszámú kelátgyűrűt kialakítani, ezért együttes koordinációjuk nem eredményez kiemelkedő stabilitású részecskét. Kimondottan hard jellegű fémionokkal való kölcsönhatás során a karboxilát-oxigén, míg a többi esetében az N-terminális rész az elsődleges kötőhely [49]. A peptidmolekulák N-terminális végén a fémionnak lehetősége nyílik öttagú kelátgyűrű kialakítására az amino-nitrogén és az amid-oxigén donoratomok részvételével. Vannak olyan fémionok is (például réz, nikkel), melyek képesek az amid-nitrogén protonjával eredményesen versengeni, és koordináció közben azt helyettesíteni. E folyamat eredményeként általában nagy stabilitású, csatolt öttagú kelátgyűrűk alakulnak ki, amint az a **3.2.1. ábrán** látható. A négy vagy annál több aminosavat tartalmazó oligopeptidek esetén lúgos közegben az ekvatoriális síkban négy N-es peptidszerű koordináció valósul meg [1,46]. A deprotonálódott amid-nitrogének koordinációja ritka a fémionkötő fehérjék körében, de találunk rá példát a természetben, például egyes szérum albuminok, illetve a prion fehérjék rézkomplexeiben [50–52].



3.2.1. ábra: A koordinálódó oldalláncot nem tartalmazó oligopeptidek peptidszerű koordinációjának lehetőségei, ahol *M* például réz(II) vagy nikkel(II)iont jelöl (az egyszerűség kedvéért az ábrákon az oldalláncot nem tartalmazó glicin aminosavakból felépülő di- (1N és 2N), tri- (3N) és tetrapeptidek (4N) szerepelnek, és az elektronok delokalizációját nem ábrázoltuk)

Már a kis tagszámú peptidmolekulákban is lényeges szerep jut a koordinálódó donorcsoportot tartalmazó aminosav-oldalláncoknak a fémionok megkötésében. Amennyiben a peptidszekvencia hisztidint is tartalmaz, ennek az aminosav-sorrendben elfoglalt helyétől függően, nagyon változatos fémkomplexek alakulnak ki.

3.3. A hisztidintartalmú peptidek fémkomplexei

Koordinációs kémiai szempontból igen széles körben tanulmányozták a hisztidint tartalmazó oligopeptideket. Ennek oka, hogy az erősen koordinálódó oldallánc jelenléte nagyobb hasonlóságot biztosíthat a metalloenzimek fémionkötőhelyeihez [1,38,53]. Az eddig megjelent, köztük több összefoglaló közlemény, részletesen taglalja a hisztidintartalmú peptidek fémion-koordinációját. A munkánk szempontjából legfontosabb tanulságokat az alábbiakban részletezzük. A hisztidin helye az aminosav-szekvenciában alapvetően meghatározza a különböző körülmények között képződő komplexek összetételét és szerkezetét. Az egy hisztidint tartalmazó dipeptidek és rövid oligopeptidek komplexeivel kapcsolatos eredményekből az alábbi általános következtetések vonhatók le, megjegyezve, hogy sok esetben már a kis tagszámú réz(II)-, nikkel(II)- vagy cink(II)komplexeknél is bizonytalan, és csak feltételezéseken alapul a koordináció javasolt módja.

3.3.1. Az egy hisztidint tartalmazó peptidek réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)komplexei

His-1 peptidek. A His-1 peptidekben a hisztidin az N-terminális helyet foglalja el, például HisGly, HisGlyGly. E ligandumok savas oldatának a tárgyalta fémionok jelenlétében történő fokozatos lúgosítása során elsőként nagy stabilitást biztosító, hisztamintípusú, hattagú kelátgyűrű alakul ki a terminális amino-nitrogén és az imidazol-nitrogén (N(1)) együttes koordinációja révén [1,2,46,53–62]. E kötéstípus jellemző mind a *mono*-, mind a ligandumfelesleg jelenlétében kialakuló *biszkomplexek* esetén.

A réz(II)ionok jelenlétében a stabilis ML_2 részecskék képződése pH 6 – 7 körüli értékig késlelteti az amid-nitrogén koordinációját. Amennyiben nincs lehetőség *biszkomplex* kialakulására, e folyamat már pH ~ 5 körül megkezdődik. Összehasonlításként az amid-nitrogén deprotonálódása a GlyGly dipeptid réz(II) komplexében pH ~ 4 körül lezajlik [46]. A fémion és az amid-nitrogén közti erős koordináció kialakulásának feltétele a megfelelő horgonycsoport jelenléte. Ilyen horgony az aminocsoport mellett a hisztidin oldalláncának imidazol-nitrogénje is. Réz(II)ionok jelenlétében His-1 dipeptidek (például HisGly, HisLys) esetén az első amid-nitrogén deprotonálódása során dimerizáció játszódik le, és $Cu_2H_2L_2$ (töltések elhanyagolva) részecske képződik [1,2,54,63]. Itt az egyik monomer egység hisztidin oldallánca valószínűleg a másik egység réz(II)ionjához kötődve ligandumhidat képez.

A His-1 tripeptideknél [55,64] lehetőség van az amid-nitrogének egymást követő (konszekutív) koordinációjára is a pH további növelése során, ami a két deprotonálódott amid-nitrogént tartalmazó CuH_2L részecske képződését eredményezi. Az irodalom szerint e komplexben triglicintípusú [1,46], míg a több aminosavat tartalmazó réz(II)komplexeik esetében az utolsó részecskében tetraglicintípusú peptidszerű koordináció (**3.2.1. ábra**) valósul meg. Azaz imidazol-nitrogén nem vesz részt a fémion megkötésében.

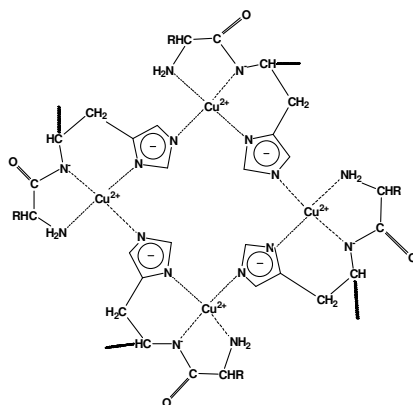
A His-1 peptidek nikkel(II)komplexeinek vizsgálata a réz(II)ionokhoz hasonló eredményeket mutat, azzal a különbséggel, hogy az amid-nitrogén koordinációja lassúbb folyamat, mint a réz(II)ionok

esetében. Amennyiben azonban ez bekövetkezik, a második amid-nitrogén deprotonálódása erősen kooperatív jelleget mutat. Így a kiindulási hisztamintípusú koordinációt tartalmazó zöld, paramágneses fémkomplex sárga színű, sík szerkezetű, diamágneses komplexszé alakul [46,65,66] a két vagy három amid-nitrogén koordinációja során.

A cink(II)ionok hisztamintípusú komplexei kevésbé stabilak, mint a réz(II)-, illetve nikkel(II)ionok esetében képződő megfelelő részecskék. Semleges, illetve lúgos pH tartományban az amid-nitrogén deprotonálódása háttérbe szorul a fémion hidrolíziséhez képest, ami csapadék kiválásához vezet pH 7 – 8 körül, bár az eredmények ellentmondásosak már az olyan egyszerű rendszerek vizsgálata esetében is, mint például a cink(II)-HisGly [59]. Ebben az esetben Sóvágó és munkatársai az amid-nitrogén deprotonálódását nem valószínűsítik pH ~ 8-ig. Az 1:1 rendszerben, két ekvivalensnél több lúg adagolása után cinkhidroxid kiválása tapasztalható, míg kétszeres vagy annál nagyobb ligandum felesleg esetén is csak a ZnL_2 *bisz* részecske képződése feltételezhető, peptid-nitrogén deprotonálódás nem.

His-2 peptidek. Sok irodalmi adat áll rendelkezésre az olyan rendszerek vizsgálatáról, ahol a hisztidin az N-terminális résztől számított második helyet foglalja el a szekvenciában (His-2 komplexek), mint például a GlyHis, AlaHis, ProHis, GlyHisGly, GlyHisLys [1,2,54,59,67,68].

Réz(II)- és nikkel(II)ionok jelenlétében széles pH-tartományban (pH 4 – 10) kimagaslóan nagy stabilitású $MH_{-1}L$ komplex kialakulása figyelhető meg az amino-nitrogén, a szomszédos amid-nitrogén és az imidazol-nitrogén részvételével, csatolt 5,6-tagú kelát rendszerben. A három aminosavat tartalmazó peptidek esetében, a hisztidin oldalláncának koordinációja megakadályozza a soron következő amid-nitrogén fémionhoz való kötődését, emellett a karboxilát-oxigén koordinációja is gátolt sztérikus okokból. Az $MH_{-1}L$ komplexben a fémion körüli ekvatoriális koordinációs szféra telítetlen marad. Ez lúgos közegben lehetőséget biztosít vegyes hidroxokomplex kialakulására, vagy oligomerizációs folyamat lejátszódására az imidazolgyűrű második nitrogénatomjának deprotonálódása révén. Míg híg oldatokban az előbbi, addig az összkoncentráció növelése az utóbbi reakciónak kedvez. Az oligomerizáció során a réz(II)-Xaa-His négy monomer egysége asszociálódik ciklikus tetramerré $Cu_4H_{-8}L_4$ összetétellel (**3.3.1. ábra**). E komplexben két-két réz(II)ion egy-egy negatív töltésű imidazolato-híd köt össze [4,54,69].



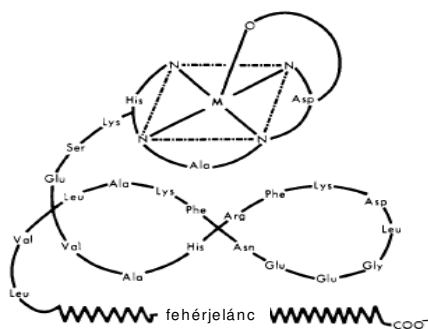
3.3.1. ábra: A réz(II)-GlyHisGly tetramer $Cu_4H_{-8}L_4$ komplexének sematikus ábrája

A réz(II)- és nikkel(II)komplexek között a különbség főként abban nyilvánul meg, hogy a nikkel(II)ionok képessége az amid-nitrogén deprotonálódás elősegítésében gyengébb. Ez azt eredményezi, hogy a NiH_2L komplexek képződése általában csak pH 6 – 7 tartományban kezdődik el [59,60]. A nikkel(II)-GlyHis vizsgálata során például azt figyelték meg, hogy a fémion körüli szabályos oktaéderes geometriát a terminális aminocsoport, a hisztidin imidazol-nitrogénje és egy amid-nitrogén alakítja ki, három vízmolekula jelenléte mellett, de tetramer részecskék képződésével egyidőben a komplex színe és geometriája megváltozik, sáfrányos, intenzív sárga színű részecske képződése során [70]. A nikkel(II)-GlyHisLys komplexben is hasonló, három N-es koordinációs mód feltételezhető pH 5 – 8 között (ML részecske), a lizin ε -aminocsoportja nem vesz részt a koordinációban. Ligandumfelesleg esetén, pH 8 felett *bis*komplex képződése feltételezhető (ML_2). A nikkel(II)ion szabályos oktaéderes elrendeződésű részecskék kialakítására való hajlama alapján feltételezhető, hogy mindkét ligandum az ML részecskéhez hasonlóan $\{\text{NH}_2, \text{ImN}, \text{N}^-\}$ módon koordinálódik. Az oldat további lúgosítása során jelentős változás következik be az abszorpciós és CD spektrumokban, sáfrányos szerkezet alakul ki. Ez akárcsak a réz(II)-GlyHis [54,69], illetve a nikkel(II)-GlyHis [70] komplexek esetében, az imidazol-nitrogén második, pirroltípusú nitrogénjének deprotonálódásával magyarázható. Itt három különböző tetramer részecskék képződését feltételezték a lizin oldallánci aminocsoportjainak egymást követő deprotonálódásai során, amelyek azonban nem koordinálnak a nikkel(II)ionokhoz [71].

A HisGly peptiddel ellentétben, a GlyHis cink(II)ionnal alkotott komplexeiben amid-nitrogén deprotonálódása figyelhető meg pH ~ 7 körül [59,72]. Az 1:1 cink(II):ligandum arányú rendszerben a ZnH_2L , míg ligandumfelesleg esetén *bis*komplex képződik ZnH_2L_2 összetétellel, mely szintén deprotonálódott amid-nitrogént tartalmaz [73].

His-3 peptidek. A peptidszekvenciában az N-terminális végtől számított harmadik helyen jelenlevő hisztidin esetében (His-3 komplexek) [1,2,68,74–76] a réz(II)- vagy nikkel(II)ionok jelenlétében szintén széles pH tartományban kimagaslóan nagy stabilitású komplexek alakulnak ki. E részecskékben a fémiont három csatolt kelátgyűrűben négy N-donoratom veszi körül. Vagyis a komplex koordinációs szférájának ekvatoriális síkja telített: az amino-nitrogén, két amid-nitrogén és az imidazol-nitrogén foglalják el ezeket a helyeket. Réz(II)ionok jelenlétében az MH_2L komplex pH 4 – 11 tartományban domináns, az egy- két- illetve három nitrogénatom koordinációjával keletkező részecskék mennyisége elhanyagolhatóan kicsi. Annak ellenére, hogy az élő szervezetben csak ritkán fordul elő réz(II)–amid-nitrogén kötés, például a humán szérumban albumin N-terminális vége a réz(II)ionokat (és nikkel(II)ionokat is) ilyen módon köti meg szelektíven és szállítja a véráramban (3.3.2. ábra).

A réz(II)ionokhoz nagyon hasonló módon, a nikkel(II)ionok is képesek hasonló koordinációt kialakítani a humán szérumban albuminnal, mégis ezen komplexek vizsgálatával kevesebbet foglalkoztak.



3.3.2. ábra: A $\{NH_2, N^-, N^-, ImN\}$ típusú koordináció a humán szérum albuminban, egy axiális COO^- kötéssel kiegészülve [77]

A GlyGlyHis tripeptid nikkell(II)ionok jelenlétében – szintén kooperatív deprotonálódások során – keletkező négy N donoratomos NiH_2L részecske képződése együtt jár a fémion körüli nagy spinszámú, oktaédres geometria megváltozásával, kis spinszámú síknégyszetes komplex kialakulása közben. A spinpárosadást a növekvő ligandumtér erőssége indukálja, amit már a tetraglicin nikkell(II)komplexeinél is megfigyeltek. Az elektronszerkezet, illetve a geometria megváltozásának következtében azonban e komplexek kialakulása lassúbb, mint a megfelelő réz(II)komplexeiké, ami azt eredményezi, hogy a kooperativitás ellenére, spektroszkópiás módszerekkel detektálhatók az átmeneti egy-, két- illetve három N-es, oktaédres szerkezetű nikkell(II)komplexek is [1]. A nikkell(II)-glicil-glicil-hisztamin rendszerben is azt találták [76], hogy a komplexek képződése nagyobb pH értéknél kezdődik, mint a réz(II)ionok esetén, de pH ~ 7 felett az eloszlásgörbe azonossá válik, és diamágneses, síknégyszetes nikkell(II)komplexek képződése következik be ($\lambda_{max}^{d-d} = 425\text{ nm}$).

A cink(II)ionok jelenlétében kialakuló komplexek szerkezetének megállapítása ezekben az esetekben is bizonytalanabb, mint a réz(II)- vagy nikkell(II)ionok esetében. A GlyGlyHis tripeptid vizsgálata során például szintén amid-nitrogén deprotonálódást feltételeztek, de valószínűsíthető a kétmagvú komplexek kialakulását, illetve hidrolitikus folyamatok lejátékozódását sem zárták ki [78].

His-4 (vagy távolabbi) peptidek. Amennyiben a hisztidin az N-terminálistól számított negyedik vagy annál távolabbi helyet foglalja el a peptidszekvenciában, az aminos csoport és a hisztidin imidazol-nitrogénje között versengés alakul ki az elsődleges kötőhelyet illetően. Az $\{NH_2$ és $ImN\}$ donoratomok együttes koordinációja makrokelátot eredményez, melynek stabilitása azonban jóval kisebb az 5 illetve 6 tagú csatolt kelátokénál [2]. pH 8 – 9 körül szintén négy nitrogén koordináció alakul ki a fémion körül $\{NH_2, N^-, N^-, N^-\}$ vagy $\{N^-, N^-, N^-, ImN\}$ koordinációs móddal [2,79].

N-terminálison védett peptidek. A fentiekben láthattuk, hogy az N-terminális aminos csoport a legtöbb esetben fontos szerepet játszott a fémionok megkötésében. Ezért a fehérje-modellrendszerek tanulmányozása során nagyobb jelentőségűek azok a vizsgálatok, amelyek N-terminálisan védett peptidkomplexekre irányulnak. Ennek ellenére, az ilyen peptidek komplexeiről kisebb számban állnak rendelkezésre irodalmi adatok, mint a fentiekben tárgyalt szabad aminos csoporttal rendelkező hisztidint tartalmazó peptidek esetén. A leggyakrabban alkalmazott acetil (Ac-), illetve benzil-oxi-karbonil (Z-)

védőcsoportot tartalmazó peptidek eddigi vizsgálatainak tapasztalatait az alábbiakban foglaljuk össze [2,3,10,39,80].

A His-1 komplexek esetében az amino-nitrogén koordinációjának blokkolása a védőcsoport által megakadályozza a hisztamintípusú $\{NH_2, ImN\}$ koordinációt. Réz(II)- és nikkel(II)ionok jelenlétében az imidazol-nitrogén és a tőle C-terminális irányban lévő két vagy három deprotonálódott amid-nitrogén koordinációja a peptidszerű komplexeknél kisebb stabilitású, 7,5,(5)-tagú csatolt kelátot eredményez. Néhány esetben, például a Z-HisGly vagy az Ac-HisValGlyAsp-NH₂ réz(II)komplexeinél [10,80] csapadékképződést figyeltek meg pH ~ 7 felett. A humán prion fehérje rézkötő helyének modellezéséhez tervezett Ac-HisGlyGlyGlyTrp réz(II)komplexének ismert a kristályszerkezete [81]. A fémion körüli négy ekvatoriális kötőhelyet a hisztidin imidazol-nitrogénje, két glicin deprotonálódott amid-nitrogénje, illetve egy karbonil-oxigén foglalja el, míg a triptofán indolgyűrűje axiálisan koordinálódik egy vízmolekula közreműködésével. Hasonló (három nitrogén és egy oxigén donortom) koordinációs módott feltételezték az réz(II)-Ac-HisGlyGlyGly rendszerben is a pH ~ 8 körül kialakuló részecskére [3]. Ebben a rendszerben, a réz(II)ionhoz pH 4,5 körül kezdődik az imidazol-nitrogén koordinációja (CuL részecske), majd lépcsőzetes deprotonálódás során kialakulnak a CuH₁L, CuH₂L és CuH₃L részecskék, pH 9 felett ebben a rendszerben is a négy N-es koordináció alakul ki három amid-nitrogén részvételével. A fiziológiás pH körül keletkező részecskék stabilitási állandói azonban elmaradnak a hasonló szerkezetű, de nem védett peptidek megfelelő értékeitől [2,3].

Az N-terminálison védett His-2 peptidkomplexek vizsgálata során (például Z-GlyHis [80], Ac-GlyHis [82], Ac-GlyHisGlyGly [3], Ac-ProHisGlyGlyGlyTrpGlyGln [83]), a korábbi rendszerektől eltérően a pH 6 – 10 tartományban domináns CuH₂L részecske alakul ki $\{ImN, 2 \times N^-\}$ koordinációval. A következő deprotonálódás során nem alakul ki négy N-es koordináció a réz(II)ion körül. A negyedik ekvatoriális helyet valószínűleg egy a koordinációs szférában jelenlevő vízmolekula deprotonálódásával kialakuló hidroxidion, vagy más oxigén-donor foglalja el, kialakítva a CuH₃L részecskét [2,3,80]. Az Ac-GlyHisGlyGly réz(II)komplexeinek részletes vizsgálata során [3] is azt tapasztalták, hogy az Ac-HisGlyGlyGly, Ac-GlyGlyHisGly és Ac-GlyGlyGlyHis komplexeitől eltérően, erősen lúgos közegben a $pK_s = 10,76$ értékkel lejátszódó folyamat során sem tolódik el a látható spektrumban a maximális elnyelés hullámhossza 590 nm-nél kisebb értékek felé, ami valószínűtlenné teszi olyan kromofór jelenlétét, ahol négy N-es koordináció valósulna meg a réz(II)ion körüli ekvatoriális síkban. (Az $\{ImN, N^-, N^-, H_2O\}$ esetén 584 nm, az $\{ImN, N^-, N^-, OH^-\}$ koordináció esetén számolható λ_{max} érték 553 nm [47].) A CuH₂L részecske szerkezetéhez hasonló, a humán prion fehérje fémkötő helyét modellező Ac-ProHisGlyGlyGlyTrpGlyGln réz(II)komplexei esetében is, az előzőhöz hasonló $\{ImN, N^-, N^-, OH^-\}$ koordinációs módot feltételeznek [81].

A His-2 rendszerekhez hasonló oldatkémiai viselkedés figyelhető meg azokban a rendszerekben, ahol az egyetlen hisztidin alegység a harmadik vagy a negyedik helyet foglalja el az N-terminálison védett peptidszekvenciájában. A Z-GlyGlyHis [80], Ac-GlyGlyHisGly, Ac-GlyGlyGlyHis [3], Ac-ThrGluSerHisAlaLys-NH₂ [84] réz(II)komplexei, illetve az Ac-AlaLysArgHisArgLys-NH₂ [85], Ac-

ThrGluSerHisAlaLys-NH₂ [84], Ac-CysAlaHis-NH₂ [86] nikkell(II)komplexeinek vizsgálata során azt tapasztalták, hogy pH 3 – 4 tartományban a hisztidin deprotonálódott imidazol-nitrogénje koordinálódik a fémionhoz a réz(II)ionok jelenlétében, míg a nikkell(II)ionok esetén ez a folyamat pH 5 – 6 körül következik be. A pH növelésével, a konszekutív deprotonálódások során, pH ~ 8-ig kialakul az egy-, két-, majd három amid-nitrogént, azaz négy N donort tartalmazó komplex mindkét fémion esetén, amint ez látható például a legegyszerűbb Ac-GlyGlyHisGly és Ac-GlyGlyGlyHis réz(II)komplexek részletes spektroszkópiai vizsgálatából [3]. Mindkét utóbbi peptid esetében semleges közegben a hasonló rendszerekre feltételezett imidazol-nitrogén, két amid-nitrogén és egy oxigén donoratom koordinálódik a fémionhoz, azonban a koordináció módja igen bizonytalan. A pH növelésével a koordinációs szféra négy N-es átrendeződést mutat $pK_s = 8,95$ az első, illetve $pK_s = 8,42$ értékkel a második ligandum esetében. A két réz(II)komplex majdnem azonos CD és UV/látható spektruma lúgos közegben, valamint a hasonló ESR paraméterek alátámasztják a hasonló koordinációs módot. A harmadik helyen levő hisztidin imidazol-nitrogénje, az első és második glicin, és a hisztidin amid-nitrogénje koordinálódik a réz(II)ionhoz az első esetben, míg a második és harmadik helyen lévő glicin, valamint a negyedik helyen lévő hisztidin amid-nitrogénje és az imidazol-nitrogénje a donoratomok a második peptid komplexében.

A H2A típusú hiszton fehérjék C-terminális részének modelljeként vizsgálták többek között az Ac-ThrGluSerHisAlaLys-NH₂ és Ac-ThrGluSerAlaHisLys-NH₂ réz(II)- és nikkell(II)ionok jelenlétében kialakuló komplexeit [84]. Nikkell(II)ionok jelenlétében pH ~ 5 körül alakul ki a NiHL részecske, az imidazol-nitrogén koordinációja révén. Bal és munkatársai [87] a hasonló szekvenciájú peptid vizsgálat során feltételezték, hogy a glutaminsav karboxilcsoportja is részt vesz a koordinációban, mind a réz(II)-, mind a nikkell(II)ion esetében, torzult oktaéderes geometria kialakulása közben. A pH növelésével a ligandum következő protonjának elvesztése ($pK_s = 7,81$ az Ac-TESHAK-NH₂ esetében) a hisztidin amid-nitrogénjének deprotonálódásához rendelhető, majd egymással átfedő lépések során, stabil öttagú csatolt kelátgyűrűk keletkezésével, két újabb amid-nitrogén deprotonálódásával kialakul az NiH₁L, majd az NiH₂L részecske. Ez utóbbiban a négy N-es {N⁻, N⁻, N⁻, ImN} koordinációt támasztják alá az abszorpciós spektrumokban mért, más síknégyzetes nikkell(II)komplexekhez hasonló, 440 nm illetve 442 nm-nél látható maximális elnyelés, és a korábban vizsgált rendszerekhez hasonló CD spektrumok [85], valamint a stabilitási állandók jó egyezése például a szintén négy N donoratomot tartalmazó Ac-AlaLysArgHisArgLys-NH₂ komplexeivel. Az erősen lúgos közegben lejátszódó további deprotonálódás ($pK_s \sim 11,1$), amit a lizin oldallánci aminocsoportjához rendeltek, nem okoz jelentős változást az UV/látható és CD spektrumokban, tehát feltételezhető hogy ez a csoport nem koordinálódik a fémionhoz.

A fenti védett peptidok a cink(II)ionokat nem képesek pH ~ 7 körül oldatban tartani, egyetlen hisztidin donoratomja nem elegendő a megfelelő stabilitású komplex kialakulásához. A fehérjékben a cink(II)ionok főként a cisztein és hisztidin aminosavak tiolát-, illetve imidazol-nitrogénjéhez kötődnek, ezért vizsgálták például a mindkét végükön védett HisCys, CysHis [88], HisValCys, CysProHis és CysValHis peptidok cink(II)komplexeinek oldatkémiai viselkedését [89]. A ZnL komplexekben a 12

vagy annál nagyobb tagú kelátgyűrű kialakulása, illetve az Ac-CysValHis-OEt esetében feltételezett Zn_2L_2 részecskék képződése után csapadék vált ki a rendszerből, tehát a két donoratom (S^- és ImN) együttes jelenléte sem volt képes oldatban tartani a cink(II)ionokat pH 6,5 – 7 felett.

3.3.2. Több hisztidint tartalmazó, C- és N-terminális csoportokon védett oligopeptidek réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)komplexei

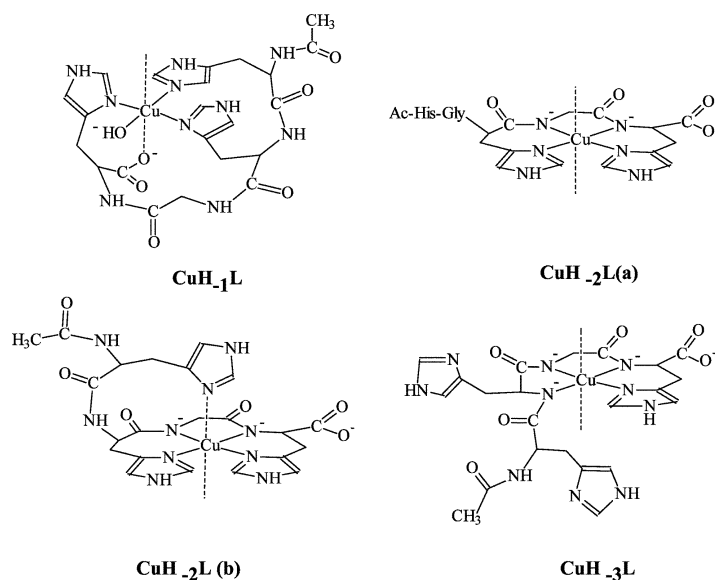
A fenti összefoglalásból is látható, hogy egy His jelenléte a terminális csoportokon védett peptidekben megfelelő horgonycsoportnak bizonyult a réz(II)- és nikkel(II)ionok számára. Az amid-nitrogének koordinációja miatt ezen rendszerek általában nem alkalmasak enzimek aktív központjának modellezésére. E problémára megoldás az N- (és C-) terminális végén védett, több hisztidint tartalmazó peptidek fémkomplexeitől várható [2,10,39,90–93]. Egy ilyen ligandum különböző makrokelát vagy hurok (akár a peptidláncban egymástól igen távoli hisztidinek is koordinálódhatnak ugyanazon fémionhoz) kialakítására lehet alkalmas. Változatos szerkezetű és geometriájú komplexek képződhetnek, amit nagymértékben befolyásol a hisztidinek száma és egymáshoz viszonyított helyzete a szekvenciában, de az egyéb koordinálódó donorcsoportok hatásától is függ. A reményeket azonban az eddigi vizsgálatok általában nem váltották be [39,87,91,94,95]. A hisztidinben gazdag alegység jelenléte sem tudta megakadályozni az amid-nitrogén koordinációját fiziológiás pH-n a réz(II)- illetve nikkel(II)komplexekben, illetve a cink(II)ionok esetében a csapadékképződést.

A réz(II)-Ac-HisGlyHisGly [96] és réz(II)-Ac-HisValHis- NH_2 [10] rendszerekben a CuL , CuH_2L és CuH_3L részecskék dominálnak. A fiziológiás pH-n domináns CuH_2L részecske esetén az $\{\text{ImN}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{ImN}\}$ koordinációt feltételezték, de a két imidazol-nitrogén koordinációja során, stabil makrokelát kialakulásával keletkező CuL is jelen van még pH 7,4-nél. Az Ac-HisXaaHisYaaHis- NH_2 típusú (Xaa, Yaa = nem koordinálódó oldalláncot tartalmazó aminosavak) peptidek réz(II)komplexeinek oldategyensúlyi és spektroszkópás vizsgálata során [90,92,97] is arra a következtetésre jutottak, hogy a makrokelát képződés a réz(II)komplexekben késleltetheti ugyan, de megakadályozni nem tudja az amidcsoport deprotonálódását fiziológiás pH-n. A koordináció módja és a fémion körül kialakuló geometria nagy változatosságot mutat, gyakran koordinációs izomerek vannak jelen az oldatban. A kialakuló változatos sztöchiometriájú részecskék sorát gazdagítja a két- vagy többmagvú komplexek kialakulásának lehetősége réz(II)- és nikkel(II)ionok jelenlétében. Lúgos közegben azonban a donoratomok átrendeződnek a fémion körül: az imidazol-nitrogének kiszorulnak az amid-nitrogének koordinációja során, ami a nikkel(II)komplexek esetében diamágneses, síknégyzetes komplexek kialakulásához vezet az NiH_2L vagy NiH_3L részecskék képződése közben [84].

Kutatócsoportunkban is vizsgáltuk a hisztidinben gazdag alegységet tartalmazó N-acetil-hisztidil-hisztidil-glicil-hisztidin- COOH (Ac-HHGH-OH) peptid fémkomplexeinek oldatkémiai sajátságait [39]. A három hisztidin jelenléte nem tudta megakadályozni a cink(II)ionok hidrolízisét pH 7 körül, viszont a réz(II)ionok jelenlétében a teljes vizsgált pH tartományban (2 – 11) nem volt tapasztalható csapadék kiválása. A pH-tól függően különböző mértékben protonált CuH_xL ($x = 2, 1, 0, -$

1, -2, -3) összetételű komplexek alakultak ki. A spektroszkópai adatok (UV/látható, CD, ESR spektroszkópia) azt mutatták, hogy az imidazol-nitrogének koordinációja meghatározó tényező minden kialakuló komplex esetében.

Enyhén savas közegben egy-, két-, majd pH 6 – 7 tartományban három imidazol-nitrogén koordinálódik a réz(II)ionhoz, vagyis csak oldallánci donortomokon keresztül, makroelát kialakulásával kötődik a ligandum. A pH növelésével a réz(II)-Ac-HHGH-OH rendszerben egymással lényegesen átfedő deprotonálódási folyamatokat nem figyelhetünk meg. Ugyanakkor például a C-, és N-terminális csoportjain védett HGH peptidnél már pH 7 körül kooperatív módon létrejön a HXH szekvenciára jellemző {ImN, N⁻, N⁻, ImN} típusú koordináció. Ez valószínűleg annak tudható be, hogy a három imidazol-nitrogén koordinációja eléggé stabilis komplexet eredményez, hogy ez a szerkezet eredményesen versenghessen az amid-nitrogének koordinációjával semleges közegben. Ugyanakkor a CuL törzskomplex három N-es koordinációja szabad helyet biztosít egy vízmolekula részére, amely a CuH₁L komplex kialakulása során deprotonálódhat, így vegyes hidroxokomplex jön létre. Nem lehet egyértelműen kizárni a két szomszédos hisztidin közötti amid-nitrogén koordinációját sem egy izomerben {2×ImN, N⁻, H₂O} de a spektroszkópiás adatok alapján a koordinálódott vízmolekula deprotonálódása a valószínűbb. A kialakuló komplexek lehetséges szerkezeteit a **3.3.3. ábra** mutatja. Kivételt jelent tehát ez a rendszer az előzőekhez képest, mivel az amid-nitrogén(ek) koordinációja csak pH ~ 8 felett következik be. A CuH₂L (a) és (b)-vel jelzett komplexekben már a két deprotonálódott peptid-nitrogént tartalmazó, HXH motívumra jellemző [92], különlegesen stabilis {ImN, N⁻, N⁻, ImN} szerkezet valószínűsíthető. Lúgos közegben (pH ~ 9,5 felett) a CuH₃L részecskében bekövetkezik a harmadik amid-nitrogén koordinációja, {N⁻, N⁻, N⁻, ImN} feltételezett szerkezet kialakulását eredményezve.



3.3.3. ábra: A réz(II)-Ac-HHGH-OH rendszerben kialakuló komplexek feltételezett szerkezetei (a szabad koordinációs helyeket fel nem tüntetett vízmolekulák foglalják el)

Az N- és C-terminális csoportokon védett hisztidinben gazdag oligopeptidek cink(II)komplexeinek vizsgálata során, például Ac-HisHis-NH₂ [98], Ac-HisProHis-NH₂ [89], Ac-

HisValHis-NH₂ [10], pH 5 alatt nem tapasztaltak komplexképződést, semleges közegben pedig minden esetben csapadék vált ki a rendszerből, ami valószínűleg a cink(II)ionok makrokelát komplexeinek kisebb stabilitásával, és az amid-nitrogén deprotonálódás hiányával magyarázható. Néhány nagyobb tagszámú peptid, mint az Ac-ThrGluSerHisHisLys-NH₂ és Ac-ThrGluAlaHisHisLys-NH₂ cink(II)komplexeinél [84] sikerült megakadályozni a csapadékképződést, de ezekben az esetekben nagy valószínűséggel a glutaminsav karboxilát-oxigénje is részt vesz a koordinációban a ZnHL részecskében (mint ahogy azt egyes transzmembrán cink(II)-szállító fehérjék esetében is feltételezték [99]), torzult oktaéderes geometria kialakítása közben. A cink(II)ionok hidrolízisre való hajlamának következtében, a következő deprotonálódások során (ZnHL → ZnL → ZnH₁L) Mylonas és munkatársai a koordinálódott vízmolekulák deprotonálódását feltételezik az amid-nitrogének helyett, bár nem zárták ki teljes bizonyossággal ez utóbbiak koordinációjának lehetőségét sem. A pH 8 felett domináns ZnH₂L részecske kialakulása során, akárcsak a hasonló réz(II)- és nikkel(II)komplexek esetén a lizin deprotonálódását valószínűsítik, anélkül hogy az a fémionhoz koordinálna.

3.3.3. Prolin beépítése a peptidszekvenciába

A prolin az egyetlen olyan esszenciális aminosav, amely gyűrűs oldalláncot, ezáltal szekunder amint tartalmaz. Ezért ennek az aminosavnak a peptidszekvenciába való beépítése (eltekintve az N-terminális végen való elhelyezkedéstől) azt eredményezi, hogy a peptidkötés nem tartalmaz hidrogént. Ezáltal a fémionra cserélhető protonok sora megtörik a peptidláncban. Tehát a horgony-donorcsoporttól kiindulva, 5 vagy 6 tagú kelátgyűrűk kialakulása a sorozatos amid-nitrogén deprotonálódások révén nem valósulhat meg. H. Kozłowski és munkatársai ezt a jelenséget „töréspontnak” nevezték el [1,100]. Emellett a prolin beépítése a szekvenciába a peptidlánc szerkezetének jelentősebb meghajlását eredményezi, aminek eredményeként a koordináció módja igen változatos lehet, a legtöbb esetben különböző makrokelátok kialakulását tapasztalták az N-terminális aminocsoport és egy távolabbi donoratom réz(II)ionhoz való koordinációja révén. Ez utóbbi donor lehet akár egy amid-nitrogén, de olyan gyengén koordinálódó oldallánci donoratom is, mint a tirozin fenolát-oxigénje, a lizin ε-aminocsoportja, az arginin guanidíniumcsoportja, vagy a glutaminsav karboxilát-oxigénje [1,4].

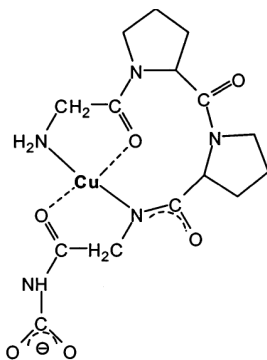
A koordináció módjának változatossága olyan egyszerű rendszer vizsgálata esetén is látható, mint például a ProHis dipeptid réz(II)komplexei [67]. Amikor a prolin az N-terminális részen található, a komplexek szerkezete nagyban különbözik azoktól, ahol a peptidszekvenciában a távolabbi helyeket foglalja el. A pH ~ 4 körül képződő CuHL részecske esetén elképzelhető akár a terminális imino-nitrogén és a szomszédos karbonil-oxigén koordinációja, vagy az imidazol-nitrogén és a terminális karboxilát-oxigén részvételével kialakuló részecske képződése. De ezt sem potenciometriás, sem spektroszkópiai adatokkal nem tudták alátámasztani. A nem koordinálódó N donoratom protonált állapotban marad mindkét esetben. A pH 4 – 6 tartományban, a következő deprotonálódás során a CuL komplexben két N-es koordináció alakul ki, amit a pH 5 – 9 között domináns CuH₁L kialakulása követ.

Ebben a komplexben a három N-es koordináció valószínű: {NH, N⁻, ImN}, amit alátámaszt például a réz(II)-GlyHis dipeptidhez hasonló stabilitási állandó érték (logβ: 5,43 illetve 4,89). A következő két, egymással átfedő lépés során, egy koordinálódott vízmolekula, majd az imidazolgyűrű nem koordinálódó pirrol-nitrogénjének deprotonálódását valószínűsítik, mivel az abszorpciós maximumok kismértékű változása pH 7 – 11 között a réz(II)ion körüli koordináció kismértékű változására utal.

A réz(II)-PheProGlyGly, GlyProPheGly és GlyProGlyPhe vizsgálata során [101] azt tapasztalták, hogy a prolin az N-terminális végtől számított második helyen nemkoordinálódó oldalláncot tartalmazó aminosavak mellett különös módon az amino-nitrogén és a negyedik aminosav amid-nitrogénje koordinációját eredményezi pH 7 – 8 körül. Ha tirozin vagy lizin van jelen a negyedik helyen (például TyrProGlyTyr [102]), akkor ezek oldallánci donoratomja vesz részt a makrokelát kialakításában.

Amennyiben a prolin a harmadik helyet foglalja el a tetrapeptid szekvenciában, például a TyrGlyProTyr [102] esetén, nagyobb stabilitású réz(II)komplexek kepződnek az {NH₂, N⁻} koordináció kialakulása közben, de a következő koordinációs hely betöltésével itt is makrokelát alakul ki.

Említést érdemel, hogy egynél több prolin beépítése az oligopeptidláncba tovább növeli a szerkezet merevségét, csökkenti a peptid hajlékonyságát, ezáltal erősen befolyásolja a kialakuló komplexek szerkezetét. A GlyProProGlyGly pH ~ 7 fölött domináns CuH₁L komplexében, a merev szerkezet révén szokatlanul könnyedén bekövetkezik az amid-nitrogén deprotonálódása semleges közegben [1] (**3.3.4. ábra**).

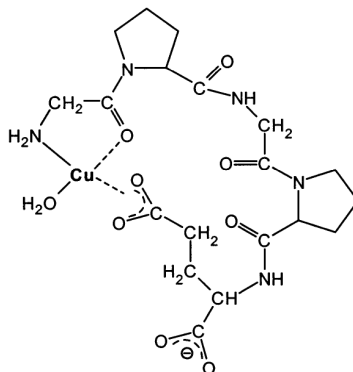


3.3.4. ábra: A réz(II)- GlyProProGlyGly (CuH₁L) feltételezett szerkezete[1]

Érdekes azonban megjegyezni, hogy ezekben a rendszerekben amid-nitrogén deprotonálódást csak a GluProProGlyGly és GlyProProGlyGly esetében tapasztaltak, ahol a terminális aminocsoport és a szomszédos karbonil-oxigén mellett a negyedik vagy az ötödik helyen lévő glicin peptid-nitrogénje deprotonálódik.

Változatos koordinációt tapasztaltak a nem koordinálódó oldalláncokat tartalmazó XaaProYaaProZaa peptidek komplexei esetén. A réz(II)-GlyProGlyProGly rendszerben pH 5 – 7 tartományban a CuL részecske dominál, melyben a terminális amino-nitrogén és a karbonil-oxigén koordinációja révén 5 tagú kelátgyűrű alakul ki, a réz(II)ion körüli további két koordinációs helyet pedig

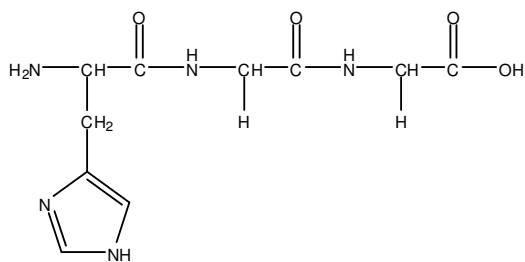
vízmolekulák foglalják el. A pH növelésével *bis*komplex képződését tapasztalták. Ezzel szemben amennyiben egy glutaminsavat építettek be a szekvenciába a C-terminális részre (GlyProGlyProGlu), a pH 5 – 8 tartományban domináns CuL komplex stabilitásának növekedése a fémionhoz koordinálódó oldallánci karboxiláttal magyarázható a potenciometriás és spektroszkópiás adatok alapján (**3.3.5. ábra**). A harmadik helyen lévő glicint lizinre cserélve [103], az oldallánci ϵ -aminocsoport koordinálódik a réz(II)ionhoz, szintén nagy stabilitású makrokelát képződése közben.



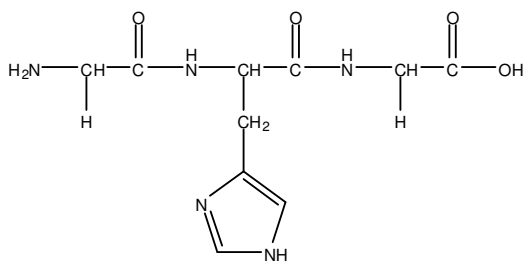
3.3.5. ábra: A GlyProGlyProGlu pentapeptid CuL komplexének feltételezett szerkezete[1]

A terminálisan védett, multihisztidin-tartalmú, prolin aminosavat is tartalmazó peptidkomplexekről az irodalomban nem található információ. Várhatóan tovább bonyolódik a koordináció módja a különböző pH-n képződő részecskék esetén, aminek vizsgálata célkitűzéseink között szerepel.

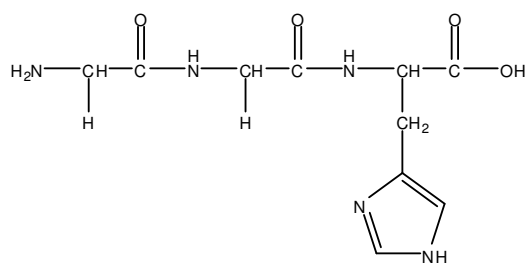
4. Vizsgált ligandumok:



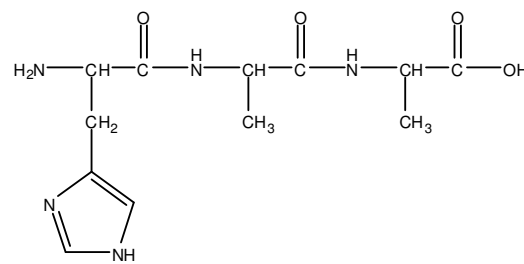
HisGlyGly



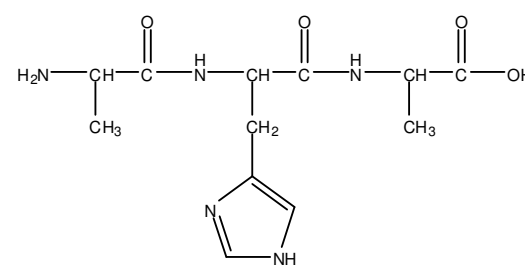
GlyHisGly



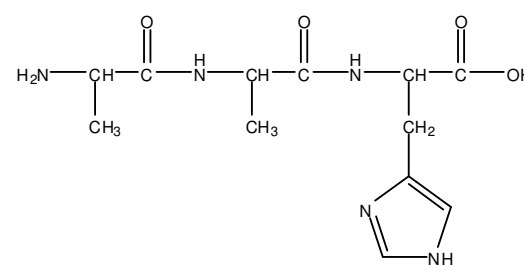
GlyGlyHis



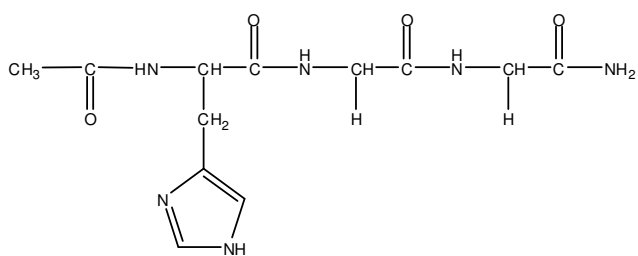
HisAlaAla



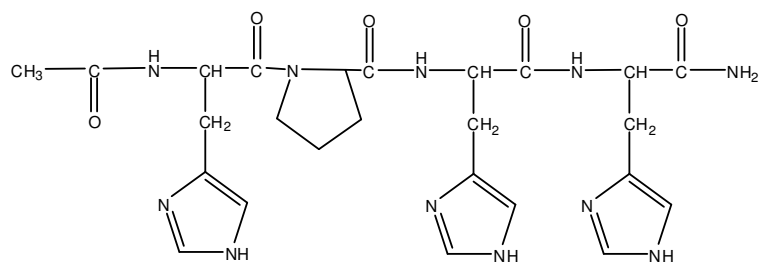
AlaHisAla



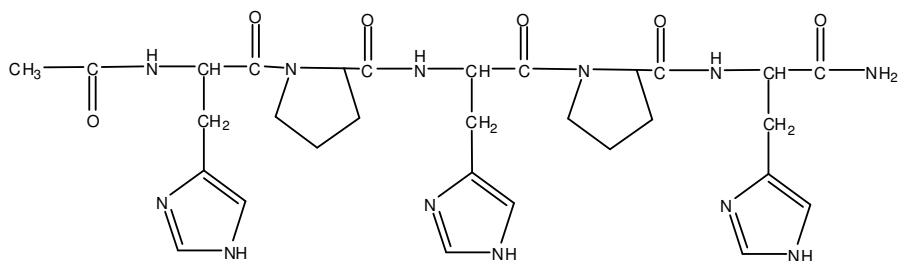
AlaAlaHis



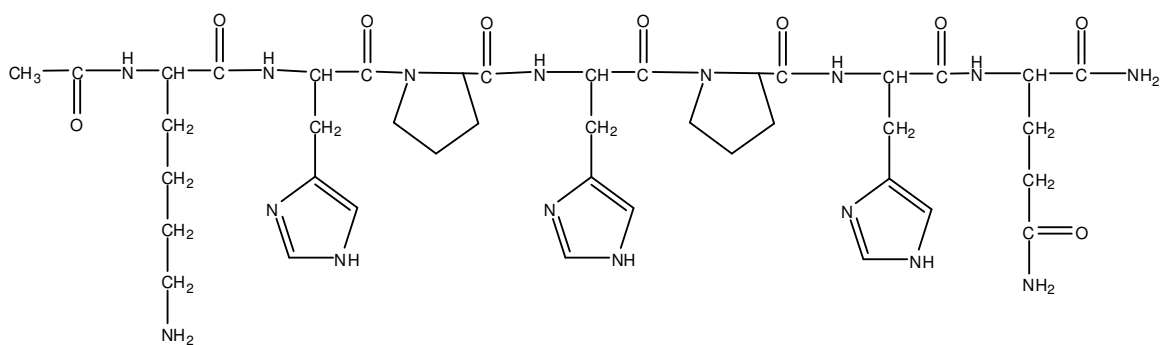
Ac-HisGlyGly-NH₂



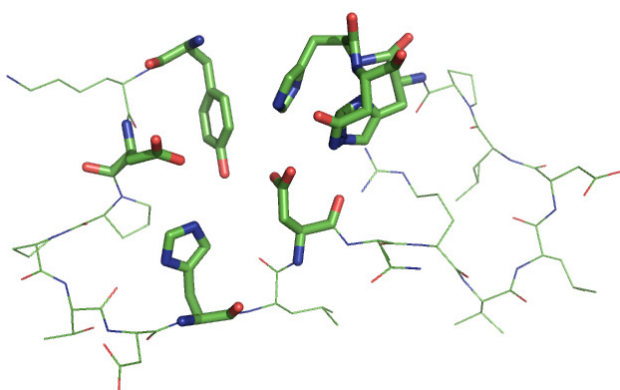
Ac-HisProHisHis-NH₂



Ac-HisProHisProHis-NH₂



Ac-LysHisProHisProHisGln-NH₂

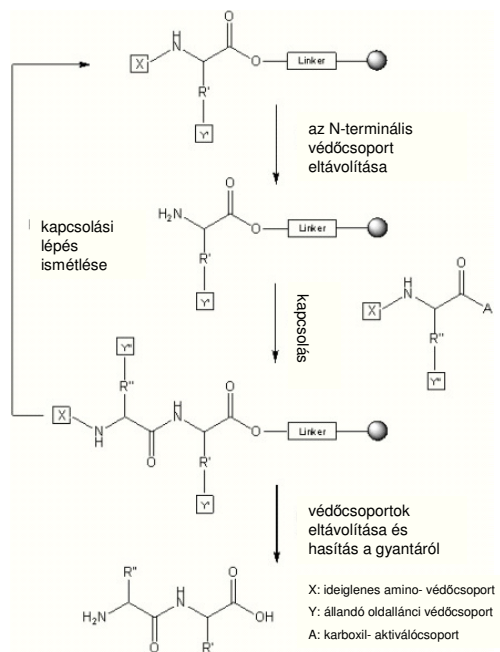


Ac-P20-NH₂ = Ac-YKDPPTDHL DQRVLDLP HHN-NH₂

5. Kísérleti- és vizsgálati módszerek

5.1. Szilárd fázisú peptidszintézis (SPPS)

Napjainkban a kis tagszámú peptidek egyik legegyszerűbb előállítási módja a szilárd fázisú peptidszintézis (*Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)*). Ehhez egy szilárd hordozóra (gyanta), megfelelő módon védett aminosavakra, kapcsoló-, és hasítószerekre van szükség. Az SPPS menetét sematikusán az **5.1.1. ábrán** mutatjuk be.



5.1.1. ábra: A szilárd fázisú peptidszintézis sematikus ábrája [104]

Munkánk során a peptidek előállítására az SPPS úgynevezett *Fmoc*-stratégiáját választottuk [104]. Ez annyit jelent, hogy a kapcsolni kívánt aminosavak az α -aminocsoportjukon Fmoc (9-fluorenil-metoxi-karbonil) védőcsoportot tartalmaztak (az X csoport az **5.1.1. ábrán**). Ennek a védőcsoportnak a jellemzője, hogy bázisérzékeny, azaz gyenge szerves bázissal, például piperidinnel (*PPD*) eltávolítható. Az **5.1.1. ábrától** eltérés, hogy mi olyan gyantát használtunk szilárd hordozóként (*Rink Amid* - borítottsága 0,61 mmol/g kötőhely, Novabiochem), amely aminocsoport kötőhelyeket tartalmazott, és kiindulási állapotban szintén Fmoc védőcsoportokkal ellátva. Az első aminosavat a karboxilcsoportján keresztül kapcsoltuk a gyanta kötőhelyeihez, és a kész peptid a gyantáról történő lehasítása után C-karboxamid formában vált szabaddá. A kapcsolni kívánt aminosavak oldalláncai a mellékreakciók elkerülése érdekében szintén megfelelő védőcsoportokat tartalmaztak. Ilyen, az ábrán Y-nal jelölt savérzékeny védőcsoportok, például a terc-butoxikarbonil (Boc), a tritil (trifenil-metil, Trt), a terc-butil-éter (O^tBu), stb., amelyek a szintézis befejeztével, a gyantáról történő hasítással azonos lépésben távolíthatók el, trifluorecetsavval (TFA) történő kezeléssel.

Az eljárás első lépése a gyanta duzzasztása volt, ami N-metil-pirrolidonnal (NMP, Aldrich) történt. Az Fmoc védőcsoport eltávolításához 20% PPD/NMP elegyet használtunk (Piperidin, Aldrich). A gyantáról lecsöpögő piperidines oldatrészleteket összegyűjtve, majd NMP, vagy DMF (dimetil-

formamid) segítségével százszorosára hígítva, a kapott oldat Fmoc koncentrációja, ebből pedig a felszabadult kötőhelyek száma spektrofotometriásan meghatározható ($\epsilon_{\text{Fmoc}, 301\text{nm}} = 7800 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$) a Beer-Lambert-törvény értelmében az Fmoc koncentrációja: $c = \frac{A}{\epsilon \cdot l}$, ahol $l = 1 \text{ cm}$.

Az N-terminálison Fmoc-védett aminosavak kapcsolásához általában fentiek alapján számított mennyiség háromszorosát használtuk. A kapcsolási reakció ideje az *in situ* keletkező aktív észter és a gyantán rögzített szabad aminocsoportok között 30 perc volt. Az alkalmazott kapcsoló reagensek a HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronium-hexafluorofoszfát, Senn Chemicals), a HOBT (N-hidroxi-benzotriazol- H_2O , Senn Chemicals) és DIEA (N,N-diizipropil-etilamin; Sigma) voltak NMP-ben oldva.

A kapcsolat sikerességét Kaiser-teszt segítségével követtük nyomon, amely a ninhidrin és szabad aminocsoport közti színreakción alapul. A szükséges oldatok: (1) fenol (8 g fenolt oldunk 2 ml abszolút etanolban); (2) KCN (13 mg kálium-cianidot oldunk 20 ml desztillált vízben ($c = 0,01 \text{ mol/dm}^3$), majd ebből 20 μl -t 980 μl piridinnel (Merck) hígítunk; (3) ninhidrin (1,0 g ninhidrint oldunk 20 ml absz. etanolban). Mindhárom oldatból 2-2 cseppet tettünk a néhány gyantaszemcséből álló mintára egy mikrokémcsőben melyet 2 percre forrásban lévő vízbe merítettük, hogy a színreakció lejátsszódjon. Sikeres kapcsolat esetén nincs szabad aminocsoport, azaz a teszt negatív: nincs kék elszíneződés. Ellenkező esetben meg kellett ismételni a kapcsolási lépést.

Az utolsó sikeres kapcsolat után a peptid N-terminális végének acilezése következett. Ehhez 10%-os ecetsavanhidrid oldatot használtunk (1 ml Ac_2O (Reachim), 8,5 ml NMP és 0,5 ml piridin). Ezután a gyantát többször átmostuk NMP-vel, majd kloroformmal (CHCl_3 , Sigma) és exikkátorban szárítottuk minimum egy éjszakán át, majd lemértük a tömegét. A tömegnövekedés alapján a kapcsolási reakciók sikerességére következtethetünk.

Mindezek után a peptidet lehasítottuk a gyantáról. Az általunk választott *Fmoc* szintézis során egy lépésben történt a szilárd hordozó, illetve az oldalfunkciók savérzékeny védőcsoportjainak eltávolítása a trifluorecetsavas (TFA, Sigma) kezelés során. A szükséges anyagok 0,1 mmol peptidre vonatkozóan: 10 cm^3 TFA, gyökfogóként pedig 0,75 cm^3 tioanizol (Sigma), 0,75 cm^3 1,2-etán-ditiol (Aldrich) és 0,25 cm^3 m-krezol (Sigma), amennyiben a peptid könnyen oxidálódó oldalfunkciókat (vagy ciszteint) tartalmaz. A többi peptid esetében 9,5 cm^3 TFA, 0,25 cm^3 víz, 0,25 cm^3 trietil-szilán (Sigma) elegyét használtuk. A szobahőmérsékleten, egy órán át történő lassú keverés után, a szerves oldószerek eltávolítása vákuumbepárlóval történt, cseppfolyós N_2 -es csapda használatával. Az így nyert ~5 cm^3 peptidoldatból a nyersterméket 40 cm^3 hideg (4°C) dietil-éterrel (Molar Chemicals) csaptuk ki. A peptidet 6000 rpm fordulatszámon centrifugálással választottuk el, majd az éteres mosást és az ezt követő ülepítést többször megismételtük. A peptid azonosítása ESI-MS-sel történt, tisztítása pedig HPLC-vel, amit liofilizálás követett.

5.2. Folyadékkromatográfia (HPLC)

A szilárd fázisú peptidszintézist követően az analízis és a tisztítás folyadékkromatográfia segítségével történt, ezen belül is az ioncsere- és a fordított fázisú módszert használtuk leggyakrabban. A kromatográfiás elválasztás során az elválasztandó komponensek egy álló- és egy mozgófázis (eluens) között oszlanak meg. A komponensek megkötődése az állófázison és visszajutása a mozgófázisba dinamikusan ismétlődik. Az elválasztás hajtóereje az egyes komponensek eltérő kémiai potenciálja az álló- és a mozgófázisban. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) esetében a hatékonyság növekedését a speciális megosztófázisok alkalmazása mellett, az igen apró szemcseméretű, nagy fajlagos felületű töltetek készítésével érték el. A tömör töltet következtében a mozgófázis áramoltatása átlagosan 15 MPa nyomáson történik, 0,1 és 10 cm³/perc közötti sebességgel. A komponensek elválasztása állandó, azaz izokratikus- vagy változó mozgófázis összetétellel, vagyis gradiens- elúcióval valósítható meg. Ez utóbbi esetben a különböző eluenseket célszerű az oszlopra juttatás előtt, egy kisnyomású cellában összekeverni. Fontos az eluens kigázosítása is, főleg az oldott oxigén eltávolítása, például ultrahangos fürdő alkalmazásával. A detektálás módja igen érzékeny pontja az elválasztásnak. A mai korszerű detektorok ~ 70%-ának működése UV/látható fényelnyelés mérésén alapul, közülük a diódasoros és a változtatható (többnyire kétcsatornás) hullámhosszon működőek a legelterjedtebbek [105].

A peptidok tisztítására Knauer típusú HPLC készüléket használtunk, fordított fázisú C18-as Phenomenex Jupiter 5 μ C18 300A (250 $\times$ 10 mm, 5 μ m) oszloppal ellátva. A fordított fázisú elválasztás során a peptidet hidrofób kölcsönhatások révén kötjük az oszlopra, az elúciót az eluens hidrofóbicitásának növelésével érjük el. A peptidcsoportok fényelnyelését 215 nm-en követtük. Lineáris gradienst alkalmaztunk, többnyire a következő módon: 0 – 5 perc: 100% A, 5 – 30 perc: 100% A $\rightarrow$ 60% A, 0% B $\rightarrow$ 40% B, 30 – 35 perc: 70% A $\rightarrow$ 100% A, 35 – 45 perc: 100% A. Az *A* oldat: 95% milliQ víz, 5% acetonitril, 0,1% TFA, a *B* oldat pedig: 95% AcCN, 5% milliQ víz, 0,1% TFA összetételű volt.

5.3. pH-potenciometria

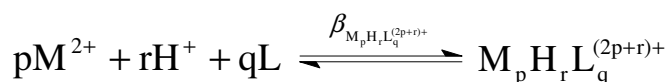
A ligandumok protonálódási állandóit, illetve a réz(II)-, cink(II)- és nikkel(II)- komplexek stabilitási állandóit potenciometriás módszer segítségével határoztuk meg. A titrálásokat vizes közegben végeztük $298,0 \pm 0,1$ K hőmérsékleten, 0,1 mol/dm³ ionerősség mellett, melyet NaCl vagy NaClO₄ (Fluka) segítségével állítottunk be. A réz(II)-, cink(II)-, nikkel(II)- és vas(III)klorid, illetve perklorát (Fluka) koncentrációit komplexometriásan határoztuk meg. A pH-metriás titráláshoz használt karbonátmentes NaOH (Sigma) koncentrációját pontos beméréssel készített kálium-hidrogén-ftalát (Sigma) oldat segítségével, a HCl, illetve HClO₄ pontos koncentrációját pedig a már ismert koncentrációjú NaOH-dal történő sav-bázis titrálás alapján állapítottuk meg. A mérés során az inert

atmoszférát nagytisztaságú argon gáz buborékolatásával érték el. A titrálásokat egy számítógép által vezérelt Dosimat 665 (Metrohm) automata buretta, egy Orion 710A digitális pH-mérő és egy Orion 8103BN félmikro, hidrogénionra (pH) érzékeny kombinált üvegelektrod segítségével végeztük. Az elektrod kalibrálása pH 2 – 11 között a módosított Nernst-egyenlet alkalmazásával történt:

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

ahol K_w a víz autoprotolíziséből származó állandó, melynek értéke $10^{-13.75}$ ($I = 0,1 \text{ mol/dm}^3$, $T = 298 \text{ K}$). A J_H és J_{OH} az elektrod erősen savas közegben, az üveg-gél zsugorodása és az üvegmembránnal érintkező víz kis aktivitása miatt pozitív, illetve lúgos közegben a gél oldódása és a nagy mennyiségben jelen levő alkálifémionok miatt, negatív eltéréseit okozzák a lineáris függvénytől. Az illesztési paraméterek kiszámítása a nem-lineáris legkisebb négyzetek módszere szerint történik, a tanszékünkön készült KALGRAN nevű számítógépes program segítségével.

A ligandumok protonálódási állandóit és pontos koncentrációját a SUPERQUAD [106] program segítségével határoztuk meg. Az oldatokban a fémion (M), a teljesen deprotonált ligandum (L) és a proton (H) között lejátszódó komplexképződési egyensúly a következő általános egyenlettel írható fel:



Ezen egyenlet alapján a képződő részecskék bruttó stabilitási állandóját a következő összefüggéssel adhatjuk meg:

$$\beta_{M_p H_r L_q^{(2p+r)+}} = \frac{[M_p H_r L_q^{(2p+r)+}]}{[M^{2+}]^p [H^+]^r [L]^q}$$

Az egyszerűség kedvéért a komplexek felírásakor a továbbiakban a töltéseket legtöbbször elhanyagoljuk. Ez azonban a fenti egyenletek szerint és a nem protonált ligandum (a fentiekben semleges ligandumot választottunk, mivel az általunk vizsgált védett peptidek többsége ilyen) töltése alapján egyszerűen számolható. A fenti egyenlet alapján, a PSEQUAD [107] nevű számítógépes program segítségével számítottuk a $\log\beta$ értékeket. A program a közelítő stabilitási állandókból, Newton-Raphson iterációval, kiszámolja a finomított állandók mellett, minden megadott pH értéknél, az összes jelenlévő részecske egyensúlyi koncentrációját, amit százalékosan a pH függvényében ábrázolva kapjuk a koncentrációeloszlási diagramot az egyes rendszerekre. Az egyes titrálásokra jellemző illesztési paraméter a kísérleti és a számított titrálási görbék pontjaihoz tartozó mért és számolt térfogati vagy pH értékek különbségének átlagából származtatható.

A protonálódási és komplexstabilitási állandókat minden esetben minimum három független titrálásból (50 – 80 adatpont titrálásonként) határoztuk meg, pH 2 – 11 tartományban, 1:2, 1:1, illetve esetenként 2:1 fém:ligandum mólarányú rendszerekben ($4 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 - 3 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$

koncentráció-tartományban). A pH-ra az illesztési paraméter értéke egyik esetben sem volt nagyobb 0,002-nél.

5.4. UV/látható spektrofotometria

Az átmenetifémionok részlegesen töltött d pályáinak jelenléte felelős, többek között, a látható hullámhosszúságú fény abszorpciójáért. Tehát a legtöbb átmenetifémion komplexe színes a $d-d$ elektronátmeneteknek köszönhetően. A d elektronok magasabb energiaszintre való jutása azonban általában a spin- és Laporte kiválasztási szabályok értelmében tiltott, azért a komplexek halvány színűek.

Miközben a $d-d$ abszorpciós sávok például a réz(II)- és nikkell(II)komplexek esetén az egyik legfontosabb spektrális sajátosságuk, az elektronátmenetek másik osztálya, a töltésátviteli (CT) sávok vizsgálata is fontos szerepet játszhat a komplexek szerkezetének felderítésében. Míg az előző esetben az elektronátmenet a fémes pályákon való átrendeződés eredménye, addig a töltésátviteli sávok elektron donor – elektron akceptor átmenetekkel jellemezhetőek. Ezen átmenetek eredményeként egyedi, nagy intenzitású (akár ezerszer nagyobb ϵ , mint a $d-d$ átmeneteknél) abszorpciós sávok jelennek meg főként az UV/látható tartományban.

Réz(II)- és nikkell(II)ionok jelenlétében a pH-metriás titrálások minden pontjában *in situ* elnyelési spektrumokat vettünk fel egy Ocean Optics PC 2000 típusú üvegszál-optikás, diódasoros, bemenülőfejes spektrofotométer segítségével. A készülék a látható hullámhossz-tartományban (400 – 800 nm) működik. A többi esetben az UV/látható spektrumokat egy Hewlett Packard 8452A diódasoros spektrofotométer segítségével rögzítettük. A spektrumok kiértékeléséhez a PSEQUAD [107] programot használtuk.

5.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A peptidek és fehérjék térszerkezetének vizsgálatára szolgáló fizikai-kémiai módszerek közül a cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia az egyik legelterjedtebb szerkezetvizsgáló módszer, az NMR és a röntgen-diffrakció mellett. Ez utóbbiakkal szemben azonban fontos előnye, hogy a CD mérések vizes oldatokban végezhetőek el, és sokkal kisebb koncentrációban, mint amit az NMR mérések igényelnek. Ez főként a biológiai rendszerek vizsgálatánál fontos. Egyrészt azért mert nehezen állítható elő megfelelő anyagmennyiség, másrészt pedig, mert a nagyobb koncentráció a teljes rendszer megváltozását eredményezheti.

A cirkuláris dikroizmus az abszorpciós spektroszkópiai módszerek közé tartozik, tehát csak olyan energiatartományban mérhető, ahol az elektronátmenet során egyébként is fényelnyelést tapasztalunk. A CD spektrumokból a molekulában lévő kromofórok egymáshoz képesti térbeli elrendeződéséről, illetve a különböző molekulák kölcsönhatásáról kapunk információt. A vizsgálatok

során előnyt jelent, hogy a keskenyebb sávok miatt ritkábban fordul elő átfedés, ellentétben az UV/látható spektrumoknál tapasztaltakkal, illetve a Cotton effektus előjeléből további fontos szerkezeti információ nyerhető. Ezzel együtt azonban a spektrumok kiértékelése sokszor igen bonyolult.

Általánosan megfogalmazva az optikai aktivitást mutató szerves és szervetlen vegyületek egyrészt elforgatják az oldatukon keresztülbocsátott poláros fény síkját, másrészt a síkban polarizált fénysugár jobbra, illetve balra cirkulárisan polarizált komponensét eltérő mértékben nyelik el. Ez utóbbi jelenségen alapul a CD spektroszkópia: a kétféle fénysugár abszorpciójának különbségét ($\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$) a hullámhossz függvényében ábrázolva kapjuk a CD spektrumot.

A biomolekulák nagy része rendelkezik egy vagy több kiralitás-központtal, ami általában optikai aktivitást eredményez. A polipeptidek és fehérjék szerkezetvizsgálatában főként a CD spektrum ultraibolya tartománya informatív. Az amid-kromofórok elnyelési hullámhossz-tartományában (180 nm – 250 nm) ezen csoportok egymáshoz képesti orientációjára, tehát az egyes másodlagos szerkezeti elemekre (α -hélix, β -redő, β -kanyarok, poliprolin szerkezet, stb.) jellemző spektrumok mérhetők. Mivel a kromofórok párhuzamos beállása eredményezi a CD jelben a legnagyobb erősítési effektust, ezért a másodlagos szerkezeti elemek közül az α -hélixnek a legnagyobb a CD jele (egy pozitív csúcs 195 nm és két negatív csúccsal 222 nm és 208 nm környékén). A β -lemezes szerkezetek általában egy negatív csúccsal 216 nm és egy pozitív csúccsal 195 nm környékén, illetve a β -kanyarok két pozitív csúccsal 225 és 205 nm körül, valamint egy nagy negatív csúccsal 190 nm alatt jellemezhetők. Egy fehérje távoli UV tartományban felvett CD spektruma jó közelítéssel az egyes másodlagos szerkezeti elemek százalékos hozzájárulásának a megfelelő összege. A közeli UV tartomány (250 – 350 nm) a konjugált kettőskötést tartalmazó oldalláncokról, illetve ezek egymáshoz viszonyított térállásáról szolgáltat információt (esetenként a ciszteinek oxidációja során keletkező kovalens kötésű diszulfidhidak jelenlétéről is), vagyis a harmadlagos szerkezetről ad felvilágosítást. A CD spektroszkópia segítségével tehát fontos információ nyerhető a fehérjék szerkezetéről (a gerinc és az oldalláncok asszimetriájáról is), valamint a szubsztrátkötés, fémion-koordináció, oligomerizáció, denaturáció, stb. hatására bekövetkező szerkezetváltozásokról [108,109].

A látható fény hullámhossz-tartományában felvett CD spektrumokból, a fehérjék esetleges egyéb kromofórjain túl, a $d-d$ átmenetek koordináció során indukált optikai aktivitásáról nyerhető információ. Itt a központi fémionhoz, mint kromofórhoz, koordinálódó donorcsoportok minősége, valamint a fémion körüli geometriai elrendeződése befolyásolja az elnyelés mértékét. A fémkomplexek asszimetriáját, azaz optikai aktivitását (i) a fémion-donoratom együttesben fellépő királis elrendeződés, (ii) konfigurációs asszimmetria (a kelátgyűrűk elrendeződése királis a fémion körül), (iii) konformációs asszimmetria (a kelátgyűrűk konformációjának kiralitása), (iv) magának a ligandumnak a kiralitása (a kiralitás centrum hat a fémionra a kötésekben keresztül) okozhatja. Általában az utóbbi két hatás a meghatározó a kinetikailag labilis réz(II)-, illetve nikkel(II)komplexek vizes oldataiban. Általánosan elmondható hogy a peptidkomplexekben az amid-nitrogének koordinációja esetén a legnagyobb a CD

effektus, jóval kisebb hatékonysággal közvetítik a környezet kiralitását a karboxilát-oxigének és az amino-nitrogének.

A vizsgált fehérjék és a *P20* peptid fémion távollétében és jelenlétében felvett UV-CD spektrumait a dániai Institute for Storage Ring Facilities, University of Aarhus (ASTRID–ISA), szinkrotron sugárzásos (SR-CD) [110] berendezése segítségével rögzítettük. A részecskegyorsítóból a lineárisan polarizált fény egy CaF_2 -os ablakon halad keresztül a CD készülékbe, folyamatos N_2 áram mellett, ahol a modulátor a polarizált fényt felváltva jobbra illetve balra cirkulárisan polarizált fénysugárrá átalakítja. A CD jelek rögzítésére a modulátorral szinkronizált fotoelektron sokszorozó detektort használtunk. A készüléket a kámforszulfonsav spektruma alapján kalibráltuk. A spektrumokat 0,5 mm-es kvarcküvetében, 165 – 350 nm hullámhossz-tartományban rögzítettük, vizes közegben, 298 K hőmérsékleten, 0,05 – 0,15 mg/cm^3 ligandumkoncentráció mellett.

A peptidkomplexek UV/látható CD spektrumait Jasco J-710 illetve Jobin-Yvon CD6 spektrométerek segítségével rögzítettük, vizes közegben, szobahőmérsékleten, 300 – 800 nm tartományban, 0,1 és 1,0 cm optikai úthossz mellett, $2,0 \times 10^{-4}$ – $2,0 \times 10^{-3}$ mol/dm^3 fémion koncentráció-tartományban. Az egyedi spektrumokat a PSEQUAD nevű program segítségével számítottuk ki [107]. Az irodalomban használt jelölések kétfélék, a függőleges tengelyen a moláris abszorbancia különbségét ($\Delta\epsilon$), vagy a moláris ellipticitást ($[\theta]$) ábrázolják ($\Delta\epsilon = \frac{[\theta]}{2398}$ fok· dm^2/mol).

Mi többnyire a $\Delta\epsilon$ -t ábráztuk $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$ egységben.

5.6. ESR spektroszkópia

A paramágneses, azaz kompenzálatlan spinű elektront tartalmazó réz(II)komplexek ESR spektrumait egy JEOL-JES-FE-3X típusú spektrométer segítségével rögzítettük, 100 kHz modulációs frekvenciát alkalmazva, 298K-en, Ar atmoszférában, a pH-potenciometriával megegyező körülmények között. Egy Masterflex CL perisztaltikus pumpa biztosította az oldat állandó áramlását a kapilláris belsejében. Az adatok rögzítése minden egyes pH értéknél 2 perc várakozás után történt, az egyensúly beállása érdekében.

5.7. Tömegspektrometria (ESI-MS)

A peptidek azonosítását, a pontos (monoizotópos) molekulatömeg ismeretében, tömegspektrometria segítségével végeztük. E méréseket a Finnigan TSQ-7000 tripla kvadrupol analizátoros, elektropray ionizációs (ESI) ionforrással ellátott Finnigan-MAT, San Jose, CA tömegspektrométeren végeztük. A készüléket pozitív ion módban használtuk (tömegtartomány: 10 – 2500 m/z), a kapilláris feszültség 4,5 kV volt, ködképző gázként N_2 -t használtunk. A nyers peptidek vizes oldatát, illetve a folyadékkromatográfiás tisztítás során gyűjtött frakciókat egy HPLC pumpa által

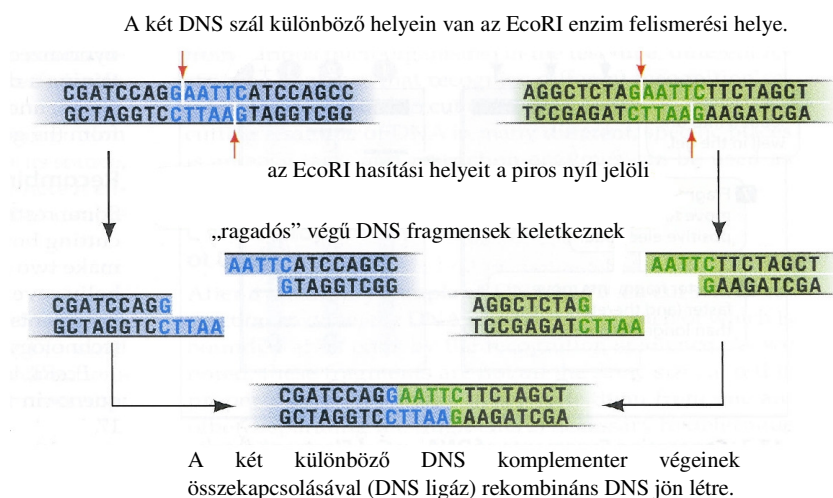
generált mozgófázissal jutattuk a készülékbe (mozgófázis: metanol:víz:hangyasav = 50:50:0,1 térfogatarányban; HPLC pumpa: Applied Biosystems 140C; áramlási sebesség 250 µl/min; mintatérfogat: 5 µl).

5.8. Molekuláris biológiai módszerek

Jelen PhD munka bioszervetlen kémiai kutatások keretén belül készült, de kutatócsoportunkban meglehetősen új biológiai eljárásokat is alkalmaztunk. Ezért célszerűnek találtuk a címben jelzett módszerekről a kevésbé jártas kutatók részére az alábbiakban valamivel részletesebb leírást nyújtani.

A molekuláris biológia és ezen belül a rekombináns DNS technológia ma már egy rutinszerű eljárás, mely forradalmasította a biotechnológiát az elmúlt 25 évben. A módszer lényege a DNS alapú fehérjegyártás baktériumok segítségével. A rekombináns DNS technológia segítségével kifejezni kívánt fehérjét kódoló DNS-t (gén) állítjuk elő és sokszoroztjuk. Ahhoz, hogy a DNS-ből kifejezhető legyen a fehérje, egy megfelelő gazdasejtbe (prokarióta vagy eukarióta) kell bejuttatnunk a gént (ezt nevezzük transzformálásnak). Ez az idegen DNS a sejt replikációs egységének részévé kell váljon ahhoz, hogy a fehérjetermelés megvalósulhasson. Ez úgy érhető el, hogy a DNS gént egy olyan „hordozó” DNS-sel együtt építjük be, amely már tartalmazza a sejtben való replikációért (DNS másolás) és transzkripcióért (a DNS RNS-sé történő átírása) felelős egységet. Ezt a hordozó DNS-t nevezzük vektornak. A vektorok kis méretű, általában 2000 – 6000 bázispárból álló cirkuláris DNS molekulák.

A célfehérjét kódoló DNS szakasz restrikciós endonukleáz enzimek segítségével építhető be a hordozóba. A restrikciós endonukleázok a DNS hasítását végzik specifikus, többnyire úgynevezett palindrom bázisszekvenciáknál. Az egyik legismertebb restrikciós endonukleáz, az EcoRI például, a kettős szálú DNS-t úgy hasítja, hogy mindkét szálon néhány, egymással komplementer bázis marad szabadon, ún. „ragadós” (sticky) végekkel (5.8.1. ábra).



5.8.1. ábra: A DNS hasítása és összeillesztése: az enzim a felismerési helyének megfelelően elhasítja a kettős szálú DNS-t (a kék és zöld szín két különböző DNS szálát jelöl). A hőmérséklet emelésével a szálak szétválnak (denaturálódnak), ragadós végeket eredményezve, amelyek a hőmérséklet csökkentésével hibridizálódnak a komplementer fragmensekkel, így rekombináns DNS jön létre

Két különböző DNS azonos szekvenciájánál, egy restriktációs enzim azonos szabad végeket eredményez. Ezek a ragadós végek az egymással komplementer bázisok közötti hidrogénkötéseken keresztül kapcsolódnak össze. Ahhoz, hogy az új képződmény stabilizálódjon, kovalens kötésnek kell kialakulnia. Ehhez egy újabb enzim, egy DNS ligáz közreműködésére van szükség, mely folyamatossá teszi a foszfátészter láncot. A leegyszerűsített folyamatot az **5.8.1. ábra** szemlélteti. A vektor és a célfehérje hasonló kezelése után létrejött új rekombináns cirkuláris vektort plazmidnak nevezzük.

A vektorok további előnye, hogy olyan enzimek génjét is kódolják, amelyek bizonyos antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát eredményeznek, ezzel genetikailag kiválaszthatóvá teszik a rekombináns plazmidot hordozó gazdasejtet. További fontos tulajdonságai a plazmidoknak, hogy képesek a gazdasejt kromoszómáitól függetlenül is sokszorozódni, illetve átíródni, ezzel a sok száz másolatot tartalmazó sejtben a célfehérje nagy mennyiségben fejeződhet ki: a célfehérje akár a sejtben található összes fehérje 50%-a is lehet [111].

A rekombináns fehérjék előállítása során, a fehérje oldhatóságának, tisztításának és/vagy aktív formában való kifejezésének elősegítése érdekében előfordul, hogy a célfehérjét egy másik fehérjéhez kapcsolva, fúziós fehérjeként termelik. A peptidek és kisméretű fehérjék rekombináns technológiával való előállítását szintén ilyen fúziós fehérje teszi lehetővé. Az egyik legismertebb fúziós fehérje a Glutathion S-transzferáz (GST), mely elősegíti a célfehérje oldható formában való kifejezését az *E. coli* baktériumokban, illetve lehetővé teszi a fehérje tisztítását affinitás kromatográfia segítségével.

5.8.1. Fehérjék előállítására kidolgozott módszer Glutathion S-transzferáz gén-fúziós rendszer segítségével

Az alábbiakban a kísérleti munka rövid vázlata olvasható, a *Függelék* fejezetben részletesebben is kitérek az egyes lépésekre, amelyeket a kísérleti munka során végeztem.

Az első feladat az *Escherichia coli* (*E. coli*) baktériumok előkészítése és transzformálása, azaz a plazmid bejuttatásával a gazdasejtbe. A kiválasztott plazmid vektorok a pGEX-6P-1-**P20** és -**P24** voltak (a magyarázat a *Függelék*ben olvasható). Jelen esetben ampicillinre szelektálható transzformálást hajtottunk végre a BL21-DE3 kompetens sejteken, ami azt jelenti, hogy csak azok a baktériumok maradnak életben, amelyek a célfehérjénket fogják termelni, hiszen ez a plazmid kódolja az ampicillin rezisztenciát okozó β -laktamáz enzimet is. A baktériumtelepeket agarózgél lemezekben növesztettük. Egy telepet kiválasztva, megfelelő tápoldatban, 37°C-on a baktériumokat tovább tenyésztjük. (Érdekes a transzformált sejtekből egy Eppendorf csőben glicerinnel történő tárolása után egy mintát -80°C-on tárolni a későbbi ismételt kísérletekhez.) A baktériumok száma a tápoldat 600 nm-en mért optikai sűrűségének (OD_{600} : optical density) méréséből becsülhető. Általában 0,6-os OD_{600} érték elérése után a célfehérje termelését izopropil- β -D-tiogalaktóz (IPTG, Sigma) hozzáadásával indukáltuk. Ezzel elérhető, hogy a baktériumok a kívánt célfehérjét nagy mennyiségben állítsák elő. Az ezt követő centrifugálás után, a sejteket foszfátpufferben szuszpendáltuk, majd ultrahanggal roncsoltuk a sejtfalat. Mintát véve ebből a teljes fehérjeszett vizsgálható. Centrifugálással szétválasztottuk a vízben oldható fehérjéket a

sejttörmeléktől, majd a fölülúszóból és az ismét szuszpendált csapadékból is mintát vettünk rendre az oldható és az aggregálódott fehérjék vizsgálatához. A fenti mintákat SDS-PAGE (nátrium-dodecilszulfát - poliakrilamid gélelektroforézis) segítségével analizáltuk. Kedvező esetben a célfehérje az oldható fehérjék között található. Megfelelő mennyiségű fehérje kifejezése után a következő lépés a tisztítás volt: a specifikus kölcsönhatásokon alapuló affinitás kromatográfia előtt egy előtisztítást végeztünk egy DEAE-52- cellulóz (Whatman) anioncserélő oszlop beiktatásával. SDS-PAGE segítségével vizsgáltuk meg, hogy mely frakciók tartalmazzák 26 – 31 kDa molekulatömegű fehérjét (megfelelő standard fehérjemarker alkalmazásával). Az affinitás-kromatográfias tisztítási lépéshez *Glutathion Sephrose 4B* gélt tartalmazó oszlopot használtunk, amely szelektíven köti a GST-t, illetve a GST-fúziós fehérjét. Az oszlopról a GST-fúziós fehérjék redukált glutationnal, a GST szubsztrátjával eluálhatók. Újabb SDS-PAGE után, amely segítségével megbizonyosodtunk arról, hogy a termék nagy tisztaságú, a fehérjeoldatból a redukált glutathion dialízis vagy ultraszűrés segítségével távolítható el (esetleg másik pufferre térhetünk át, illetve a nemkívánatos sókat is eltávolíthatjuk az oldatból). Az utóbbi módszer alkalmas a fehérje koncentrációjának növelésére is. A Bradford-módszerrel a „megfestett” fehérjék koncentrációját spektrofotometriásan határoztuk meg [112]. Ezt követően a fehérjét -20°C hőmérsékleten tároltuk a későbbi vizsgálatok elvégzéséig. A fenti kísérlettel párhuzamosan egy ellenőrző kísérletet is végrehajtottunk a célfehérjét nem tartalmazó vektorral, mely csak a *Glutathion S-transzferáz* (GST) fehérjét fejezi ki. Egyéb negatív kontrollkísérletek is történtek transzformálás, illetve a fehérje kifejezés indukálása nélkül.

5.8.2. Fémionkötő tulajdonságok vizsgálata nikkel-affinitás kromatográfiával

A fehérjék tisztítására használt nikkel-affinitás kromatográfia a hexa-, vagy dekahisztidin peptidrészlet és a gyantán rögzített nikkel(II)ionok közötti koordinatív kölcsönhatáson alapul. Ezt a jelenséget kihasználva a Ni-affinitás oszlopot a fehérjék fémionkötő sajátságainak vizsgálatára is alkalmazhatjuk. A kísérletekben HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma) affinitásoszlopot használtunk, melyben 1 cm^3 töltet $\sim 2\text{ mg}$ hisztidinben gazdag szekvenciát tartalmazó fehérjét képes megkötni. Erre az oszlopra kötöttük fel a fúziós peptidet. Ezután az oszlopot pufferrel ($50 \times 10^{-3}\text{ mol/dm}^3$ nátriumfoszfát, pH 8,0; $0,3\text{ mol/dm}^3$ NaCl; $10 \times 10^{-3}\text{ mol/dm}^3$ imidazol) mostuk, az aspecifikus kötések megakadályozása céljából. Végül néhány cm^3 , $1,0\text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú imidazololdattal eluáltuk a fehérjét. A kísérlet közben folyamatosan gyűjtött frakcióban a fehérje jelen-, illetve távollétét SDS-PAGE segítségével ellenőriztük.

5.9. Fehérje-krisztallográfia

A fehérjék, illetve fehérjekomplexek szerkezetének meghatározására manapság az egyik legelterjedtebb és legnagyobb teljesítőképességű módszer a röntgendiffrakciós vizsgálat. Mivel a röntgensugárzás hullámhossza összemérhető a kristálysírk pontjainak távolságával, ezért a rácspontok szórják a fényt, és e szórt sugarak interferenciája miatt diffrakciós kép jön létre (Bragg-

törvény: $2d \sin \theta = n\lambda$). Ez a szórás kép jellemző az egykristály elemi cellájának típusára, méretére, és a molekulákat alkotó atomok térbeli elrendeződése is meghatározható belőle. A röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálathoz tehát elengedhetetlenül szükséges a megfelelően nagyméretű, jól diffraktáló (nagy rendezettségű) egykristályok előállítása, ami sok esetben meglehetősen időigényes és nehéz feladat.

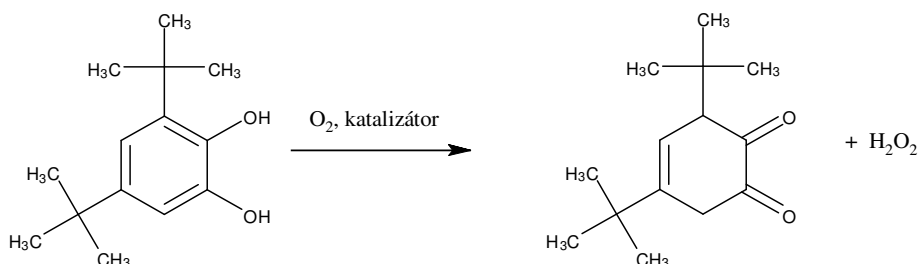
A fehérjék kristályosítását befolyásoló legfontosabb paraméterek az oldhatóság (telítési koncentráció), a fehérjeoldat tisztasága, a gócképződés és gőcnövekedés, mely jó esetben az egykristály növekedésének befejezésével zárul. A kristályosítás során lejátszódó egyensúlyi folyamatok telítési görbével jellemezhetőek, ahol az oldhatósági görbe felett ún. labilis, átmeneti és metastabilis tartományokban játszódik le a gócképződés és a kristálynövekedés. A kristályosodást számos egyéb tényező is befolyásolja, mint, például a hőmérséklet, nyomás, ionerősség, pH, sűrűség, a fehérjeoldat kiindulási koncentrációja, a fehérje stabilitása, szubsztrátjainak, fémionoknak, illetve szennyezők jelenléte, valamint olyan környezeti tényezők, mint a zajszint, elektromos és mágneses erők jelenléte. Ezért a fehérjék kristályosítására vonatkozó általános érvényű szabály nem adható meg, a tapasztalati úton nyert szabályokat követve, sok próbálgatás, hasonlósági vizsgálatok és türelem vezethet csak eredményre. Általánosan elmondható, hogy a kristályosítandó fehérjeoldat legalább 95%-os tisztaságú és lehetőleg $5 - 30 \text{ mg/cm}^3$ koncentrációjú kell legyen. A kristályosító oldat kiválasztásánál olyan ionos vagy poláros kicsapószer kell választani, amely megfelelő módon csökkenti a fehérje oldhatóságát. Emellett sokszor szükség van valamilyen kis koncentrációban jelen levő sóoldatra, hogy megakadályozzuk a fehérje teljes kicsapódását főleg a fehérje izoelektromos pontja körüli pH tartományban, és megfelelően kiválasztott pufferre, illetve egyéb adalékokra: viszkozitást növelő szerekre, fémionokra, inhibitorokra, redukálószerekre, szubsztrátokra, stb [113,114].

A kristályosítás során első lépésként azokat a körülményeket kell behatárolni, ahol az instabil tartományban elindulhat a kristályképződés, majd második lépésben ezen a körülményeket kell optimalizálni a megfelelő méretű és szerkezetű kristályok keletkezése érdekében. A fehérjék kristályosítása során leggyakrabban a „függő”- és az „ülőcseppes” módszereket alkalmazzák. Mindkettő a különböző koncentrációjú oldatok között fellépő gőzdiffúzióan alapul. A kristályosításhoz egy olyan kristályosító tálcát használunk, amelynek mélyedéseibe $500 - 1000 \mu\text{l}$ kristályosító oldatot teszünk, majd a fehérjeoldat $1 - 2 \mu\text{l}$ mennyiségét összekeverjük $1 - 2 \mu\text{l}$ kristályosító oldattal, és ülőcsepp esetén egy erre kialakított kis mélyedésbe, függőcsepp módszer esetén pedig egy üveglemezre helyezük a cseppet, és ezzel fedjük le légmentesen a kristályosító oldatot tartalmazó kádat. Mivel a fehérjét tartalmazó csepp egyéb komponensekre vonatkoztatott koncentrációja kisebb lesz, mint a kristályosító oldaté, vízgőz fog diffundálni az anyaoldatba, és egy bizonyos koncentrációhatárnál elkezdődik a fehérje kristályosodása.

5.10. Aktivitásvizsgálatok oxidatív reakciókban

5.10.1. Pirokatechin-oxidáz aktivitás mérése

A pirokatechin-oxidáz enzimek *orto*-fenol származékok kinonná történő átalakulását katalizálják. A tanulmányozott modellkomplexek katalitikus hatásának vizsgálata során gyakran használt modellreakció a 3,5-di-tercbutil-pirokatechin (H₂dtbc) oxidációja, melynek során 3,5-di-tercbutil-*o*-kinon (dtbq) képződik (**5.10.1. ábra**). A termék intenzív sárga színű, így a folyamat spektrofotometriásan, 400 nm hullámhosszon ($\epsilon_{400} = 1900 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$) jól követhető. A 3,5-di-tercbutil-pirokatechin, mint modellszubsztrát előnye, hogy a két elektronküldő tercbutilcsoport kedvez az oxidációs reakciónak.



5.10.1. ábra: A 3,5-di-tercbutil-pirokatechin-oxidációja 3,5-di-tercbutil-ortokinonná

A kinetikai méréseket, a termék rossz vízoldhatósága miatt, 86 %(m/m) metanol-víz elegyben végeztük. Az állandó kiindulási oxigénkoncentrációt a metanol O₂ gázzal történő folyamatos telítésével biztosítottuk. A reakcióelegyek pH-ját biológiai pufferekkel (MES, CHES, HEPES, CAPS) állítottuk be, a reakcióelegyben lévő pufferkoncentráció $4,0 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ volt, és standard pufferekkel kalibrált (pH = 4,0; 7,0 és 10,0) kombinált üvegelektóddal határoztuk meg. Mivel a metanol-víz elegyben az üvegelektód potenciálja megváltozik, az aktuális pH-t a Bates [115] féle módszerrel számoltuk ki (a mért pH értékhez hozzáadtunk 0,28 egységet). A víz ionszorzata ebben a közegben $pK_w = 15,6$ [116]. A reakcióelegyben az ionerősség $0,1 \text{ mol/dm}^3$ értékét a pufferek mellett, NaCl oldattal állítottuk be, az állandó 298K hőmérsékletet termosztálással biztosítottuk. A számolt kinetikai adatokat minden esetben korrigáltuk a katalizátort nem tartalmazó oldatokban mért autooxidációval, vagyis a 3,5-di-tercbutil-pirokatechin autooxidációját minden mért szubsztrátkoncentrációnál külön meghatároztuk, és ennek értékét levontuk a komplex által katalizált reakció sebességéből. A kinetikai paramétereket (K_M és k_{kat}) a kezdeti sebességek módszerét alkalmazva, illetve telítési kinetikai vizsgálatokból származtattuk, a Michaelis-Menten féle modell alapján.

Ahhoz tehát, hogy tanulmányozni tudjuk az enzimek vagy az enzimutánzó modellvegyületek működését, szükségünk van az aktivitásuk kinetikai leírására. A katalitikus reakció sebességét (V) az időegység alatt keletkező termék mennyiségével lehet megadni, amely változik a szubsztrátkoncentrációval ($[S]$). A reakció sebessége egy ideig lineárisan nő $[S]$ növekedésével, majd maximumot ér el eléggé nagy szubsztrátkoncentráció mellett, azaz a szubsztrátra nézve nulladrendűvé válik. Ha a keletkező termék mennyiségét az idő függvényében ábrázoljuk, és a kezdeti, lineáris

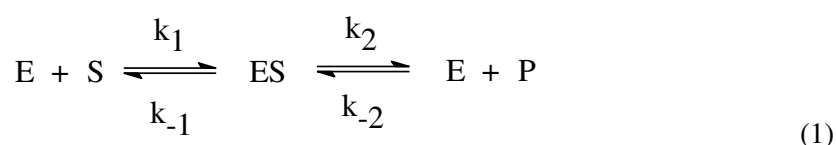
szakaszra egyenest illesztünk, a meredekségből minden egyes [S] esetében meghatározható a kezdeti sebesség (V_0) értéke.

A szubsztrátként használt 3,5-di-tercbutil-pirokatechin (H_2dtbc) oxidációját 3,5-di-tercbutil-ortokinonná

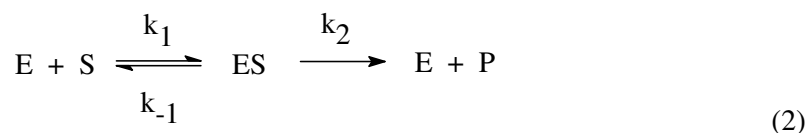
(dtbq) 1:1 fém:ligandum arány mellett végeztük. A kezdeti sebesség meghatározásához ($V = \frac{dA}{\varepsilon \cdot l}$) az

abszorbancia-idő függvény kezdeti, lineáris szakaszára illesztettünk egyenest, amikor a reaktánsoknak maximálisan 4 – 5 %-a alakul át, így a szubsztrátkoncentráció jó közelítéssel állandónak tekinthető.

Az enzimaktivitás meghatározásához Leonor Michaelis és Maud Menten egy egyszerű kinetikai modellt dolgoztak ki. Feltevésük szerint a legegyszerűbb enzimek működése az alábbi általános egyenlettel írható le:



vagyis a termék képződése egy k_1 sebességi állandóval keletkező enzim-szubsztrát komplex (ES) kialakulásán keresztül történik meg. Ezután két út lehetséges, amint azt az (1) egyenlet is tükrözi: az ES disszociálhat enzime (E) és szubsztrátra (S) k_{-1} sebességi állandóval, vagy termék (P) alakulhat, a k_2 állandóval jelölt folyamatban. A reakció kezdetén csak elhanyagolhatóan kevés termék alakul vissza, tehát az $E + P \rightarrow ES$ folyamat elhanyagolható mértékben játszódik le, így a fenti egyenlet egyszerűsíthető:



A folyamat egyszerűsítése érdekében, a Michaelis-Menten-féle kinetikai modell azt feltételezi, hogy a reakció megindulása után a köztitermék koncentrációja állandó, azaz a stacionárius (steady state) közelítés értelmében az ES képződésének és bomlásának sebessége állandó, tehát:

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3)$$

További egyszerűsítésként egy új konstans, K_M -t, definiálunk (Michaelis állandó):

$$K_M = [E][S]/[ES] = (k_{-1} + k_2)/k_1 \quad (4)$$

Mivel az enzim koncentrációja sokkal kisebb, mint a szubsztraté, ezért a szabad szubsztrátkoncentráció jó közelítéssel megegyezik a teljes szubsztrátkoncentrációval, míg a szabad enzim koncentrációja:

$$[E] = [E]_T - [ES] \quad (5)$$

és ezek alapján könnyen kifejezhető az átmeneti komplex koncentrációja:

$$[ES] = [E]_T[S]/([S] + K_M). \quad (6)$$

Mivel a reakció sebessége $V_0 = k_2[ES]$, a (6)-os egyenletet ebbe behelyettesítve:

$$V_0 = k_2[E]_T[S]/([S] + K_M). \quad (7)$$

Maximális sebességet akkor érünk el a reakció során, ha az enzim katalitikus helyei teljesen telítettek a szubsztráttal, vagyis $[E]_T = [ES]$, tehát:

$$V_{\max} = k_2[E]_T, \quad (8)$$

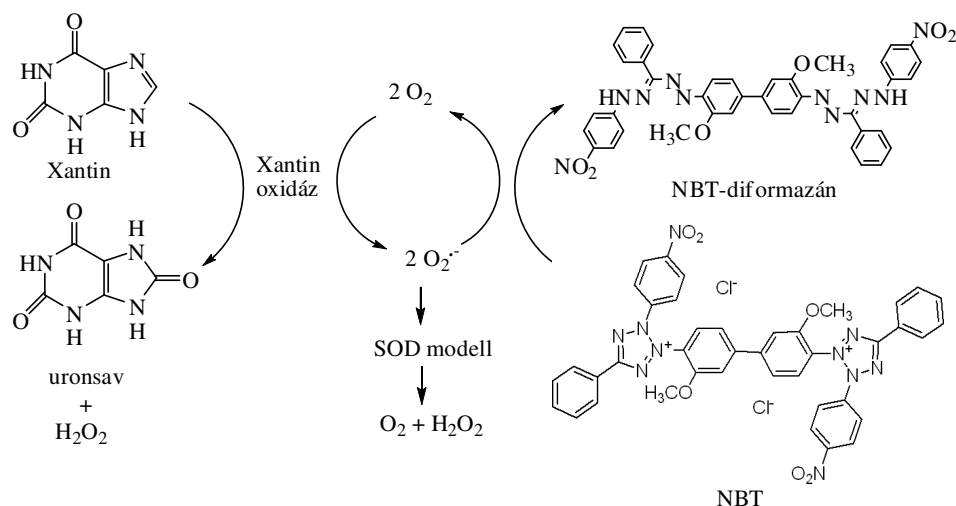
ezt visszahelyettesítve a (7)-es egyenletbe kapjuk az úgynevezett Michaelis-Menten egyenletet:

$$V_0 = V_{\max}[S]/([S] + K_M). \quad (9)$$

A (9)-es egyenletből látszik, hogy K_M megegyezik azzal a szubsztrát koncentrációval, ahol $V_0 = V_{\max}/2$. Ugyanakkor, mivel a reakciók döntő többségénél maga a kémiai átalakulás a sebességmeghatározó lépés, tehát a $k_1, k_{-1} \gg k_2$, a Michaelis állandó (K_M) jó közelítéssel egyenlő az ES komplex disszociációs állandójával, azaz a szubsztrátnak az enzimhez való kötődésének erősségéről is információval szolgál, tehát minél nagyobb K_M értéke, annál gyengébb a kölcsönhatás. Az enzimek esetében K_M értéke általában 10^{-1} és 10^{-7} mol/dm³ között változik. A maximális sebesség ($V_{\max}$) megadja a katalitikus ciklusszámot, vagyis egységnyi idő alatt termékké alakított szubsztrátok számát, abban az esetben, amikor az enzim teljesen telített a szubsztráttal. Ezért a k_2 kinetikai állandót k_{kat} -nak is szokták nevezni. Sok enzim esetében ez a szám 1 és 10^5 s⁻¹ között változik. Az irodalomban az enzimátikus folyamatok katalitikus hatékonyságának meghatározására a k_{kat}/K_M (s⁻¹mol⁻¹dm³) sebességi állandót is szokás használni. Ennek az értéknek a megadásával összehasonlítható például egy enzimnek a különböző szubsztrátokhoz való kötődése: minél nagyobb ez az érték, annál nagyobb az enzim hatékonysága. Elvben a k_{kat}/K_M maximális értékét a diffúziós gát határa szabja meg, ami 10^9 s⁻¹mol⁻¹dm³ körüli érték.

5.10.2. Szuperoxid-dizmutáz aktivitás mérése

A Cu,Zn-szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim a szuperoxid gyökanion diszproporcióját katalizálja ($k \sim 2 \times 10^9$ s⁻¹mol⁻¹dm³, pH = 7,4) amint azt a 3.1.1. fejezetben kifejtettük. Az enzim működését utánzó fémkomplexek aktivitása modellreakciók segítségével, közvetve tanulmányozható. Az egyik legelterjedtebb a xantin oxidáz enzim (Sigma) által *in situ* termelt O₂•⁻ és nitro-tetrazolium-klorid (NBT-nitroblue tetrazolium, Sigma) közötti reakció nyomon követése. Az aktívnek bizonyuló fémkomplex csökkenti a szuperoxid koncentrációját, ezzel inhibálja az NBT redukcióját, ami a keletkező lila színű diformazánra jellemző 560 nm-nél mért abszorbancia csökkenését eredményezi a fémkomplexet nem tartalmazó rendszerben mérhetőhöz képest. A modellreakció általános bemutatása az **5.10.2. ábrán** látható.



5.10.2. ábra: A SOD aktivitás méréséhez használt modellreakció sematikus bemutatása

A SOD aktivitás mérése során foszfátpufferben (Na₂HPO₄ és NaH₂PO₄, $c = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$ – Reanal) oldott, $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú NBT oldatot használtunk, a xantin koncentrációja $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ volt. A xantin oxidáz mennyiségét úgy állítottuk be, hogy az abszorbancia változás 560 nm-nél $0,025 - 0,028 \text{ min}^{-1}$ érték között változzon. Az NBT redukcióját változó koncentrációjú réz(II)komplex jelenlétében illetve annak távollétében is vizsgáltuk, $[\text{Cu}^{\text{II}}]_{\text{teljes}} = 0 - 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ között változott.

A SOD aktivitással rendelkező vegyületek aktivitását az IC₅₀ értékkel szokás jellemezni. Ez azt a komplexkoncentrációt jelöli, amelynél a diformazán képződése az enzimutázó vegyület távollétében mért értékhez képest, a felére csökken. Gyakorlatilag ez azt jelenti, hogy adott pH értékeknél, ábrázoljuk a $c_{\text{Cu}^{2+}}$ vs. % inhibíció görbét, és az 50%-os értékhez tartozó komplexkoncentrációt határozzuk meg. A % inhibíció definíció szerint:

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

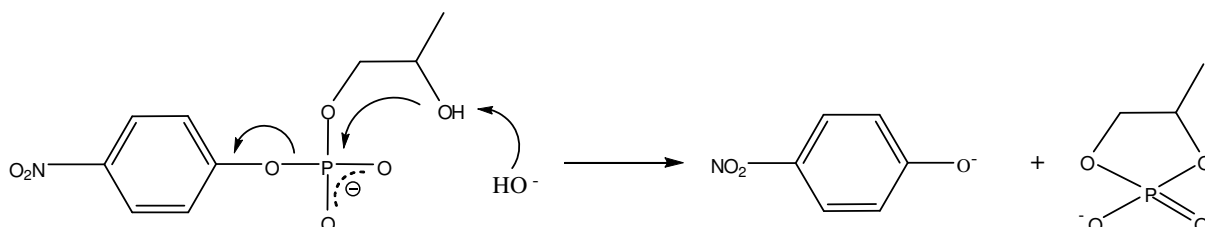
5.11. Hidrolitikus aktivitás vizsgálatok

5.11.1. Aktivált foszfátészter hidrolízise

A peptidkomplexek katalitikus aktivitását a foszfátészter kötés hidrolízisében kifejtett hatása révén is vizsgáltuk. Az RNS modellezésére gyakran használt vegyületet, a 2-hidroxipropil-4-nitrofenil-foszfát (**hpnp**) szubsztrátot alkalmaztuk vizsgálatainkhoz. Ezen modellszubsztrát aktivált foszfátészter kötet tartalmaz, mivel a hidrolízis folyamán keletkező *p*-nitrofenolátion jó távozó csoport, *pK*-ja 6,98,

ami ~7 nagyságrenddel kisebb, mint a biológiai foszfátészter hidrolízise során keletkező alkoholát hidroxilcsoportjának pK értéke.

Az RNS hidrolízise két lépésben történik meg. A mechanizmus első lépésében egy hidroxidion a 2-hidroxi-propilcsoportot aktiválja, amit a foszforatomon végrehajtott nukleofil támadás követ. Ennek eredményeként egy ciklikus foszfátészter képződik, miközben egy nitrofenolátion távozik, amint ezt az **5.11.1. ábra** is szemlélteti. Ez az első lépés modellezhető a fent említett hpnp szubsztráttal. A második lépés a képződő ciklikus foszfodiészter egyik P-O kötésének felhasadása.



5.11.1. ábra: A 2-hidroxi-propil-4-nitrofenil-foszfát (hpnp) hidroxidion által katalizált hidrolízisének mechanizmusa

A folyamatot spektrofotometriásan követtük 400 nm-es hullámhossznál a távozó 4-nitrofenolátion abszorpciójának növekedését ($\epsilon_{400} = 18900 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$) mérve. A kinetikai mérések során (i) pH, (ii) komplexkoncentráció és (iii) ligandum:fémion arány-függést vizsgáltunk. A mérésekhez használt rendszerek pH-jának állandó értéken tartásához egyenként $0,015 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú MES, HEPES és CHES biológiai pufferek vizes oldatait használtuk, így minden esetben azonos bruttó pufferösszetételt és megfelelő pufferkapacitást biztosítottunk. Az elektród kalibrálását 4,0; 7,0 és 10,0 pH-jú standard pufferekkel (Sigma) végeztük. Az ionerősséget NaCl-dal állítottuk be $0,1 \text{ mol/dm}^3$ értékre, a 298 K hőmérsékletet termosztálással biztosítottuk.

A pszeudo-elsőrendű sebességi állandó meghatározásához a kezdeti sebességek módszerét használtuk, ahol a reaktánsok átalakulásának mértéke nem haladta meg a 4%-ot, így a görbe észrevehető

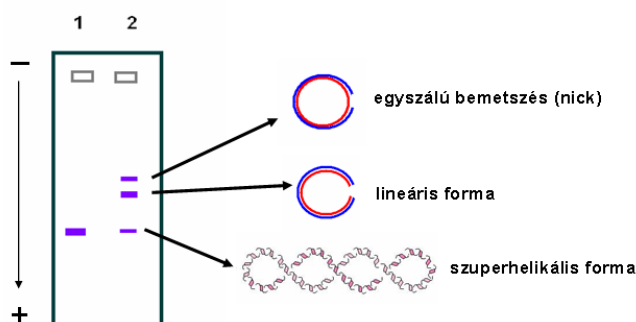
elhajlása még nem következett be. A számoláshoz használt egyenlet: $k_{obs} = \frac{\Delta A / \Delta t}{l \cdot \epsilon_{termék} \cdot c_{0, hpnp}}$. Minden

vizsgált pH-n a szubsztrát autohidrolízisének mértékét is figyelembe vettük, amennyiben az nem volt elhanyagolhatóan kicsi a katalizált reakcióhoz képest. A méréssorozatban a megfelelő pH-ra beállított, $c = 1,05 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, 1:1 arányú réz(II):Ac-HPHH-NH₂, illetve $c = 0,96 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, 1:1 arányú cink(II):Ac-KHPHPHQ-NH₂ 0,9 ml oldatát 45 μl , illetve 35 μl , $c = 0,020 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú hpnp oldattal kevertük össze gyorsan és hatékonyan, és spektrofotométer segítségével azonnal követtük az abszorbancia növekedését 400 nm-en. A másodrendű sebességi állandó meghatározásához az elsőrendű sebességi állandók értékét ábrázoltuk az aktív komplex részecskeeloszlási diagramból kiszámítható koncentrációjának függvényében.

5.11.2. DNS hidrolízisének vizsgálata

Mivel munkánk egyik célja nukleáz-enzimek funkcionális modelljeinek kialakítása volt, ezért vizsgáltuk, hogy a fémkomplexeink képesek-e elősegíteni a DNS, mint természetes makromolekuláris szubsztát hidrolízisét. Ennek legegyszerűbb módja a cirkuláris DNS átalakulásainak a követése agaróz gélelektroforézis segítségével, azaz a különböző DNS fragmensek méret szerinti szétválasztása. A módszer azon alapul, hogy semleges közegben a DNS molekula negatívan töltött, ezért a gélen átvezetett egyenáram hatására a pozitív pólus felé vándorol. A viszonylag nagy molekulaméretük miatt általában a nagyobb pórusméretet biztosító, különböző koncentrációjú agarózgél használata az elterjedt. A plazmid méretű DNS molekulák elválasztására általában az 1%-os gél nyújt lehetőséget megfelelő elválasztásra.

A cirkuláris DNS alapállapotban kompakt, úgynevezett szuperhelikális (I-es forma) szerkezetet vesz fel. Amikor ezt a DNS-t olyan komplexszel inkubáljuk, amely a megfelelő körülmények (pH, T, I) között hidrolitikus aktivitást fejt ki, de csak a kettős szál egyikén képes egyszálú bemetszéseket (nick) létrehozni, a szuperhelikális forma kitekeredik, és a DNS nyílt cirkuláris (II-es forma) formát vesz fel. Amennyiben a komplex kétszálú hasításra képes, vagy véletlenszerű bemetszések a két szálon egymáshoz kellő közelségben történnek meg, akkor kialakulhat a DNS nyíltláncú formája (lineáris vagy III-as forma) is (**5.11.2.ábra**). A DNS felsorolt formáinak bár a bázispárok számát tekintve mérete azonos, de az alakváltozás miatt agarózgélben történő elektroforézis során a vándorlási sebességük mégis más-más lesz. A nyílt cirkuláris DNS lassabban vándorol a gélben, mint a tömörebb szuperhelikális DNS molekulák. A lineáris forma, a körülményektől függően az I-es forma előtt vagy mögött fut, esetünkben a vizsgált rendszerekben az I-es és a III-as forma között vándorolt a gélben. A három forma relatív mobilitása függ az agarózgél koncentrációjától, az alkalmazott áramerősségtől, a futtatáshoz használt puffer ionerősségétől és a szuperhelikális forma másodlagos szerkezetétől.



5.11.2. ábra: A cirkuláris DNS különböző formáinak követése agaróz gélelektroforézis segítségével: az 1-es zsebben egy natív szuperhelikális DNS sematikus ábrázolása látható, a 2-es zsebben a hidrolízis eredményeként megjelenő nyílt cirkuláris (nick vagy II-es forma) és a lineáris DNS (III-as forma) is látható

A kísérlet-sorozatainkban az MTA-SZBK Biokémiai Intézetben előállított és Sigma MIDI Kit (GenElute HP Plasmid Miniprep Kit) segítségével megtisztított pUC18 DNS-t használtunk. Az agarózgélbe (SeaKem) minden esetben olyan „mintakoktélt” pipettáztunk, amely 1 – 4 µl DNS-t, 2 – 8

μl komplexet ($c = 2,0 \times 10^{-4} - 3,0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) és 4 – 14 μl 0,05 – 0,1 mol/dm^3 puffert (MES, HEPES, TRIS, CHES) tartalmazott a megfelelő pH beállításának érdekében pH 6 – 8,5 között, a végső térfogat 21 – 25 μl volt. A reakcióelegyet 37°C hőmérsékleten inkubáltuk, 1 – 20 órán át. A futtatáshoz 3 μl brómfenolkék mintafelvívő festéket (0,1% brómfenolkék, 0,2 mol/dm^3 EDTA, 50% glicerin) használtunk minden minta esetében, mely TBE pufferben (0,05 mol/dm^3 TRIS, 0,05 mol/dm^3 bórsav, 0,001 mol/dm^3 EDTA, pH = 8,0) történt, 3 – 4 órán át, 80 V feszültséget használva. A futtatást követően a gélt 20 – 30 percen keresztül etídium-bromid oldatban áztattuk (Sigma), amelynek az oldatbeli végső koncentrációja 0,5 $\mu\text{g/ml}$ volt. A DNS molekulához kötődő reagens UV-fény hatására fluoreszkál, így a DNS sávok láthatóvá tehetők.

6. Kísérleti eredmények és értékelésük

6.1. A *HisGlyGly*, *GlyHisGly*, *GlyGlyHis*, *HisAlaAla*, *AlaHisAla*, *AlaAlaHis*, *Ac-HisGlyGly-NH₂* tripeptidek réz(II)komplexeinek CD spektroszkópiai vizsgálata

Az eddigi ismereteink alapján bizton állíthatjuk, hogy réz(II)-peptidkomplexek oldatkémiai viselkedésének tanulmányozása során a pH-potenciometriás, UV/látható elnyelési, CD és az ESR spektroszkópiás adatok együttes kiértékelése vezethet kielégítő eredményre. Az elmúlt évtizedekben megjelent közlemények, bár részletesen tárgyalják a kistagszámú peptidek réz(II)komplexeinek oldatkémiai viselkedését, az eredmények nem teljesen egybehangzóak. A komplex stabilitási állandók értéke függ a számolások során figyelembe vett részecskemátrixtól, és több esetben a koordináció módja sem egyértelmű. Munkánk során, az irodalmi adatok alapján viszonylag egyszerűnek ítélt rendszerek CD spektroszkópiás vizsgálatával próbáltunk segítséget kapni a bonyolultabb szerkezetekkel összefüggő spektrumok megértéséhez. Az e célból vizsgált peptidek a következők voltak: Xaa-Xaa-His, Xaa-His-Xaa és His-Xaa-Xaa (ahol Xaa = Gly vagy Ala), valamint az N-Ac-His-Gly-Gly-NH₂. Ezen peptidek réz(II)komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálatára is szükségünk volt, mert az irodalomban fellelhető adatok nem voltak egységesek és teljeseek adott körülményekre vonatkozóan. A CD spektroszkópiás mérések kiértékeléséhez az aktuálisan mért rendszerek pontos ismeretére volt szükségünk, hogy az egyedi CD spektrumok kiszámításával hozzárendelhesük a CD hozzájárulásokat az egyes koordinációs módokhoz.

A ligandumok protonálódási állandóit – a védett származék kivételével tanszékünkön már előbb meghatározták. A **6.1.1. táblázat**ban látható értékek jó egyezést mutatnak a megfelelő irodalmi adatokkal (az AAH és HAA tripeptidek esetében nem állt rendelkezésünkre irodalmi adat). Az ligandumok pK értékeinek függése az ionerősségtől és a hőmérséklettől jól tükröződik azokból az adatokból is, ahol a hőmérséklet magasabb volt, 310 K [56], vagy az ionerősség $I = 3 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaClO}_4$ [117] volt. Az adatokból az is látszik, hogy az Ala beépítése a peptidszekvenciába nem változtatja meg lényegesen a ligandum donoratomjainak bázikusságát. Mindezek szintén alátámasztják, hogy bár egy adott szerkezethez rendelhető spektrális sajátságok állandóak, ahhoz, hogy a fémkomplexekre meghatározható egyedi moláris spektrumok korrektek legyenek, a komplexképződés tanulmányozása során a pH-metriás és spektroszkópiás mérésekhez azonos körülményeket kell biztosítanunk.

A réz(II)komplexek vizsgálata azt mutatta, hogy a peptidek többnyire egy ekvivalens réz(II)ion megkötésére képesek, vagyis az esetek többségében különböző protonáltsági állapotú 1:1 = fém:ligandum arányú komplexek képződnek. Kivételt ez alól a His-Xaa-Xaa peptid mutatott, ahol *biszkomplexek* alakultak ki ligandumfelesleg jelenlétében.

6.1.1. táblázat: A tripeptidekre vonatkozó $pK_{H_rL_q}^d$ bruttó protonálódási állandók logaritmusainak értékei ($I = 0,1$ mol/dm³, NaClO₄; $T = 298$ K) az irodalomban megtalálható adatokkal együtt (zárójelben adtuk meg a bruttó stabilitási állandók logaritmus értékeit - $\log \beta_{H_rL_q}$)

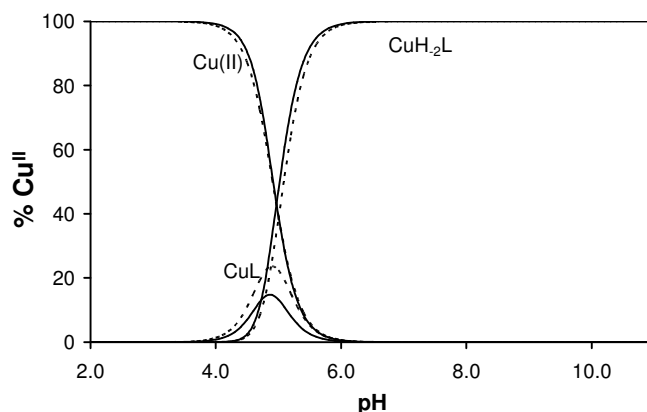
L	q	r	^a $pK_{H_rL_q}^d$ ($\log \beta_{H_rL_q}$)										
X =			^b Gly	^b Ala	^c Gly	^d Gly	^e Gly	^f Gly	^g Gly	^h Gly	ⁱ Gly	^j Gly	^k Ala
XXH	1	1	7,94 (7,94)	8,04 (8,04)	7,54	8,04	8,14	8,23		7,96	8,06		
	1	2	6,82 (14,76)	6,85 (14,89)	6,64	6,74	6,92	6,99		6,64	6,82		
	1	3	2,68 (17,44)	2,80 (17,69)	2,77	2,72	2,83	2,84		2,92	2,80		
XHX	1	1	7,98 (7,98)	7,93 (7,93)	8,00			8,17	8,00	7,98		8,02	7,93
	1	2	6,52 (14,50)	6,61 (14,54)	6,65			6,63	6,50	6,35		6,53	6,62
	1	3	3,11 (17,61)	3,03 (17,57)	3,10			3,19	3,08	2,72		3,12	2,99
HXX	1	1	7,32 (7,32)	7,44 (7,44)	6,43			7,62					
	1	2	5,45 (12,77)	5,58 (13,02)	4,81			5,52					
	1	3	3,09 (15,86)	3,28 (16,30)	3,06			3,17					
Ac-HXX-NH ₂	1	1	6,45										

^a $K_{H_rL_q}^d$ az $H_rL_q^{(r-1)+} \rightleftharpoons H_{r-1}L_q^{(r-2)+} + H^+$ egyensúlyi folyamatra vonatkozóan. ^bSaját mérés (a $\log \beta_{H_rL_q}$ értékek hibája $\pm 0,02$). ^c $I = 0,2$ mol/dm³, KNO₃; $T = 298$ K [64]. ^d $I = 0,15$ mol/dm³, NaCl; $T = 298$ K [118]. ^e $I = 0,15$ mol/dm³, NaCl; $T = 298$ K [119]. ^f $I = ?$; $T = 294$ K [55]. ^g $I = 0,1$ mol/dm³, KNO₃; $T = 298$ K [69]. ^h $I = 0,2$ mol/dm³, KCl; $T = 298$ K [68]. ⁱ $I = 0,1$ mol/dm³, NaNO₃; $T = 298$ K [120]. ^j $I = 0,1$ mol/dm³, KCl; $T = 298$ K [121]. ^k $I = 0,1$ mol/dm³ KNO₃; $T = 298$ K [48].

6.1.1 Réz(II)- Xaa-Xaa-His komplexek

A spektrális adatok értelmezéséhez először a részecskemátrixot, illetve a stabilitási állandókat kellett meghatároznunk. Az irodalomból ismert, hogy az Xaa-Xaa-His tripeptidek vizes oldataiban réz(II)ionokkal, fiziológiás pH-n, az igen nagy stabilitású $[CuH_2L]^-$ részecske dominál. Ebben a komplexben a réz(II)ion körüli ekvatoriális síkban a terminális amin-, az imidazol-, és két deprotonált amid-nitrogén helyezkedik el. Ezt a mi eredményeink is alátámasztják. Mind a Gly, mind az Ala peptideknél a komplexképződés pH 4,5 környékén kezdődik, és a fémion indukálta deprotonálódás során négy ekvivalens hidroxidion többlet fogy pH 5,5-ig a szabad ligandumhoz képest, ami a deprotonálódási folyamatok erős kooperatív jellegére utal. A ligandum oldatában fémion távollétében

pH 5,5 környékén az $[LH_2]^+$ részecske dominál – így a képződő komplex a $[CuH_2L]^-$ képlettel jellemezhető. Ugyanezen a pH-n, a négy donoratom származhatna akár két ligandum amino- és imidazol-nitrogénjének deprotonálódásából is, de mivel a ligandumfelesleget tartalmazó oldat hasonló módon viselkedik az 1:1 fém:ligandum mólarányú rendszerhez, ezért valószínűsíthető két amid-nitrogén deprotonálódása és koordinációja, a *biszkomplex* képződése helyett. A pH növelése során pH 11-ig további többlet lúgfogyást nem tapasztaltunk, vagyis megállapíthatjuk, hogy itt is a $[CuH_2L]^-$ részecske van jelen az oldatban (**6.1.1. ábra**).



6.1.1. ábra: A réz(II)- Xaa-Xaa-His tripeptid rendszerek részecskeeloszlási diagramja. $Cu:L = 1:1$, $c_{Cu^{2+}} = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $I=0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaClO}_4$; $T=298 \text{ K}$. A telvonal az Xaa = Gly, míg a szaggatott vonal az Xaa = Ala esetre vonatkozik

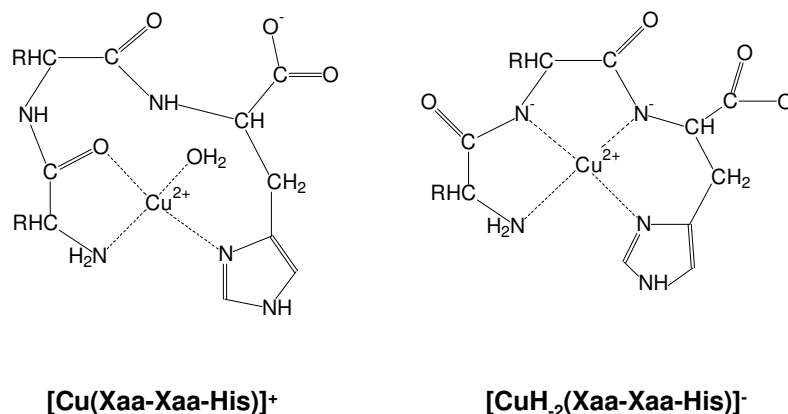
Az irodalom áttekintése után sem tisztázott viszont, hogy az oldatban várható-e $[CuHL]^{2+}$, $[CuL]^+$ vagy CuH_2L^0 képződése. Ennek eldöntésére elvégeztük az UV/látható és CD mérési adatok mátrix-rang analízisét [122]. Míg a spektrofotometriás adatok egy további részecske jelenlétére utaltak, addig a CD mérések nem támasztják alá a felsorolt komplexek jelenlétét az oldatban, sem a Gly, sem az Ala peptidek esetében. A $[CuHL]^{2+}$ és a $[CuL]^+$ részecskék esetében, az egy nitrogén, illetve két nitrogén donoratom makrokelát-szerű koordinációja nem jár jelentős CD effektus létrejöttével. Ezzel szemben, a $[CuH_2L]^0$ részecske képződése során legalább egy deprotonált amid-nitrogén lép be a koordinációs szférába, aminek következtében egy öt-, vagy hattagú kelátgyűrű alakul ki. Az Ala-Ala-His ligandum komplexénél ez utóbbi esetben jól detektálható CD jelet kellett volna kapnunk. Mivel ezt nem tapasztaltuk, arra következtettünk, hogy a minor részecske $[CuHL]^{2+}$ (1N donoratommal) vagy $[CuL]^+$ (NH_2 és ImN) lehet. A spektrofotometriás adatok a nagyobb stabilitású két nitrogén donoratomot tartalmazó makrokelát komplex jelenlétét valószínűsítik. Az irodalomban több esetben feltételezték makrokelátgyűrűk kialakulását a terminális amino-nitrogén és az imidazol-nitrogén együttes koordinációjával (a His az $n>3$ helyzetben található az N-terminális részhez viszonyítva) [79,123].

A rendelkezésünkre álló kísérleti adatokból a fentiek alapján kiszámoltuk a komplexek stabilitási állandóját, és az egyes részecskékhez tartozó moláris UV/látható, illetve CD spektrumokat (**6.1.2.táblázat**).

6.1.2. táblázat: A stabilitási állandók ($\log \beta_{M_p H_r L_q}$) értékei, valamint a hullámhossz és a moláris abszorbancia illetve $\Delta \epsilon$ értékei az $\text{rész(II)-tripeptid}$ komplexek egyedi moláris spektrumainak szélső értékeinél ($I = 0,1 \text{ mol/dm}^3$, NaClO_4 ; $T = 298 \text{ K}$)

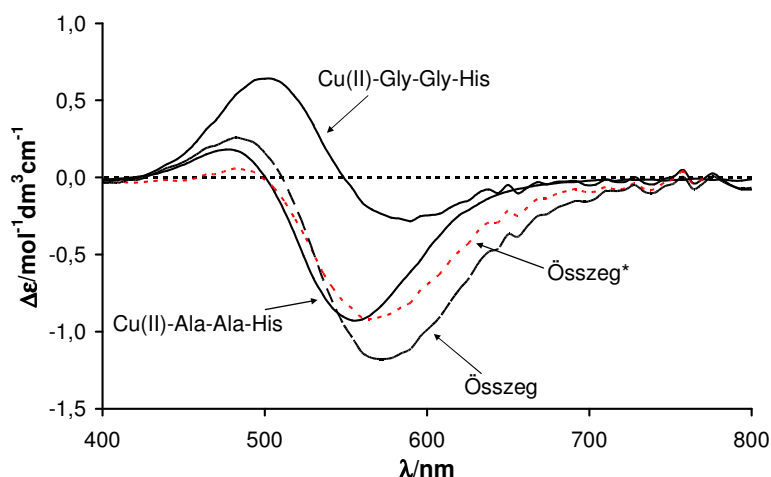
L	p	r	q	$\log \beta_{M_p H_r L_q}$	$\lambda_{\max}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\max}/\text{nm}$ ($\Delta \epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
Gly-Gly-His	1	0	1	7,70(2)	680 (35)	-
	1	-2	1	-1,75(1)	525 (100)	500 (+0,64) 590 (-0,28)
Ala-Ala-His	1	0	1	8,06(2)	680 (39)	-
	1	-2	1	-1,71(1)	522 (101)	476 (+0,18) 554 (-0,93)
Gly-His-Gly	1	0	1	9,59(2)	622 (54)	-
	1	-1	1	5,70(1)	610 (57)	596 (+0,42)
	1	-2	1	-3,90(2)	574 (58)	566 (-) 662 (+)
	4	-8	4	-7,08(8)	568 (-)	554 (+2,21) 464 (-0,47) 662 (-0,17)
Ala-His-Ala	1	0	1	9,90(2)	616 (47)	-
	1	-1	1	5,89(1)	604 (59)	608 (+0,39) 506 (-0,09)
	1	-2	1	-3,71(2)	574 (59)	560 (+0,32) 470 (-0,13)
	4	-8	4	-6,16(9)	562 (-)	554 (+1,92) 464 (-0,45)
His-Gly-Gly	1	0	1	8,46(2)	694 (34)	746 (+0,11)
	2	-2	2	7,24(1)	610 (167)	584 (+1,21) 710 (-0,15)
	1	-2	1	-6,85(1)	556 (152)	578 (+0,52) 782 (-0,03)
	1	0	2	14,66(1)	664 (97)	692 (+0,95)
His-Ala-Ala	1	0	1	8,57(2)	694 (34)	752 (+0,09)
	2	-2	2	7,09(1)	610 (175)	566 (+0,19) 674 (-0,93)
	1	-2	1	-6,37(1)	550 (166)	554 (-0,88)
	1	0	2	15,00(1)	652 (96)	692 (+1,06)
Ac-His-Gly-Gly-NH ₂	1	0	1	3,75(1)	756 (23)	-
	1	-1	1	-2,96(3)	652 (45)	582 (-0,04)
	1	-2	1	-9,49(1)	611 (75)	600 (+0,17) 720 (-0,25)
	1	-3	1	-19,22(2)	524 (88)	480 (+0,05) 570 (-0,20)
	1	-4	1	-30,64(8)	518(151)	486 (-0,83) 570 (+1,64)

A Gly, illetve az Ala aminosavakat tartalmazó megfelelő peptidek komplexstabilitási állandóinak és elnyelési színeképeinek hasonlósága arra enged következtetni, hogy a donoratomok elrendeződése a rész(II)ion körül ugyanaz mindkét típus esetén (a **6.1.2. táblázat** a teljes tripeptid ligandumsorra vonatkozó adatokat tartalmazza, ezért már itt megtehetjük ezt a megállapítást). A képződő komplexekre javasolt oldatbeli szerkezeteket a **6.1.2. ábra** mutatja.



6.1.2. ábra: A réz(II)-Xaa-Xaa-His rendszerben (Xaa = Gly vagy Ala) keletkező részecskék ($[CuL]^+$ és $[CuH_2L]^-$) koordinációs módjának sematikus ábrázolása

Ugyanakkor viszont az Xaa-Xaa-His peptidek megfelelő $[CuH_2L]^-$ komplexeire a számított egyedi CD spektrumok jelentősen különböznek egymástól. Amíg a réz(II)-Gly-Gly-His komplexek esetén a His oldallánci imidazol-nitrogén koordinációja miatt kialakult pozitív Cotton effektus dominál, addig a réz(II)-Ala-Ala-His komplexek esetében a negatív Cotton effektus jóval nagyobb súllyal jelentkezik a torzult CD couplet-szerű spektrumokban (**6.1.3.ábra**). A koordinálódó oldalláncot nem tartalmazó Gly illetve Ala tripeptidkomplexek esetében mind a $[CuH_2L]^-$, mind a $[CuH_2L]^-$ részecskék spektruma egyszerű negatív Cotton-effektussal jellemezhető, melynek intenzitása az alanin egységek szekvenciában elfoglalt helyétől és számától függ.



6.1.3. ábra: A réz(II)-Xaa-Xaa-His (Xaa = Gly vagy Ala) komplexek esetén a $[CuH_2L]^-$ részecske CD spektruma (az "Összeg" az Ala-Gly-Gly, Gly-Ala-Gly és a Gly-Gly-His komplexek spektrumainak összege, míg a csillaggal jelölt esetben az elnyelési spektrumok λ_{max} és ϵ értékei alapján korrigált Ala-Gly-Gly és Gly-Ala-Gly CuH_2L spektrumokat adtuk a Gly-Gly-His megfelelő komplexének spektrumához)

Az egy alanint tartalmazó tripeptidek közül legnagyobb intenzitás a Gly-Ala-Gly tripeptid komplexeiben mérhető. Az alanin aminosavat tartalmazó kelátgyűrűk hozzájárulása az optikai aktivitáshoz a komplex $d-d$ sávjainak hullámhossz tartományában additívnak bizonyult [124]. Ezek alapján az a következtetés vonható le, hogy a Gly-Gly-His rézkomplexében a C-terminális királis

aminosavat tartalmazó kelátgyűrű amid-nitrogénje révén közvetített negatív, és az oldallánc koordinációja révén létrejött pozitív Cotton effektusok adódnak össze. Ugyanakkor az Ala-Ala-His rézkomplexében a három királis ötagú kelátgyűrű (nem egyforma mértékű) negatív hozzájárulása sokkal inkább képes az oldallánc pozitív hatását túlkompenzálni. A spektrumon még így is jól látható a pozitív hozzájárulás az Ala-Ala-Ala $[\text{CuH}_2\text{L}]^-$ komplexéhez ($\Delta\epsilon_{\text{min}, 560 \text{ nm}} = -1,36 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$) viszonyítva.

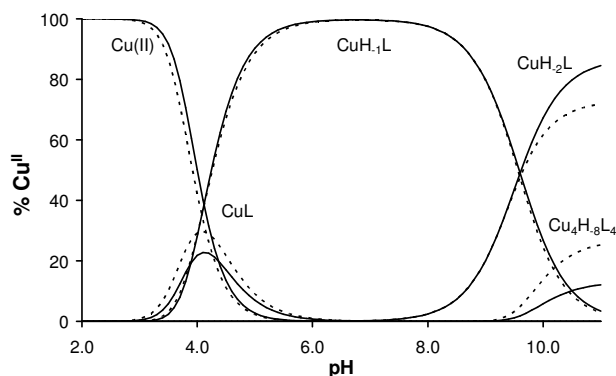
Amennyiben a hisztidintartalmú peptidek komplexeire is érvényes az additivitás, várható, hogy az Ala-Ala-His komplex spektruma jó közelítéssel előállítható az Ala-Gly-Gly, Gly-Ala-Gly és a Gly-Gly-His komplexek spektrumainak összegéből. Amint azt a **6.1.3. ábra** mutatja, alapvetően a spektrum jellemzői jól visszakaphatók ily módon. A kísérleti és a fenti módon számolt görbék közötti különbség valószínűleg azzal magyarázható, hogy a hisztidint tartalmazó és az Ala/Gly peptidek komplexeiben a donortomok minősége és elrendeződése nem teljesen egyezik, amit az elnyelési spektrumok is jól tükröznek. Megpróbáltuk az összegzés során az Ala-Gly-Gly és Gly-Ala-Gly CuH_2L komplexek CD spektrumait az ezen és a Gly-Gly-His komplex elnyelési spektrumaiból meghatározott $\Delta\lambda_{\text{max}}$ értékével korrigálni, valamint ϵ_{max} értékek arányaival súlyozni. Az így kapott összeg, amint az a **6.1.3. ábrán** látható, valamivel jobban közelíti a kísérleti spektrumot. Ezen összehasonlítások során mindvégig tisztában kell lennünk azzal, hogy az általunk alkalmazott empirikus eljárás még akkor sem kvantitatív, ha a komplexek szerkezete azonos. Ugyanakkor jelenleg nem áll rendelkezésünkre olyan módszer, amivel egy fémkomplex spektrumát a fentiekhez hasonlóan jól le lehet írni. Az elméleti kémiai számítások ma még a kiralitás szempontjából abban az állapotban vannak, hogy jó eredménynek számít, ha egy egyszerű királis szerves molekula CD spektrumának az előjelét a hullámhossz jó közelítésével meg tudjuk mondani. Az összetettebb rendszerek spektrális paramétereinek elméleti megközelítésére pedig még sokáig kell várunk, ami a kísérleti méréseket és ezek empirikus értelmezésének jelentőségét ma még mindenképpen indokolja.

6.1.2. Réz(II)-Xaa-His-Xaa komplexek

A réz(II)-Xaa-His-Xaa rendszerekben már pH 3,5 környékén elkezdődik a fémion által indukált deprotonálódás, melynek eredményeként pH 5 körül már egy réz(II)ionra három ekvivalens hidroxidion fogy többletként a szabad ligandum titrálási görbéjéhez viszonyítva, a fémion és a ligandum kiindulási koncentráció-arányától függetlenül. A deprotonálódások kooperatív módon játszódnak le. pH ~ 5-nél a ligandum $[\text{LH}_2]^+$ formája dominál, ami stabilis, $[\text{CuH}_1\text{L}]^0$ komplex kialakulására utal a terminális amino-nitrogén, az imidazol-nitrogén és egy deprotonálódott amid-nitrogén koordinációjával a réz(II)ion körüli ekvatoriális síkban. A fémion körüli negyedik ekvatoriális koordinációs helyen egy vízmolekula található.

További deprotonálódási folyamat csak pH 8,5 fölött jelentkezik, a $[\text{CuH}_2\text{L}]^-$ részecske képződése során. Ebben a komplexben egy hidroxidion, vagy más deprotonálódott donorcsoport koordinálódhat a réz(II)ion körüli ekvatoriális sík negyedik pozíciójában. Esetleg a koordinációs szféra

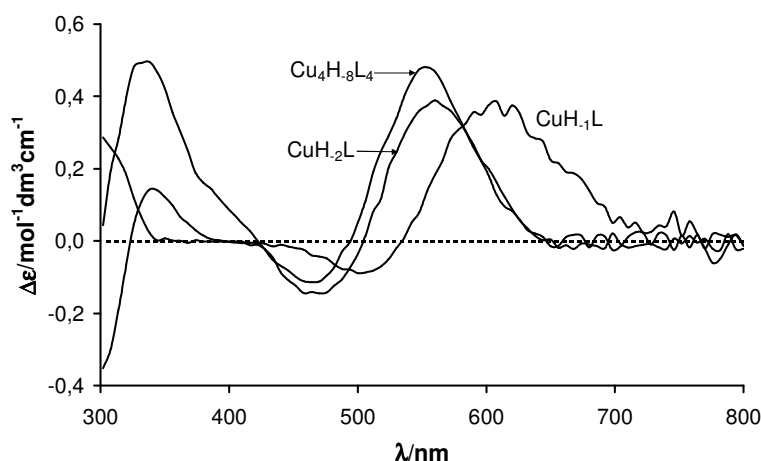
átrendeződésével triglicintípusú komplex is kialakulhat. Lehetőség van még a koordinálódott imidazolgyűrű második nitrogénjének deprotonálódására, aminek következtében oligomerizáció játszódhat le $(\text{CuH}_2\text{L})_n$ komplexet eredményezve. Az imidazoláto-hidas $\text{Cu}_4\text{H}_8\text{L}_4$ tetramer képződésére több példát is találunk az irodalomban a His-2 oligopeptidek esetében [69,125]. Kis réz(II)ion koncentráció mellett (10^{-3} mol/dm^3 vagy ez alatt) az oligomerizáció nem jelentős mértékű, amint ezt az eloszlási diagramok is mutatják (6.1.4. ábra).



6.1.4. ábra: A réz(II)- Xaa-His-Xaa tripeptid rendszerek részecskeeloszlási diagramjai. $\text{Cu:L} = 1:1$, $c_{\text{Cu}^{2+}} = 0,0008 \text{ mol/dm}^3$, $I=0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaClO}_4$; $T=298 \text{ K}$. A teltvonal az Xaa = Gly, míg a szaggatott vonal az Xaa = Ala esetre vonatkozik

A fémion koncentrációjának növelése azonban jelentősen befolyásolta az oldat spektrális viselkedését. A tetramer képződése miatt a monomer komplexhez viszonyított legnagyobb eltérés a CD spektrumok UV tartományában figyelhető meg az ott megjelenő töltésátviteli átmenetek következtében (6.1.5. ábra). Ezért a rendszerek pontos leírása érdekében szükséges ennek a részecskének a figyelembe vétele is.

A fentiek alapján mind a $[\text{CuH}_1\text{L}]^0$, mind a $(\text{CuH}_2\text{L})_n$ ($n = 1,4$) részecskékben a fémionhoz egy deprotonálódott amid-nitrogén koordinálódik. Ez az eddigiekben jelentős eltérést okozott a Gly és az Ala-tartalmú komplexek CD spektumában. Jelen vizsgálatok azonban azt az érdekes eredményt mutatták, hogy a réz(II)-Gly-His-Gly és réz(II)-Ala-His-Ala komplexek spektrumai között csak csekély különbség van (6.1.2. táblázat). Ez valószínűleg az N-terminális kelátgyűrű optikai aktivitáshoz való kis hozzájárulásával magyarázható, amint az a nem koordinálódó oldalláncot tartalmazó Gly/Ala tripeptidek esetében is megfigyelhető volt [124]. Tehát a fő királis hozzájárulást ezekben a komplexekben az imidazol-nitrogént tartalmazó kelátgyűrű okozza, ami a pozitív Cotton-effektus dominanciáját eredményezi (6.1.5. ábra). Ugyanakkor a fentiek alapján az is elmondható, hogy a molekula C-terminális vége nem vesz részt a fémion megkötésében. Ez egyben a triglicintípusú komplex kialakulását is kizárja.



6.1.5. ábra: A réz(II)-Ala-His-Ala komplexek egyedi moláris CD spektrumai. A tetramer részecske egyedi spektrumához tartozó intenzitásokat négygel osztottuk, az összehasonlíthatóság érdekében

A $[\text{CuH}_2\text{L}]^-$ részecske képződése során a CD spektrum alakja nem változik lényegesen a $d-d$ átmenetek tartományában, ami arra utal, hogy a képződő komplexben a királis hozzájárulások ugyanazok, mint a $[\text{CuH}_1\text{L}]^0$ részecskében. A λ_{max} értékének kismértékű csökkenése alapján a komplex szerkezetében bekövetkező változás legvalószínűbb útja egy koordinálódott vízmolekula deprotonálódása. A tetramer komplex képződése során is hasonló spektrális viselkedést látunk, de a λ_{max} további csökkenése és a pozitív effektus növekedése a N donatoratomok számának növekedését mutatja a réz(II)ion körüli koordinációs térben. A hídligandumként kapcsolódó imidazolát a második fémion szempontjából egyfogúnak tekinthető, s mint ilyen a királis hozzájárulása csekély.

Érdekes még megfigyelni, hogy a CD spektrumok maximumához rendelhető $\Delta\epsilon$ értékek a réz(II)-Xaa-Xaa-His rendszerekben képződő $[\text{CuH}_2\text{L}]^-$ komplexek közül a glicintartalmú peptidkomplexére emlékeztetnek, ami alátámasztja az N-terminális kelátgyűrű kis királis hozzájárulásáról a fentiekben mondottakat. Ugyanakkor a torzult couplet-szerű spektrumokban a csúcsok előjelei fordítottan alakulnak az ott megfigyelttekhez képest. Ennek oka egyelőre nem ismert.

6.1.3. Réz(II)-His-Xaa-Xaa komplexek

A His-Xaa-Xaa réz(II)komplexeiről, vagyis ahol a peptid N-terminális végén található a hisztidin, kevesebb irodalmi adat állt rendelkezésünkre. Ezek alapján, savas illetve semleges közegben $\{\text{NH}_2, \text{ImN}\}$ típusú koordinációt valószínűsítünk, a *mono*-, és *bisz*komplexeik esetén. Lúgos közegben viszont a koordinációs szféra átrendeződését javasolják, aminek következtében triglicintípusú komplex képződik [1,2,46,53,57].

A His-Xaa-Xaa réz(II)-rendszereket vizsgálva megállapítottuk, hogy az irodalmi adatokkal jó egyezésben, a komplexképződés jelentősen függ a fémion:ligandum kiindulási koncentrációránytól. Első lépésben pH ~ 4-ig kialakul a $[\text{CuL}]^+$ törzskomplex, majd ligandumfelesleg jelenlétében a lépcsőzetes képződés során a $[\text{CuL}_2]^0$ részecske. Az e komplexekre jellemző stabilitási állandók és spektrális adatok (**6.1.2. táblázat**) jó egyezést mutatnak a hisztamintípusú koordinációra jellemző

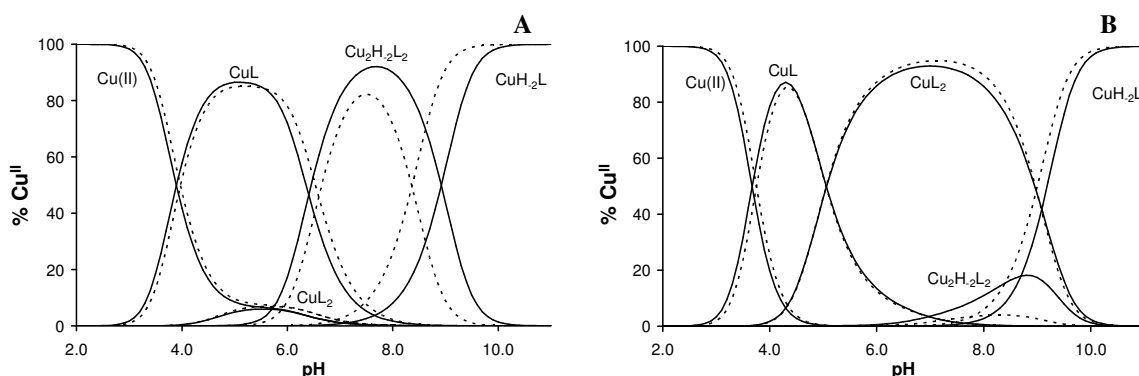
értékekkel, ami alátámasztja, hogy a ligandum az amino-, és az imidazol-nitrogénjein keresztül hattagú kelátgyűrűt képezve kapcsolódik a fémionhoz. A CD spektrumok hasonló alakja a HGG és HAA ligandumokat tartalmazó $[\text{CuL}]^+$ és $[\text{CuL}_2]^0$ komplexek esetén, szintén azt a tényt támasztja alá, hogy csak a peptid N-terminális része vesz részt a koordinációban, és így a királis alanin nem járul hozzá az optikai aktivitáshoz.

Már önmagában is érdekes tény, hogy a $[\text{CuL}_2]^0$ részecske CD spektrumának szokatlanul nagy a $\Delta\epsilon_{\text{max}}$ értéke. Továbbá az additív hozzájárulástól teljesen eltérő módon ez az intenzitás a kétszeres helyett mintegy tízszerese a CuL részecske spektrumában tapasztalhatónak. Hasonlóan nagy intenzitásra korábbi közleményekben is láthatunk példát királis ligandumok *biszhisztamintípusú* koordinációja során [126]. Ez valószínűleg a fémionhoz koordinálódó két ligandum donoratomjai egymásra hatásának az eredménye, aminek következtében valamiféle királis átrendeződés következik be, ami a *biszkomplexben* további hozzájárulást eredményez az optikai aktivitáshoz. Hogy ez mi lehet, annak felderítése érdekében sűrűségfukcionál (DFT) elméleti számításokat végeztünk a *mono-* és *biszhisztamintípusú* réz(II)-HisGly komplexekre – melyek CD spektrumai szintén hasonlóak. Az eddigi eredmények alapján valószínűsíthető, hogy az ekvatoriális síkban *cisz* helyzetben lévő két imidazol-nitrogént tartalmazó heterociklusos gyűrűk síkból való propellerszerű kifordulása eredményezi az új királis hatást. A közelmúltban megjelent röntgen-diffrakciós eredmények is alátámasztják ezt a feltevést. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a $[\text{Cu}(\text{His-Gly})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ komplexben az amino-nitrogén, réz(II)ion, imidazol-nitrogén és a szomszédos szénatom által bezárt diéderes szög 25° [127] mindkét imidazolgyűrű esetén. (A DFT számolások alapján a diéderes szög $\sim 30^\circ$ -nak bizonyult.) Arra is fel kell hívni azonban a figyelmet, hogy a monokomplexek CD spektrumainak kis intenzitására részben magyarázatot adhat az, ha koordinációs izomerek vannak jelen, ugyanis ekkor a királis hozzájárulások részben kioltathatják egymást. Izomerek jelenlétét feltételezték, például kétdimenziós ESR mérések alapján a réz(II)-His-Gly rendszer esetén: a hisztamintípusú komplex mellett, egy amino-nitrogén, egy amid-nitrogén és egy karboxil-oxigén koordinációja során kialakuló komplexet [58]. Amint a fentiekben erről már szó esett, a Gly, illetve Ala aminosavak esetén a deprotonálódott amid-nitrogént tartalmazó réz(II)-His-Xaa-Xaa komplexek CD spektrumainak jelentősen különböznie kell. Vagyis, ha egy izomer egyensúlyban ilyen komplexek jelen vannak, akkor az ezen elegyekben mért spektrumoknak szintén különböznie kellene, ami esetünkben nem figyelhető meg.

A törzskomplexek kialakulását követően a $\text{Cu:L} = 1:2$ rendszerben további deprotonálódás $\text{pH} \sim 8$ értékig nem következik be. Ezzel szemben az $1:1 = \text{fém:ligandum}$ molarány esetén, a $[\text{CuL}]^+$ komplex kialakulását követően a hidroxidion koncentrációjának növekedésével további deprotonálódási folyamat indul el már $\text{pH} 5,5$ körül. A törzskomplexekkel ellentétben, ebben a rendszerben a $\text{pH} \sim 7$ körül mért CD spektrumok jelentősen különböznek a Gly és Ala tartalmú peptidek esetén (**6.1.2. táblázat**). Ez a C-terminális rész koordinációjára utal, valószínűleg egy deprotonálódott amid-nitrogéne keresztül. Ennek következtében, az N-terminális rész valamelyik koordinálódó donoratomja (NH_2 vagy ImN), sztérikus okok miatt, ki kell lépjen az ekvatoriális síkból. Amennyiben $[\text{CuH}_1\text{L}]^0$ részecske képződését

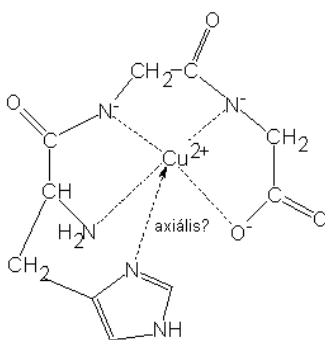
feltételezzük, amino-nitrogén vagy imidazol-nitrogén, amid-nitrogén, karbonil-oxigén és egy vízmolekula található a fémion koordinációs síkjában. Ennek ellentmond viszont az, hogy a $\lambda_{\max}$ értékek eltérnek a nem koordinálódó oldalláncokkal rendelkező tripeptidek hasonló komplexeire mértektől (660 nm), viszont hasonlóságot mutatnak a GHG és AHA ligandumok $\{3 \times N, O\}$ típusú koordinációval rendelkező $[CuH_2L]^0$ komplexeinek értékeivel. Ennek az ellentmondásnak a feloldására adhat magyarázatot a $[CuH_2L]^0$ komplex asszociációja $[Cu_2H_2L_2]^0$ dimer részecskévé. Ebben az esetben az ekvatoriális síkból kiszoruló N-terminális csoport hídképző donorként szerepelhet. Az eredményeink alapján nem tudjuk teljes bizonyossággal megállapítani, melyik donoratom vesz részt a kelátgyűrű kialakításában, és melyik a hídképző. A His-Gly hasonló pH-n képződő dimer komplexe esetén az irodalomban azt javasolják, hogy a diglicintípusú monomer egységek imidazol-nitrogénje koordinálódik a másik monomer fémionjához, vagyis a hisztidin oldallánca szerepel hídként [58,62]. Ez azonban, mint az Xaa-His-Xaa peptidek oligomer komplexeiben is megfigyelhető, nem okoz az egyfogúnak tekinthető oldallánc részéről lényeges hozzájárulást az optikai aktivitáshoz – és így nem magyarázható a His-Xaa-Xaa $[Cu_2H_2L_2]^0$ dimer részecskék CD spektrumaiban látható lényeges pozitív hatás. Ez arra utal, hogy vagy itt is új királis hatás lép fel, mint az a *bis*komplexek esetében megfigyelhető volt, vagy nem az imidazolgyűrű nitrogénje, hanem az aminocsoport szorul ki a koordinációs szférából, és képez hidat a két monomer között. Esetleges dihidroxó-, illetve bidentát imidazoláto-hidas dimerek CD spektrumait egyrészt nem befolyásolnák a C-terminális irányban lévő aminosavak (Gly/Ala) másrészt ESR csendeseek lennének. Mivel a mérések azt mutatják, hogy a CD spektrumok eltérnek, és az ESR spektrumokban a His-Xaa-Xaa (csakúgy mint a His-Gly [58]) komplexek esetében, széles szinglett jelet láthatunk, ezért ez utóbbi két lehetőséget kizárhatjuk.

A közeg további lúgosításával a ligandumfelesleget tartalmazó rendszerben is további deprotonálódás játszódik le pH 8 felett, és pH 10 körül a fémion:ligandum kiindulási koncentrációaránytól függetlenül két ekvivalens többlet-lúgfogyás tapasztalható a ligandum titrálási görbéjéhez képest $[CuH_2L]^-$ összetétellel jellemezhető részecske kialakulására utalva. A fentiekben leírt folyamatok jól követhetők az eloszlási diagramokon is (6.1.6. ábra).



6.1.6. ábra: A réz(II)-His-Xaa-Xaa tripeptidek részecskeeloszlási diagramjai. (A) réz(II):L = 1:1, (B) réz(II):L = 1:2 ($c_{Cu^{2+}} = 0,0008 \text{ mol/dm}^3$, $I = 0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaClO}_4$, $T = 298 \text{ K}$). A telvonal az Xaa = Gly, míg a szaggatott vonal az Xaa = Ala esetre vonatkozik

A His-Xaa-Xaa peptidek CuH_2L komplexének elnyelési spektruma hasonló paraméterekkel jellemezhető, mint az Ala-Ala-Ala tripeptid réz(II)komplexe ($\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$, $\epsilon = 165 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$ [124]). Ez összhangban van az irodalomban javasolt tripeptid-szerű koordinációval [128]. Ez alapján a His-Gly-Gly, illetve His-Ala-Ala tripeptidek $[\text{CuH}_2\text{L}]^-$ komplexei hasonló szerkezetűek, és így hasonló CD spektrumokat kellene adniuk, mint az Ala-Gly-Gly és Ala-Ala-Ala megfelelő komplexei. Ezzel szemben a His-Gly-Gly $[\text{CuH}_2\text{L}]^-$ komplexének CD spektruma pozitív Cotton-effektust mutat (**6.1.2. táblázat**), az Ala-Gly-Gly negatív CD sávjával ellentétben, a His-Ala-Ala komplex pedig lényegesen kisebb intenzitású negatív jelet mutat, mint a megfelelő Ala-Ala-Ala komplex. Ez a tény azt látszik igazolni, hogy a hisztidin oldallánc nitrogén donoratomja részt vesz a koordinációban, vagy ötödik ligandumként axiális helyzetben, vagy az aminos csoport helyett az ekvatoriális síkban a réz(II)ion körül (**6.1.7. ábra**). Elképzelhető továbbá még az is, hogy ezen a pH-n koordinációs izomerek alakulnak ki.

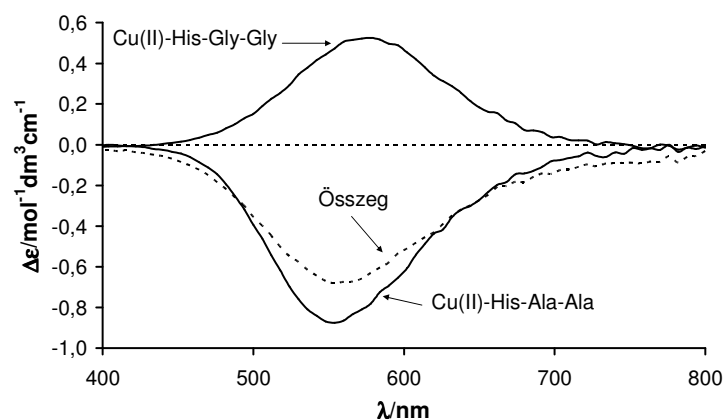


$[\text{CuH}_2(\text{His-Xaa-Xaa})]^-$

6.1.7. ábra: A $[\text{CuH}_2\text{L}]^-$ részecske sematikus szerkezete

A hisztidintől a C-terminális irányban megvalósuló amid-nitrogén koordináció jellemzi például a prion fehérjék ismétlődő, úgynevezett „octarepeat” régiójának (négyyszer ismétlődő PHGGGWGQ szekvencia) réz(II)ionnal kialakított komplexét, ahol semleges közegben az imidazol-nitrogén, két amid-nitrogén és egy karbonil-oxigén koordinálódik a réz(II)ionhoz az ekvatoriális síkban [50,51]. Meg kell ugyanakkor jegyezni, hogy ez utóbbi esetben a prolin jelenléte megakadályozza az N-terminális irányú koordinációt, és emiatt alakul ki a kisebb stabilitású héttagú kelátgyűrű a C-terminális irányban. Ugyanakkor a His-Xaa-Xaa peptidekben az aminos csoport öttagú kelát kialakítására képes a szomszédos amid-nitrogénnel.

A CD spektrumok elemzése a peptidkomplexekben lévő kelátgyűrűk additív hatását ebben az esetben is jól mutatja (**6.1.8. ábra**). Ez annyit jelent, hogy a peptidmolekula C-terminális részének koordinációja jól leírható peptidszerű koordinációként, azonban az N-terminális rész koordinációs módjára vonatkozó fenti kérdések nyitottak maradtak. Ezek megválaszolásának reményében állítottuk elő az aminos csoportján acetilezett Ac-His-Gly-Gly- NH_2 peptidet, melyben valószínűsíthető az imidazol- és az amid-nitrogének prionszerű koordinációja.

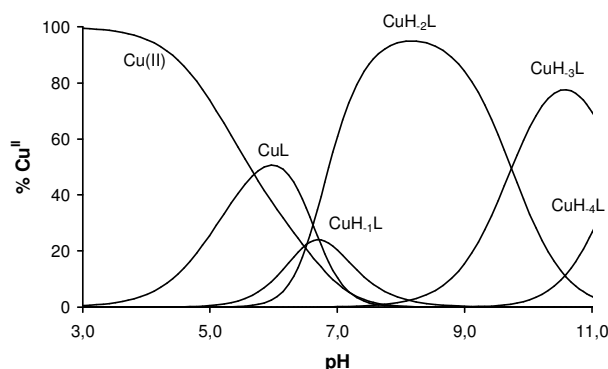


6.1.8. ábra: A réz(II)-His-Xaa-Xaa (Xaa = Gly vagy Ala) komplexek esetén a $[\text{CuH}_2\text{L}]$ részecske CD spektrumai (az "Összeg" a His-Gly-Gly, Gly-Ala-Gly és a Gly-Gly-Ala komplexek spektrumainak összege)

6.1.4. Réz(II)-Ac-His-Gly-Gly-NH₂ komplexek

Az előzők alapján, a His-Xaa-Xaa komplexek esetében az imidazol-nitrogén koordinációja az amino-nitrogén helyett egy 7,5,5-tagszámú csatolt kelát kialakulását eredményezheti (**6.1.7. ábra**), amely hasonlóságot mutatna a prion fehérje fémkötő egységével. Ez utóbbi szerkezetének felderítésében nagy szerepet játszottak a spektrális sajátosságok. A prion fehérje és kisebb tagszámú védett peptid oldatainak pH 7,4-nél réz(II)ionok jelenlétében mért ESR és CD spektrumainak hasonlósága alapján a legkisebb vizsgált peptid lehetséges koordinációs módját feltételezték a fehérjében is. Ez a peptid pedig az N-terminális részen acetilcsoporttal védett, C-terminálison amid-végű His-Gly-Gly tripeptid (Ac-HGG-NH₂) volt, melyben az imidazol-nitrogén, a C-terminális irányban lévő két amid-nitrogén, és a C-terminális karbonil-oxigén, {ImN, N⁻, N⁻, C=O} koordinációját javasolták [51]. Meg kell azonban jegyezni, hogy egyensúlyi vizsgálatok nem történtek annak kiderítésére, hogy pH 7,4-nél az oldatban milyen részecskék vannak jelen. A hivatkozott közlemény megjelenésekor (2000) a fenti koordinációs mód még eléggé valószínűtlennek tűnt, bár hasonló szerkezetet már korábban is feltételeztek hexapeptid fémkomplexeinél [123]. Később az ilyen típusú koordinációt röntgendiffrakciós vizsgálattal is igazolták a réz(II)-N-Ac-His-Gly-Gly-Gly-Trp-NH₂ komplex esetében [81]. Azóta több, a hisztidint a védett N-terminális helyen tartalmazó peptidről feltételezték, hogy ily módon köti meg a réz(II)ionokat [2,4]. Ezen, mind a peptid, mind a fehérjék körében szokatlan koordinációs mód jellemzőinek jobb megismerése céljából előállítottuk az Ac-His-Gly-Gly-NH₂ peptidet és megvizsgáltuk oldatbeli viselkedését réz(II)ionok jelen-, illetve távollétében.

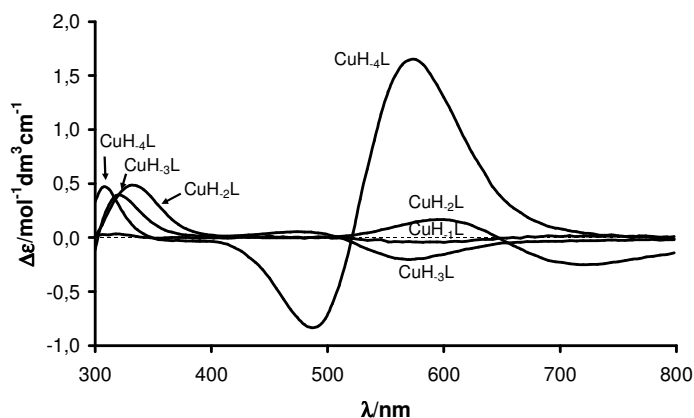
Az Ac-HGG-NH₂ ligandumot a pH-metriás titrálás során pH 2 – 11 között egy deprotonálódási folyamat jellemzi, melyre vonatkozó pK érték 6,45. Réz(II)ionok jelenlétében a pH növelésével a $[\text{CuL}]^{2+}$, $[\text{CuH}_1\text{L}]^+$, $[\text{CuH}_2\text{L}]^0$, $[\text{CuH}_3\text{L}]^-$ és $[\text{CuH}_4\text{L}]^{2-}$ részecskék képződését tapasztaltuk (**6.1.9. ábra**). A $[\text{CuL}]^{2+}$ komplexben a His oldalláncának monodentát koordinációja valószínűsíthető.



6.1.9. ábra: A réz(II)-Ac-HGG-NH₂ rendszer részecskeeloszlási diagramja, réz(II):L = 1:1, $c_{Cu^{2+}} = 6,0 \times 10^{-4}$ mol/dm³, $I=0,1$ mol/dm³ NaClO₄; T=298 K

A pH növelésével, kooperatív jelleggel, két deprotonálódási folyamat játszódik le pH 6 – 8 között. A keletkező [CuH₂L]⁰ részecskére a kísérleti adatokból számolt UV és CD egyedi spektrumai (**6.1.2. táblázat**) jelentősen különböznek a korábban tárgyalt, nem védett His-Gly-Gly komplexétől. Viszont a CD spektrum alakja jó egyezést mutat a fentiekben említett összehasonlító közleményben mértekkel [51]. Ebből arra következtetünk, hogy a His-Gly-Gly komplexében a domináns koordinációs mód valószínűleg az ahol a hisztidin oldallánca axiális helyzetben koordinálódik közvetlenül, vagy egy vízmolekulán keresztül.

Érdekes megjegyezni, hogy az Ac-HGG-NH₂ peptid [CuH₂L]⁰ részecskére meglehetősen kis intenzitású moláris spektrumok számolhatók (**6.1.10. ábra**), ami valószínűleg annak tulajdonítható, hogy a réz(II)ion felé a ligandum királis hatását mindössze egyetlen mozgékony héttagú kelátgyűrű közvetíti – nem túl hatékonyan [4]. Ugyanakkor a pH növelésével mind az elnyelési, mind a CD spektrumok intenzitásának lényeges növekedését okozza a további deprotonálódott peptid-nitrogének koordinációja. A végső, [CuH₄L]²⁻ összetételű részecskében az imidazol-nitrogén kiszorul az ekvatoriális koordinációs síkból ahol négy deprotonálódott amid-nitrogén található. Erre a változásra következtethetünk az UV tartományban megjelenő Cotton-effektusok hullámhosszában bekövetkező eltolódásából is. Hasonló jelenségek figyelhetők meg más N-terminálisan védett His és Gly tartalmú peptidkomplexek esetén is [39,93,96].



6.1.10. ábra: A réz(II)-Ac-HGG-NH₂ komplexek egyedi moláris CD spektrumai

6.1.5. Réz(II)-tripeptid rendszerekkel kapcsolatos eredmények összefoglalása

A fenti megállapítások alapján elmondhatjuk, hogy a biológiai szempontból is jelentős Xaa-Xaa-His, Xaa-His-Xaa és His-Xaa-Xaa (ahol Xaa = Gly vagy Ala) tripeptidek réz(II)-komplexeinek kombinált potenciometriás, spektrofotometriás, CD- és ESR spektroszkópiás vizsgálata hasznos, egymást kiegészítő információkat szolgáltat a réz(II)-peptidkomplexek oldatkémiai viselkedésének és szerkezetének megismeréséhez.

A vizsgálataink során, az oldatban képződő részecskékre kiszámított egyedi CD spektrumok alapján sikerült megerősíteni, vagy már ismert szerkezeteket, valamint az ezektől eltérő koordinációs környezetben oldatbeli szerkezeteket javasoltunk. A kelátgyűrűk királis hozzájárulása a tripeptidekben egymástól nagyrészt független, ezért additív módon jelentkeznek. Ez alapján, amennyiben a moláris CD spektrumok ismertek, megjósolható további peptidkomplexek szerkezete.

Vizsgálataink azt mutatták, hogy a hisztidin jelenléte a peptidekben jelentős királis hozzájárulást eredményezett, ami minden esetben pozitív Cotton-effektusban nyilvánult meg, bár ennek mértéke a hisztidinnek a szekvenciában elfoglalt helyével lényegesen változhat. A His-Xaa-Xaa réz(II)komplexeinek moláris CD spektrumait összehasonlítva az Ala-Ala-Ala megfelelő komplexeivel, például egyértelműen megállapítható, hogy mind a $\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2$ mind a CuH_2L komplexekben az imidazol-nitrogén részt vesz a fémion-megkötésében.

Az Ac-HGG-NH₂ komplexeire jellemző CD-spektrumokban új elemként jelentkezik az ekvatoriális koordinációs síkban lévő donorcsoportok π -elektronrendszereinek kölcsönhatása és a nagymértékű szimmetria miatt megjelenő szabályos intenzív CD couplet.

További királis hozzájárulások figyelhetők meg a fémion koordinációs szférájában lévő ligandumok egymással történő kölcsönhatása miatt, mint például a szterikus okokból az imidazolgyűrűk ekvatoriális síkból történő propellerszerű kifordulása.

Ezen új hozzájárulások miatt azonban meglehetősen óvatosan kell eljárunk, ha egy ismeretlen komplex szerkezetére szeretnénk információt nyerni. Jó példája ennek az irodalomban közölt N-Ac-His-Val-His komplex, melynek CuH_2L komplexére $\{\text{ImN}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{ImN}\}$ koordinációt feltételezve a tripeptidkomplexek spektrumainak összeadása során egy $\Delta\epsilon_{500\text{ nm}} = +0,46\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$ és egy $\Delta\epsilon_{584\text{ nm}} = -0,35\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$ szélső értékekkel jellemezhető spektrumot kapunk. Ugyanakkor a kísérleti spektrumra ezek az értékek rendre: $\Delta\epsilon_{480\text{ nm}} = +1,15\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$, és $\Delta\epsilon_{585\text{ nm}} = -0,82\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$ [10]. Amint látható a hullámhossz értékek és az ezeknél mutatkozó Cotton-effektusok előjele jól megjósolható, de az intenzitásbeli eltérés mindenképpen figyelmeztet bennünket arra, hogy a fenti komplexben további királis hozzájárulások jelentkeznek, amint az a szerkezet alapján várható is.

Mindezek azt támasztják alá, hogy az oldategyensúlyi adatok segítségével számított moláris CD spektrumok alapján, kellő körültekintéssel, számos új információ nyerhető a réz(II)ionok peptidkomplexeinek oldatbeli szerkezetéről. Várhatóan a bonyolultabb rendszerek jobb megismerésével ezen lehetőségek tárháza tovább bővül majd.

6.2. Hisztidinben gazdag peptidkomplexek oldatkémiai viselkedése

A II-es típusú rézproteinek funkcionális modellezése peptidkomplexekkel egyben szerkezeti modellezést is jelent. Ennek oka, hogy megfelelő modell várhatóan csak egy olyan, három (vagy több) hisztidin alegységet tartalmazó rézkomplex lehet, amelyben a ligandum fiziológiás körülmények között csak az imidazol-nitrogének révén kötődik a fémionhoz. Számos természetes enzim rendelkezik ilyen szerkezetű aktív központtal; például az amin-oxidáz, nitrit-reduktáz, szuperoxid-dizmutáz vagy a kvercetin-2,3-dioxigenáz. Ugyanakkor a cinkionokat tartalmazó hidrolitikus enzimekben a fémion megkötésében szintén a fehérje hisztidin oldalláncai vesznek részt. A természetes hidrolázok és oxidázok egy csoportja aktív centrumának ezen hasonlósága lehetőséget nyújthat arra, hogy modellvegyületeink a fémion cseréjével alkalmasak legyenek mindkét funkció betöltésére, a merőben eltérő mechanizmus ellenére.

Amint az mind a 6.1. fejezetből, mind az irodalmi összefoglalásból egyértelműen látható, a réz(II)ion amid-nitrogénnel szembeni nagy affinitása, és a kialakuló kis tagszámú kelátgyűrűk nagy stabilitása azt eredményezi, hogy legtöbbször már gyengén savas közegben bekövetkezik az amid-nitrogén koordinációja. Ez a folyamat eltolható pH 7 környékére a hisztidinek számának növelésével a peptidekben, de a HXH szekvenciák esetén egy kitüntetett stabilitású {ImN, N⁻, N⁻, ImN} típusú koordináció jön létre. Az amid-nitrogén koordinációja pedig lényegesen csökkenti a fémion Lewis-savasságát, kompenzálja a fémion pozitív töltését, és stabilizálja a magasabb oxidációs állapotot. Emiatt a réz(II)-peptidkomplexek modellként való használhatósága korlátozott.

Amíg a réz(II)komplexekben az amid-nitrogén koordinációja, addig a cink(II)ionok esetében a fiziológiás pH környékén a fémion hidrolízise jelent akadályt a modellezésben, ugyanis ennek következtében az oldatból legtöbbször csapadék válik ki, megakadályozva a katalitikus vizsgálatokat.

Kihívást jelent tehát egy olyan minimális peptidligandum tervezése, mely képes a fenti követelményeknek eleget tenni. Munkánk egyik célja ezért olyan vízoldható peptidkomplexek kifejlesztése volt, amelyekben fiziológiás pH-n az amid-nitrogén nem vesz részt a fémion-koordinációban. Ehhez a kiindulópontot az alábbi feltételezések jelentették: a peptidszekvenciába a hisztidin aminosavak közé egy, illetve két prolin beépítése a szekunder amidkötés miatt (i) töréspontot jelent a sorozatos amid-nitrogén koordinációban, (ii) merevíti a szerkezetet, ami optimális esetben a komplex termodinamikai, illetve kinetikai stabilitásának növekedéséhez vezethet. Érdekes még megemlíteni, hogy a prolingyűrű jelenléte miatt *cisz/transz* izoméria léphet fel a ligandumban. Ugyanakkor a komplexkémiaiában igen gyakori, hogy az egyik izomer a fémionhoz történő koordináció során olyan mértékű stabilitásra tesz szert, hogy a másik izomer kialakulását teljesen visszaszorítja. A peptidkötések sík szerkezetét, és *transz* formáját alapul véve, egyszerű számítógépes modellezés alapján elmondhatjuk, hogy a prolin oldalláncának *transz* állása a fémionhoz való koordinációval egyidőben nem jöhet létre, azaz a *cisz/transz* izoméria megjelenésével nem kell számolnunk.

Ezek alapján a következő peptideket terveztük meg és állítottuk elő: Ac-HPHH-NH₂, Ac-HPHPH-NH₂, Ac-KHPHPHQ-NH₂. Az alábbiakban ezen peptidek főként réz(II)- és cink(II)-, esetenként nikkel(II)ionokkal kialakított komplexeinek oldatkémiai viselkedésével kapcsolatos eredményeket mutatjuk be.

6.2.1. Az Ac-HisProHisHis-NH₂ ligandum réz(II)-, cink(II)- és nikkel(II)komplexei

A hisztidinben gazdag ligandumok vizsgálata rávilágított arra, hogy csupán a koordinálódó oldalláncokat tartalmazó aminosavak beépítése a peptid szekvenciába nem elegendő az amid-nitrogén deprotonálódásának megakadályozására. Azonban azt is láttuk, például az Ac-HisHisGlyHis-OH [39] ligandum esetén, hogy a több hisztidint tartalmazó peptidek komplexei igen jó szuperoxid-dizmutáz, illetve pirokatechin-oxidáz enzimmodellek lehetnek. Ezért olyan új tetrapeptidet terveztünk, amelybe egy prolin beépítésével próbáltuk az amid-nitrogének koordinációjának valószínűségét csökkenteni: Ac-HisProHisHis-NH₂.

E ligandum pH-metriás titrálása során, pH 2 – 11 tartományban, három proton leadása történik meg egymással átfedő folyamatokban, melyekre a következő egyensúlyi állandókat határoztuk meg: $pK_1 = 5,60$, $pK_2 = 6,20$ és $pK_3 = 6,99$ ($I = 0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$, $T = 298 \text{ K}$). Ezen állandók makroszkópikus jellegűek, és nem rendelhetők külön-külön az egyes imidazol-nitrogének deprotonálódási folyamataihoz.

Réz(II)komplexek

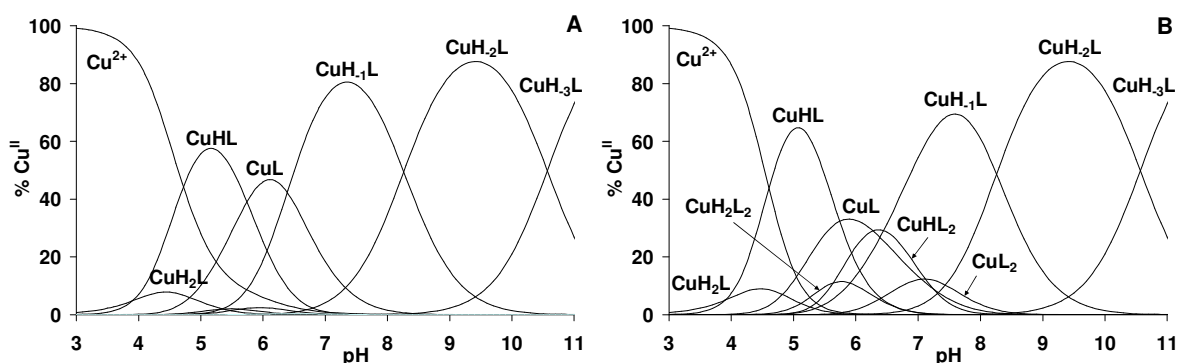
A réz(II)-Ac-HPHH-NH₂ rendszer oldategyensúlyi vizsgálatát 1:1, illetve 1:2 kiindulási fém:ligandum arány mellett végeztük. A potenciometriás titrálások során az oldatban jelenlevő különböző részecskék stabilitási állandóit határoztuk meg. A párhuzamosan mért UV/látható, CD és ESR spektrumok a részecskemátrix összeállításában nagy segítséget jelentettek. pH 3 – 11 között kilenc különböző részecske képződését mutattuk ki. Ezek bruttó stabilitási, valamint származtatott állandóit a **6.2.1. táblázat** tartalmazza. Mivel a ligandum liofilizálását 1:4 ecetsav:víz elegyből végeztük, ezért a peptid acetát-só formájában állt rendelkezésünkre. A titrálások kiértékelése során ezt figyelembe vettük, az ecetsav pK értéket 4,56 értéken tartva. A számolások során a réz(II)-acetát komplexek is bekerültek a részecskemátrixba, ám ezek elhanyagolhatóan kis mennyiségben képződtek.

Amint azt a részecskeeloszlási diagramok mutatják (**6.2.1. ábra**), mindkét alkalmazott fémion:ligandum aránynál a különböző protonáltsági állapotú *monokomplexek* dominálnak, bár a ligandumfelesleget tartalmazó rendszerben pH 6,5 körül a *biszkomplexek* összkoncentrációja megközelíti a teljes fémionkoncentráció 50%-át (**6.2.1.B. ábra**). A Cu:L = 1:1 molarányú rendszerben a *biszkomplexek* jelenléte elhanyagolhatóan kicsi.

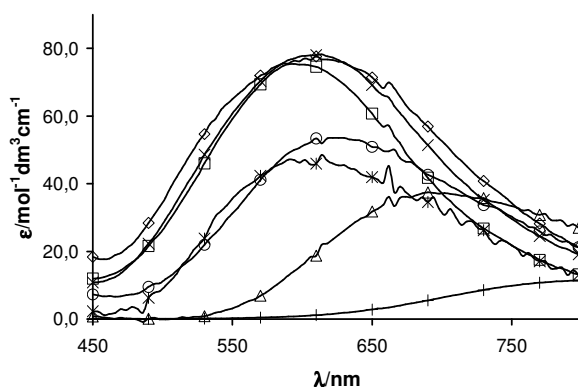
6.2.1. táblázat: Az Ac-HPHH-NH₂ ligandum réz(II)-, nikkel(II)-, és cink(II)komplexeinek bruttó stabilitási állandói ($\log\beta$), valamint a származtatott pK , illetve $\log K$ értékek ($I = 0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$, $T = 298 \text{ K}$), a ligandum protonálódási állandói: $pK_1=5,60$, $pK_2=6,20$, $pK_3=6,99$

prq	$\log\beta_{\text{prq}}$				$pK_{\text{prq}}^a, \log K_2^b$		
	réz(II)	nikkel(II)	cink(II)		réz(II)	nikkel(II)	cink(II)
121	16,67(2)	–	–	pK_{121}	3,90	–	–
111	12,77(1)	10,44(1)	9,92(2)	pK_{111}	5,74	6,10	5,93
101	7,03(1)	4,34(1)	3,99(1)	pK_{101}	6,39	9,15	7,43
1–11	0,64(1)	–4,81(2)	–3,44(2)	pK_{1-11}	8,26	8,63	–
1–21	–7,62(1)	–13,44(1)	–	pK_{1-21}	10,57	–	–
1–31	–18,19(2)	–	–				
122	23,51(2)	–	–	pK_{122}	5,63	–	–
112	17,88(1)	–	–	pK_{112}	7,12	–	–
102	10,76(2)	7,45(2)	7,17(3)	$\log K_2$	3,73	3,11	3,18
^a $pK_{\text{prq}} = \log \beta_{\text{prq}} - \log \beta_{\text{p(r-1)q}}$, ^b $\log K_2 = \log \beta_{102} - \log \beta_{101}$							

Az eloszlásgörbékéből látható (6.2.1. ábra), hogy savas közegben ($\text{pH} \sim 3 - 5$) a $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$ és a $[\text{CuHL}]^{3+}$ részecskék vannak jelen, előbbi, ahol csupán egyetlen hisztidin imidazol-nitrogénjének monodentát koordinációja valósul meg, kis mennyiségben képződik. A $\text{pH} \sim 5$ körül domináns protonált $[\text{CuHL}]^{3+}$ részecske esetében a feltételezett $\{2 \times \text{ImN}, 2 \times \text{H}_2\text{O}\}$ koordinációt alátámasztja a részecske egyedi moláris abszorpciós spektruma (6.2.2. ábra) alapján meghatározott 694 nm-es λ_{max} és a Prenesti és munkatársai [47] által javasolt szemiempirikus szabállyal erre a koordinációs módra számolható 692 nm-es érték közti egyezés. Ugyanezt a koordinációt támasztja alá a $\text{Cu}^{2+} + [\text{HL}]^+ = [\text{CuHL}]^{3+}$ egyenlet alapján származtatható $\log K = 5,78$ egyensúlyi állandó értéke is, ami a két imidazol-nitrogén koordinációját tartalmazó réz(II)komplexek esetében meghatározott állandókhoz hasonló [39,92,93,97].

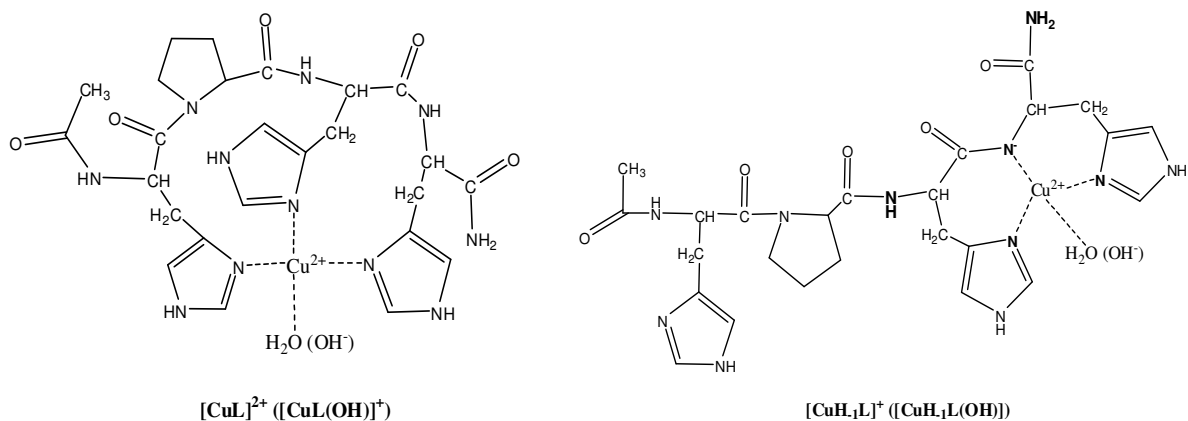


6.2.1. ábra: A réz(II):Ac-HPHH-NH₂ 1:1 (A) és 1:2 (B) rendszerek részecskeeloszlási diagramjai. (A) $c_{\text{Cu}^{2+}} = c_L = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, illetve (B) $2 \times c_{\text{Cu}^{2+}} = c_L = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $I=0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$; $T=298 \text{ K}$



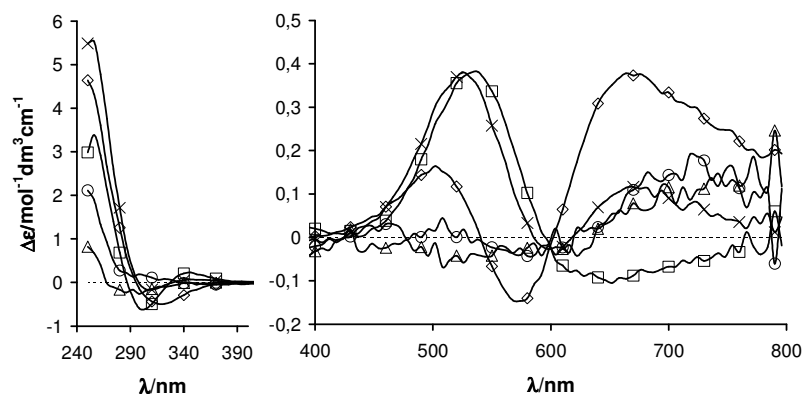
6.2.2. ábra: A réz(II)-Ac-HPHH-NH₂ rendszerben domináns részecskék egyedi moláris abszorpciós spektrumai: [CuHL]³⁺ – Δ; [CuL]²⁺ – O; [CuH₁L]⁺ – □; CuH₁L(OH) – ×; [CuH₃L]⁺ – ◇; [CuHL₂]³⁺ – *; Cu^{II} – +

A következő folyamat ($[\text{CuHL}]^{3+} = [\text{CuL}]^{2+} + \text{H}^+$) pK értéke 5,74, ami sokkal kisebb mint a szabad ligandum harmadik deprotonálódási lépésének pK-ja. Ezért ebben a lépésben valószínűleg mindhárom deprotonálódott imidazol-nitrogén a réz(II)ionhoz koordinálódik a törzskomplexben, amint az a **6.2.3. ábrán** látható. E részecske stabilitása megközelítőleg egy nagyságrenddel kisebb, mint a hasonló három imidazol-nitrogén által koordinált réz(II)komplexek esetében [39,92,93,97], ami valószínűleg az Ac-HPHH-NH₂ ligandum merev szerkezetével van összefüggésben a prolin beépítésének a következtében.



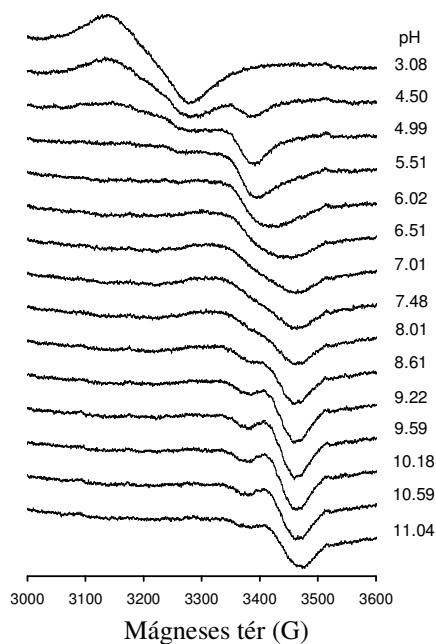
6.2.3. ábra: A domináns réz(II)-Ac-HPHH-NH₂ komplexek oldatbeli szerkezetének sematikus ábrázolása; zárójelben a lehetséges vegyes hidroxokomplexek szerkezetét jelöltük

A három imidazol-nitrogén koordinációját támasztja alá az egyedi abszorpciós spektrumból leolvasható (**6.2.2. ábra**) 622 nm-es λ_{max} érték is, ami jó egyezést mutat az empirikusan számolt 634 nm-es értékkel. Az egyedi CD spektrumok (**6.2.4. ábra**) kis intenzitású jeleket mutatnak a $[\text{CuL}]^{2+}$ részecske esetén, mind a töltésátviteli, mind pedig a *d-d* átmenetek tartományában. Ez arra utal, hogy makrokelátok alakulnak ki, és mint azt korábban már láttuk, az ilyen típusú koordináció nem járul hozzá jelentősen az optikai aktivitáshoz. Mindezek megerősítik azt a feltevést, hogy a fémionhoz a három imidazol-nitrogén koordinálódik: $\{3 \times \text{ImN}, \text{H}_2\text{O}\}$.



6.2.4. ábra: A domináns réz(II)-Ac-HPHH-NH₂ komplexek egyedi moláris CD spektrumai: [CuHL]³⁺ – Δ; [CuL]²⁺ – O; [CuH₂L]⁺ – □; CuH₂L(OH) – ×; [CuH₃L]⁺ – ◊ (a nagy intenzitásbeli különbségek miatt az UV és látható tartomány spektrumai külön ábrán szerepelnek)

A pH függő ESR spektrumok nagyon széles jeleket mutatnak, ezért nem látszanak a nitrogén koordinációja miatt kialakuló szuperhiperfinom felhasadások sem (**6.2.5. ábra**), ami valószínűleg a komplexek lassú oldatbeli mozgásának az eredménye [129]. Ez a jelenség gyakran megfigyelhető ha a réz(II)ionhoz a peptidnek csak egy kis része koordinálódik, a szabad rész pedig rendezetlen szerkezetet mutat [123]. Ezek a szabadon mozgó végek növelik a molekula hidratburkát lassú mozgást és az ESR jelek kiszélesedését eredményezve, ami tovább fokozódik ligandumfelesleg jelenlétében, a biszkomplexek képződésének tartományában. A [CuL₂]²⁺ komplex esetén a második ligandum koordinációja egyfogú, vagy kétfogú formában feltételezhető. Ez utóbbi koordinációt támasztja alá ezen részecske képződésének $pK \sim 7$ értéke, ami megegyezik a ligandum harmadik pK értékével.



6.2.5. ábra: A réz(II):Ac-HPHH-NH₂ 1:1 molarányú rendszer pH függő ESR spektrumai($c_{Cu^{2+}} = c_L = 6,5 \times 10^{-4}$ mol/dm³, $T=298$ K)

A $[\text{CuL}]^{2+}$ komplex deprotonálódás pH 6 körül indul ($[\text{CuL}]^{2+} = [\text{CuH}_1\text{L}]^+ + \text{H}^+$, $\text{p}K_{101} = 6,39$). pH 7,5 körül a $[\text{CuH}_1\text{L}]^+$ részecske válik dominánssá az oldatban. E folyamat során elképzelhető a két szomszédos hisztidin közötti amid-nitrogén deprotonálódása, ami $\{\text{ImN}, \text{N}^-, \text{ImN}\}$ típusú koordinációt eredményez, de vegyes hidroxokomplex $[\text{CuL}(\text{OH})]^+$ képződése is lehetséges $\{3 \times \text{ImN}, \text{OH}^-\}$ típusú koordinációs móddal (**6.2.3. ábra**). A CD spektrumok (**6.2.4. ábra**) a $d-d$ átmenetek tartományban és a közeli UV régióban is jelentős intenzitás-növekedést mutatnak, ami az előbbi, azaz az amid-nitrogén deprotonálódását támasztja alá. Ez egy hat- és egy héttagú kelátgyűrű kialakulásával jár, amelyek sokkal hatékonyabban közvetítik a ligandum optikai aktivitását, mint a $[\text{CuL}(\text{OH})]^+$ részecske képződése esetén feltételezhető, a $[\text{CuL}]^{2+}$ komplex szerkezetéhez hasonló, makrokelát típusú koordináció. Az egyedi abszorpciók spektrum maximumának eltolódása kisebb hullámhosszak felé ($\lambda_{\text{max}} = 596 \text{ nm}$) is az erősödő ligandumtérre utal. Mivel a $\{\text{ImN}, \text{N}^-, \text{ImN}, \text{H}_2\text{O}\}$ koordinációra számolható 608 nm-es λ_{max} érték jó egyezést mutat az általunk meghatározott adattal, ezért a $[\text{CuH}_1\text{L}]^+$ részecskében a harmadik imidazol-nitrogén valószínűleg kiszorul az ekvatoriális koordinációs síkból az amid-nitrogén koordinációját követően. Ezek alapján a **6.2.3. ábrán** feltüntetett koordinációs módot javasoljuk. Amint azt az irodalmi összefoglalóban is láttuk, a HXH szekvenciájú peptidek (ahol $X \neq \text{prolin}$) réz(II)ion indukálta deprotonálódása során, fiziológias pH tartományban, a $\{\text{ImN}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{ImN}\}$ típusú, két koordinálódott amid-nitrogént tartalmazó részecske gyakran képződik. Esetünkben a prolin beépítésével ezt elkerültük, de a HH szekvenciánál nem sikerült megakadályozni az amid-nitrogén deprotonálódását, és ezzel a fémion Lewis savasságának csökkenését, ami kedvezőtlenül hathat a komplex enzimutánzó képességére. Azonban az előző esettel ellentétben, ahol az ekvatoriális koordinációs sík teljesen telített, itt egy könnyen cserélhető vízmolekula foglalja el a negyedik koordinációs helyet. Emellett a harmadik imidazol-nitrogén a réz(II)ion közelében van, mint sok természetes enzim aktív központjában, ezért ez a részecske, vagy a következő deprotonálódási lépésben keletkező $[\text{CuH}_2\text{L}]^0$ vegyes hidroxokomplex (feltételezett koordináció: $\{\text{ImN}, \text{N}^-, \text{ImN}, \text{OH}^-\}$, lásd később) ígéretes enzimmodell lehet.

A következő lépésben, a HXH (ahol $X \neq \text{P}$) szekvenciájú peptidkomplexekkel ellentétben, ahol általában szorosan átfedő deprotonálódások játszódnak le a két egymást követő amid-nitrogén részvételével [10,39,90,92,93,97], itt a CuH_2L részecske csak pH 8 felett képződik, és $\text{p}K$ -ja jelentősen elkülönül az előzőtől ($\text{p}K_{1-11} = 8,26$). Mivel e folyamat ($[\text{CuH}_1\text{L}]^+ = [\text{CuH}_2\text{L}]^0 + \text{H}^+$) nem eredményez jelentős spektrális változásokat a látható-, CD- és ESR spektrumokban sem, arra lehet következtetni, hogy itt nem egy újabb amid-nitrogén, hanem egy vízmolekula deprotonálódása játszódik le, vegyes hidroxokomplex képződése közben, $\{\text{ImN}, \text{N}^-, \text{ImN}, \text{OH}^-\}$ típusú koordinációval az ekvatoriális síkban.

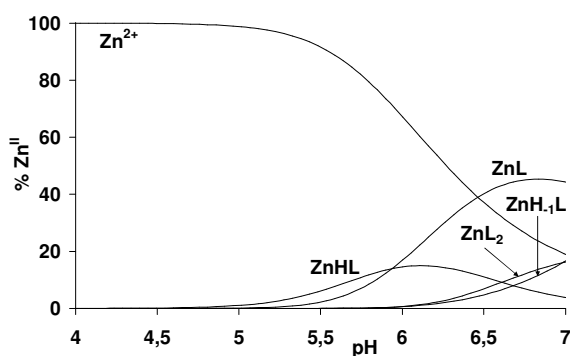
A mólaránytól függetlenül, lúgos közegben három ekvivalens extra lúgfogyást tapasztaltunk, ami azt jelenti, hogy pH 10 fölött egy újabb deprotonálódási folyamat játszódik le $[\text{CuH}_3\text{L}]^-$ részecskét eredményezve ($[\text{CuH}_1\text{L}(\text{OH})]^0 = [\text{CuH}_3\text{L}]^- + \text{H}^+$, $\text{p}K_{1-21} = 10,57$). Az egyedi CD spektrum jelentős megváltozása a korábbiakhoz képest azt jelzi, hogy átrendeződik a réz(II)ion körüli koordinációs szféra, a második amid-nitrogén kiszorít egy újabb imidazol-nitrogént az ekvatoriális síkból. A **6.2.3. ábrán** félkövér betűkkel jelölt két amid-nitrogén egyikének a koordinációja képzelhető el e részecskében. A

CD spektrum szokatlan alakja és a viszonylag nagy $\lambda_{\text{max}}^{d-d} = 610 \text{ nm}$ érték erősen torzult geometriára utal, ezért egy $\{N^-, N^-, \text{ImN}, \text{OH}^- + \text{ImN}_{(\text{axiális})}\}$ típusú koordináció feltételezhető. Itt tehát a prolin aminosav jelenléte miatt nem valósulhat meg az N-terminálison védett hisztidintartalmú peptidekre jellemző három amid-nitrogénes koordináció [2,3,4,10,39].

Cink(II)- és nikkel(II)komplexek

Az Ac-HPHH-NH₂ ligandum cink(II)- és nikkel(II)ionokkal alkotott komplexeinek stabilitását is vizsgáltuk 1:2 és 1:1 fém:ligandum mólarány mellett. Az eddigi irodalmi adatokhoz hasonlóan [10,39,89,96,98], e fémionok egymáshoz hasonló, de a réz(II)ionnál néhány nagyságrenddel kisebb stabilitású komplexeket képeznek (**1. táblázat**).

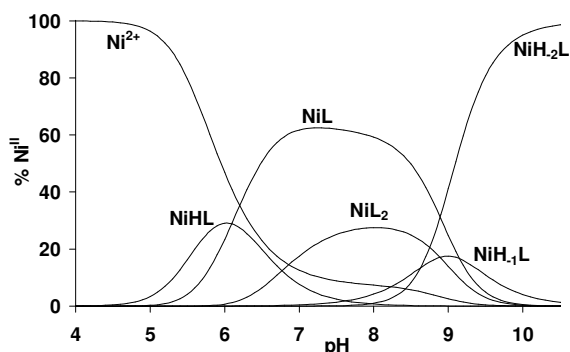
A gyengén savas és semleges közegben képződő $[\text{ZnHL}]^{3+}$ és $[\text{ZnL}]^{2+}$ komplexekre számolt stabilitási állandók ($\text{Zn}^{2+} + [\text{HL}]^+ = [\text{ZnHL}]^{3+}$, $\log K = 2,93$ és $\text{Zn}^{2+} + \text{L} = [\text{ZnL}]^{2+}$, $\log K = 3,99$), a hasonló rendszerekben meghatározott értékekkel összevetve [39,89], a két illetve három imidazol-nitrogén koordinációját támasztják alá. A következő deprotonálódási lépésben, pH ~ 6 felett keletkező $[\text{ZnH}_2\text{L}]^+$ részecske megjelenésével (**6.2.6. ábra**) szinte egyidejűleg csapadékkiválást tapasztaltuk ligandumfelesleg esetén is, mint ahogy ez más N-terminálisan védett, hisztidint tartalmazó peptidkomplexek esetén is bekövetkezett a fiziológiai pH körül [10,39,89,98]. Mivel a csapadék feloldódását erősen lúgos közegben sem tapasztaltuk, ez meggátolta a további vizsgálatokat. A semleges pH körül képződő $[\text{ZnL}_2]^{2+}$ komplexek képződése sem egyértelmű a csapadék megjelenése miatt, de a réz(II)- és nikkel(II)ionokat tartalmazó rendszerekhez hasonlóan, itt is feltételezhető.



6.2.6. ábra: A cink(II)- Ac-HPHH-NH₂ rendszer részecskeeloszlási diagramja. $\text{Zn:L} = 1:2$, $2 \times c_{\text{Zn}^{2+}} = c_{\text{L}} = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $I=0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$, $T=298 \text{ K}$

A cink(II)ionok jelenlétében végzett vizsgálatokkal ellentétben, a nikkel(II)ionokkal alkotott Ac-HPHH-NH₂ komplexek a teljes vizsgált pH tartományban oldatban maradtak, bár a keletkező részecskék stabilitása minden esetben kisebb volt, mint a megfelelő réz(II)komplexeinél. Amint azt a **6.2.7. ábra** mutatja, savas közegben a $[\text{NiHL}]^{3+}$, míg a 6,5 – 8,5 széles pH tartományban a $[\text{NiL}]^{2+}$ részecske dominál, és még az 1:1 fém:ligandum mólarány mellett is képződik biszkomplex. Az $[\text{NiL}_2]^{2+}$ részecske stabilitási állandója ($[\text{NiL}]^{2+} + \text{L} = [\text{NiL}_2]^{2+}$) csupán 1,23 logaritmus egységgel kisebb az $[\text{NiL}]^{2+}$ törzskomplex $\log \beta$ értékéhez viszonyítva ($\log \beta_{101}$ és $\log K_2 = \log \beta_{102} - \log \beta_{101}$ adatok, **1. táblázat**), ellentétben a réz(II)ionnál tapasztalt 3,3 logaritmus egységnyi különbséggel. Ez arra enged

következtetni, hogy a nikk(II)komplexben a második ligandum valószínűleg mindhárom imidazol-nitrogénje a fémionhoz koordinálódik, akárcsak a cink(II)ionok esetében. Ez összhangban van azzal, hogy míg a réz(II)komplexeknél a síknégyszetes irányba erősen torzult oktaéderes szerkezet a stabil, addig ez utóbbi fémionnál az oktaéderes komplexek képződése a kedvezményezett.



6.2.7. ábra: A nikk(II)- Ac-HPHH-NH₂ rendszer részecskeeloszlási diagramja. $2 \times c_{\text{Ni}^{2+}} = c_L = 8,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $I=0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$, $T=298 \text{ K}$

A pH további növelésével egymással szorosan átfedő lépésekben, az $[\text{NiH}_1\text{L}]^+$ és az $[\text{NiH}_2\text{L}]^0$ részecskék képződnek pH 8 – 10 között, függetlenül az alkalmazott fém:ligandum aránytól. A két deprotonálódási folyamat közti kooperativitás értelmezése nem egyértelmű, két amid-nitrogén vagy egy amid-nitrogén és egy vízmolekula deprotonálódása következhet be a nikk(II)ionok jelenlétében is. A réz(II)komplexekekhez hasonlóan, a két szomszédos hisztidin közötti amid-nitrogén fémion indukálta deprotonálódása a legvalószínűbb, de egy további amid-nitrogén koordinációja, úgy tűnik, kevésbé kedvezményezett. A két amid-nitrogénes koordináció ellen szól a tény, hogy az eddigi ismeretek alapján [130–132], az esetek többségében ez geometriaváltást von maga után, ami szemmel is látható színváltozással jár: az oktaéderes komplekre jellemző halványzöld szín sárgára változik a síknégyszetes elrendeződés során, továbbá jelentős változást okoz a CD spektrumokban is. Esetünkben az nikk(II)-Ac-HPHH-NH₂ titrálása során nem tapasztaltunk színváltozást és karakterisztikus CD jeleket sem mértünk, ami azt a feltételezést eredményezte, hogy a két átfedő folyamat egy koordinálódott vízmolekula és egy amid-nitrogén deprotonálódásához rendelhető. Színváltozás azonban a lúgos kémhatású oldat hosszabb ideig tartó tárolása során bekövetkezett, vagyis feltehetően egy lassú folyamatban a nikk(II)ionhoz koordinálódott hidroxidion egy második amid-nitrogén deprotonálódást indukált, kialakítva így a két amid-nitrogénes, síknégyszetes $[\text{NiH}_2\text{L}]^0$ komplexet. A síknégyszetes szerkezetre utal a 440 nm-nél megjelenő negatív ($\Delta\epsilon = -0,50 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$) és az 502 nm-en intenzív pozitív maximumot mutató ($\Delta\epsilon = +0,50 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$) szimmetrikus CD couplet, valamint a diamágneses komplex NMR spektruma is. A CD spektrumban tapasztalt változások nagymértékben különböznek a hisztidint nem tartalmazó, egyetlen minimum vagy maximum jelet mutató síknégyszetes nikk(II)komplexeiktől [131]. Valamint ellentétes előjelet mutatnak azon síknégyszetes nikk(II)komplexekek CD spektrumaihoz képest, amelyekben az amid-nitrogén koordinációját a hisztidin aminosavtól kiindulva az N-terminális rész felőli peptid-nitrogén deprotonálódása követ [66, 130–132].

Különböző réz(II)komplexek CD vizsgálata [133] alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a réz(II)- és nikkel(II)komplexek esetén tapasztalható couplet jelek előjele az –XYH– szekvencia esetén az X aminosav milyenségétől függ (X és Y nem vagy gyengén koordinálódó oldalláncot tartalmazó aminosavakat jelöl). Ezzel ellentétben, az eddigi eredmények azt mutatták, hogy azok a síknégyzetes nikkel(II)komplexek, amelyeknél a hisztidin a C-terminális helyet foglalja el, egy pozitív CD jelet mutatnak kisebb, és egy negatív jelet nagyobb λ értéknél [66, 130–132]. Egyetlen ezekkel ellentétes előjelű spektrumot találtunk az irodalomban, az Ac-HGGG-NH₂ peptid esetében [132]. Ez utóbbi rendszerrel való hasonlóság alapján az nikkel(II)-Ac-HPHH-NH₂ rendszerben az [NiH₂L]⁰ részecske esetében, az oktaédes komplex lassú geometriaváltása során a két szomszédos, a molekula C-terminális része felőli deprotonálódott amid-nitrogének koordinációját feltételezzük.

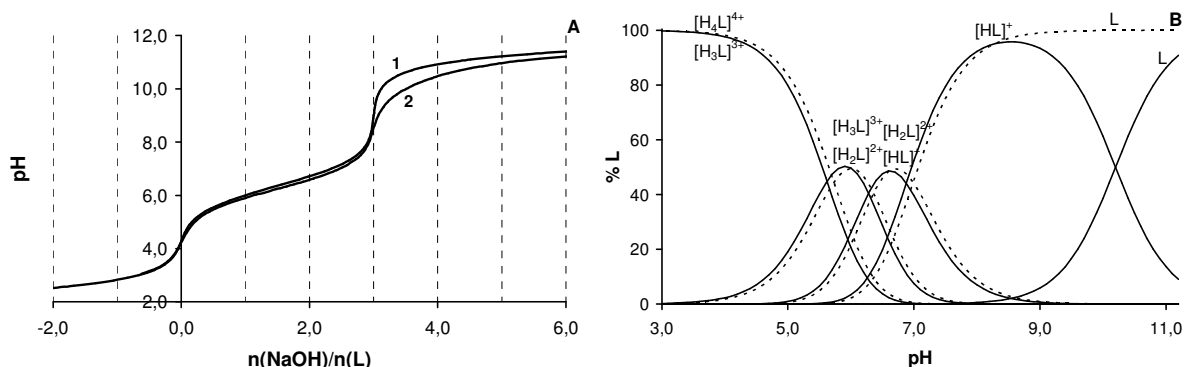
6.2.2. *Ac-HisProHisProHis-NH₂ és Ac-LysHisProHisProHisGln-NH₂ ligandumok réz(II)- és cink(II)komplexei*

Láthattuk, hogy az Ac-HPHH-NH₂ réz(II)komplexeiben nem sikerült az amid-nitrogén koordinációját fiziológiás pH tartományban megakadályozni, illetve cink(II)ionok jelenlétében csapadék vált ki az oldatból. Ennek egyik oka lehet, hogy a prolin aminosav miatt a peptidlánc meglehetősen merevsége nem kedvez a három imidazol-nitrogén együttes koordinációjának. Ez látható abból is, hogy az [ML]²⁺ törzskomplexek stabilitása, mind a réz(II)-, mind a cink(II)ionok esetében kisebb, az irodalomban fellelhető hasonló koordinációs típusú komplexekhez viszonyítva. Ebben a HPHH szekvencián kívüli résznek is jelentős szerepe lehet, valószínűleg annak flexibilitása miatt, amit egy, a közelmúltban megjelent közlemény is alátámaszt: az Ac-HPHAH-NH₂, illetve Ac-HAHPH-NH₂ szekvenciájú peptidok CuL komplexeinek stabilitási állandói 10^{7,91} és 10^{8,01} [92] rendre mintegy egy nagyságrenddel nagyobbak az Ac-HPHH-NH₂ esetén tapasztaltnál (10^{7,03}).

Bár ezeknél a több hisztidint tartalmazó peptideknél a {3×ImN} koordináció dominált pH 5 – 7 tartományban, de nagy stabilitású {2×ImN, 2×N[–]} komplexek alakultak ki a pH kismértékű növelését követően a HXH (ahol X ≠ Pro) szekvenciát tartalmazó peptidekrészlet miatt réz(II)ion jelenlétében. Cink(II)ionok jelenlétében pedig, semleges pH körül, itt is csapadék vált ki az oldatból. A megfelelő minimális peptidtípusú enzimmodell kialakításához a fentiek alapján új ligandumokat terveztünk: az Ac-HisProHisProHis-NH₂ és Ac-LysHisProHisProHisGln-NH₂ peptideket. Az amid-nitrogének konszekutív deprotonálódásában töréspontot jelentő két prolin aminosav beépítésével célunk továbbra is az volt, hogy csupán oldallánci donorcsoportok és (deprotonálódott) vízmolekulák közreműködésével, makrokelát típusú koordinációt érjünk el pH 7 – 8 között.

Az Ac-HPHPH-NH₂ ligandum pH-potenciometriás titrálások alapján meghatározott protonálódási állandói: pK₁ = 5,73, pK₂ = 6,36, pK₃ = 6,99, míg az Ac-KHPHPHQ-NH₂ peptidre számolt értékek a következők: pK₁ = 5,62, pK₂ = 6,28, pK₃ = 6,88, pK₄ = 10,20. Az első három állandó jó egyezést mutat az egymás közötti összehasonlításban, valamint az Ac-HPHH-NH₂ (pK₁=5,60, pK₂=6,20,

$pK_3=6,99$) adataival. A poláris csoportot tartalmazó aminosavak peptidláncba való beépítése a hisztidil-oldalláncok protonálódási viszonyait nem befolyásolták lényegesen. A titrálási görbéken eltérés csak pH 8 felett, a lizin deprotonálódási folyamata miatt jelentkezik, mint ahogy azt a két ligandum titrálási görbéinek összehasonlításából is láthatjuk (**6.2.8.A ábra**). Az ábráról az is leolvasható, hogy a három imidazol-nitrogén deprotonálódása egymással átfedő egyensúlyi folyamatokban játszódik le pH 5 – 7 tartományban, vagyis a fentiek makroszkópikus állandók, nem rendelhetők külön-külön egyik csoporthoz sem. Azonban a korábban vizsgált hasonló ligandumok imidazol-csoportjaihoz rendelhető, NMR technikával meghatározott mikroállandók [134] ismeretében megállapítható, hogy az egyes hisztidinek pK értékei nem térnek el jelentősen egymástól ($pK = 6,4 \pm 0,15$), azok deprotonálódása független.



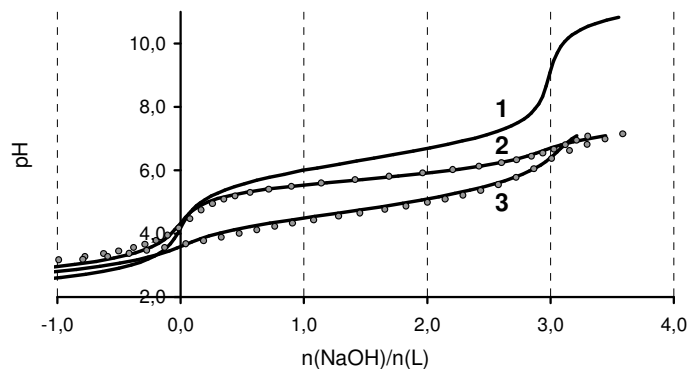
6.2.8. ábra: Az Ac-HPHPH-NH₂ (1) és Ac-KHPHPHQ-NH₂ (2) normált pH-metriás titrálási görbéi (A) és az Ac-HPHPH-NH₂ (szaggatott vonal) és Ac-KHPHPHQ-NH₂ ligandumok eloszlásgörbéi (B) ($I = 0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaClO}_4$, $T = 298 \text{ K}$)

Az Ac-HisProHisProHis-NH₂ ligandum komplexei

A peptid réz(II)- és cink(II)ionok – ligandumfelesleg, illetve ekvivalens mennyiségű fémion – jelenlétében történő titrálásai során azt tapasztaltuk, hogy a titrálási görbék (**6.2.9. ábra**) lefutása hasonló a csak ligandumot tartalmazó görbéhez, azonban a donorcsoportok savassága megnő a fémionok hatására. Ez a hatás jelentősebb a réz(II)ionnál, ami a cink(II)ionokhoz képest nagyobb stabilitású komplexek kialakulásának nem meglepő következménye. Az, hogy az imidazol-nitrogének deprotonálódásának tartományában a titrálási görbe meredeksége kisebb cink(II)ionok jelenlétében, arra utal, hogy bár a cink(II)ionok hatására az első imidazol-nitrogén koordinációja nehezebben történik meg, ezután a további donorcsoportok könnyebben kötődnek a fémionhoz. Ez valószínűleg a cink(II)ion koordinációs geometriájának flexibilitásával magyarázható. Az ábrán az is látszik, hogy pH ~6,5 értékig a ligandum anyagmennyiségét tekintve három ekvivalens lúg fogy, tehát eddig a pontig nincs amid-nitrogén deprotonálódás. Ligandumfelesleg jelenlétében viszont lehetőség nyílik biszkomplexek kialakulására is.

Az Ac-HPHPH-NH₂ peptid titrálása során, M:L = 1:2 és 1:1 arányú réz(II)-, illetve cink(II)ionok jelenlétében is, csapadék kiválását tapasztaltuk pH ~7 körül. Ez összhangban van több

korábban vizsgált peptid cink(II)komplexeinél tapasztaltakkal. Ugyanakkor a réz(II)komplexek esetén ez azt jelenti, hogy a két prolin aminosav beépítésével sikerült megakadályozni a lépcsőzetes amid-nitrogén deprotonálódást, ellentétben a korábban vizsgált HXH típusú peptidekkel. Ez viszont csapadék képződéséhez vezetett.



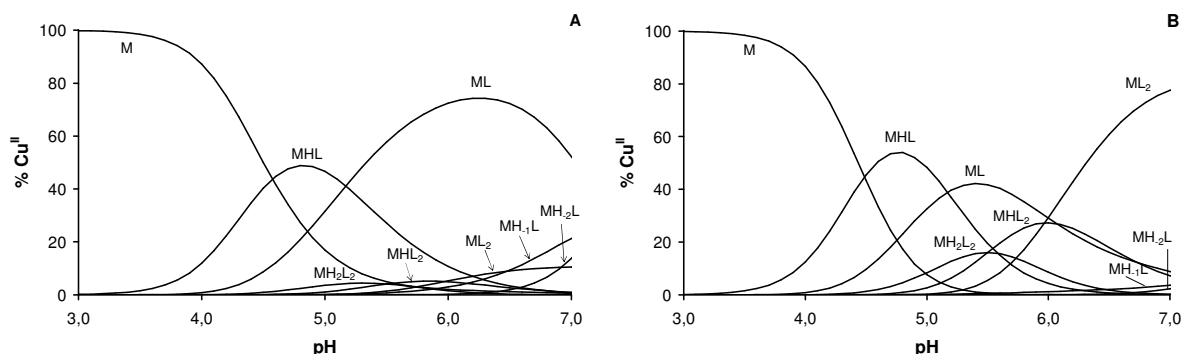
6.2.9. ábra: A ligandum anyagmennyiségére normált titrálási görbék az Ac-HPHPH-NH₂ ligandum (1), cink(II)- (2) és réz(II)ionokat (3) tartalmazó rendszerek esetén ($c_{M^{2+}} = c_L = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, $I = 0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaClO}_4$, $T = 298 \text{ K}$). A körökkel jelölt pontok a csapadékok feloldását követő újratitrálás adatai

6.2.2. táblázat: A réz(II)-Ac-HPHPH-NH₂, cink(II)-Ac-HPHPH-NH₂, illetve a réz(II)-Ac-KHPHPHQ-NH₂ és cink(II)-Ac-KHPHPHQ-NH₂ komplexek stabilitási állandói ($\log \beta$) és a számolt pK értékei ($I = 0,1 \text{ mol/dm}^3$, NaClO_4 , $T = 298 \text{ K}$)

$M_pH_rL_q$	prq	Ac-HPHPH-NH ₂		Ac-KHPHPHQ-NH ₂	
		$\log\beta_{prq}$	pK^a	$\log\beta_{prq}$	pK^a
M = Cu ²⁺					
MH ₂ L	121	–	–	22,87(2)	6,11
MHL	111	13,28(3)	5,17	16,76(3)	8,46
ML	101	8,11(2)	7,39	8,30(4)	9,65
MH ₁ L	1–11	0,72(4)	7,19	–1,35(4)	10,46
MH ₂ L	1–21	–6,47(8)	–	–11,81(3)	–
MH ₂ L ₂	122	25,00(6)	5,50	–	–
MHL ₂	112	19,50(5)	5,97	–	–
ML ₂	102	13,53(2)	–	–	–
M = Zn ²⁺					
MHL	111	10,49(3)	5,48	14,99(2)	7,73
ML	101	5,01(2)	6,71	7,26(3)	8,95
MH ₁ L	1–11	–1,70(4)	–	–1,69(2)	10,26
MH ₂ L	1–21	–	–	–11,95(3)	–
MHL ₂	112	15,47(4)	7,65	–	–
ML ₂	102	7,82(5)	–	–	–

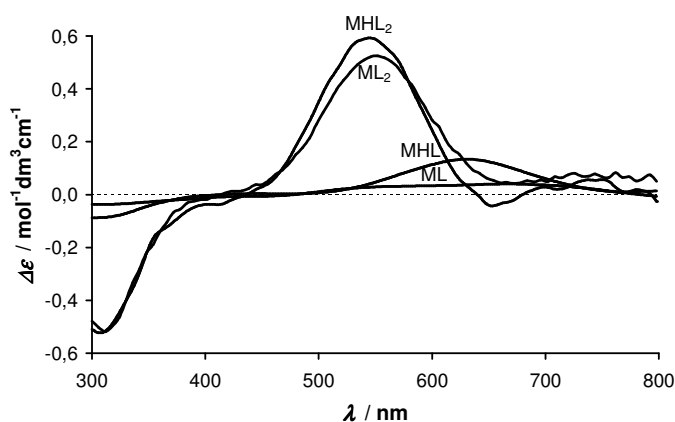
^a $pK_{prq} = \log \beta_{prq} - \log \beta_{p(r-1)q}$

A csapadék kiválást megelőző titrálási adatokból számolt stabilitási állandók értékeit az **6.2.2. táblázatban** foglaltuk össze. Ezek alapján a számolt részecskeeloszlási digramok a **6.2.10. ábrán** látható.



6.2.10. ábra: A réz(II)-Ac-HPHPH-NH₂ rendszerek részecskeeloszlási diagramjai: réz(II):L = 0,9:1, $c_L = 1,0 \times 10^{-3}$ mol/dm³ (A), réz(II):L = 0,5:1, $c_L = 1,0 \times 10^{-3}$ mol/dm³ (B) ($I = 0,1$ mol/dm³ NaClO₄, $T = 298$ K)

Az eloszlásgörbékből jól látható, hogy pH 4 – 7 tartományban a [CuHL]³⁺, illetve [CuL]²⁺ részecskék dominálnak az ekvimoláris oldatban, valamint biszkomplexek, főként [CuL₂]²⁺ képződnek jelentős mennyiségben ligandum felesleg esetén. A komplexekben megvalósuló koordinációs mód megállapításához 300 – 800 nm hullámhossz tartományban rögzítettük az oldatok CD spektrumait. Amint azt az eddigi vizsgálatainkból tudjuk, a *d-d* ámenetek hullámhossz-tartományában a deprotonálódott amid-nitrogén koordinációja általában intenzív negatív Cotton-effektust okoz. Ugyankor az oldalláncok koordinációja a tripeptidkomplexekben pozitív jelet ad. A [CuHL]³⁺ és [CuL]²⁺ részecskék moláris spektumaiból látható (**6.2.11. ábra**), hogy 600 – 680 nm tartományban a spektrum pozitív előjelű, vagyis a ligandum a teljes vizsgált pH-tartományban az oldalláncokban lévő imidazol-nitrogénjeivel koordinálódik a réz(II)ionhoz. Ezekben a komplexekben csak makrokelát-szerű koordináció valósulhat meg, amit jól tükröznek a moláris intenzitások is, melyek megközelítőleg egy nagyságrenddel kisebbek a kistagszámú kelátokra mérhető szokásos értékeknél. A CuH_xL₂ komplexek megnövekedett optikai aktivitást mutatnak.



6.2.11. ábra: A réz(II)- Ac-HPHPH-NH₂ rendszer domináns részecskéinek egyedi moláris CD spektrumai

Ezt a jelenséget a *biszhisztamintípusú* komplexekhez hasonlóan, amint azt korábban a 6.1. fejezetben láttuk, további királis hozzájárulásokkal magyarázhatjuk, ami minden bizonnyal itt is a koordinálódó imidazolgyűrűk sztérikus egymásra hatásából ered.

Hasonló következtetéseket vonhatunk le a 400 – 800 nm hullámhossz-tartományban rögzített UV/látható spektrumokból is. A **6.2.3. táblázatban** feltüntetett adatokból jól látszik, hogy a $[\text{CuHL}]^{3+}$ és $[\text{CuL}]^{2+}$ részecskék egyedi moláris spektrumaiból leolvasható λ_{max} értékek jó egyezést mutatnak a korábban meghatározott két, illetve három imidazol-nitrogén koordinációt tartalmazó réz(II)komplexek hasonló adataival. A *biszkomplexek* esetén tapasztalt nagy eltérés a mért és négy ekvatoriális imidazol-nitrogén feltételezésével számolt λ_{max} értékek között a geometria jelentős torzulásának, valamint a négy ekvatoriális donatorom mellett, az axiálisan koordinálódó donorok hatására bekövetkező vörös eltolódásnak tulajdonítható [47].

6.2.3. táblázat: A réz(II)-Ac-HPHPH-NH₂ és a réz(II)-Ac-KHPHPHQ-NH₂ rendszerekben képződő részecskék egyedi moláris spektrumainak abszorpciós maximumához rendelhető λ_{max} értékei, illetve a különböző ekvatoriálisan koordinálódó donatoromok részvételével, szemiempirikus adatok alapján számolt értékek [47]

Ac-HPHPH-NH ₂	$\lambda_{\text{max, mért}}$ (nm)	Ac-KHPHPHQ-NH ₂	$\lambda_{\text{max, mért}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max, számolt}}$ (nm)	ekvatoriális koordinációs környezet
CuHL	710	CuH ₂ L	704	692	{2×N _{im} , 2×H ₂ O}
CuL	644	CuHL	640	634	{3×N _{im} , H ₂ O}
CuH ₁ L	–	CuL	592	598	{3×N _{im} , OH [–] }
CuHL ₂	675	–	–	585	{4×N _{im} }
CuL ₂	621	–	–	585	{4×N _{im} }
–		CuH ₁ L	590	598	{3×N _{im} , OH [–] }
–		CuH ₂ L	540	542	{2×N _{im} , 2×N [–] }

A stabilitási állandók összehasonlítása alapján megállapíthatjuk tehát, hogy az Ac-HPHH-NH₂ ligandumhoz képest a HH részlet HPH részletre történő cseréje a várakozásnak megfelelően valóban a stabilitás növekedését eredményezte. A csapadék kiválása ennek ellenére megtörtént. Az eloszlási diagramokon (**6.2.10. ábra**) az is jól látható, hogy a $[\text{CuL}]^{2+}$ komplex képződése után a csapadék kiválása a $[\text{CuH}_1\text{L}]^+$, illetve $[\text{CuH}_2\text{L}]^0$ összetételű részecskék mennyiségének növekedésével egyidőben jelentkezik.

A réz(II)ionok esetében a deprotonálódási folyamatok során stabilis {ImN, N[–], N[–], ImN} típusú koordinációra itt nincs lehetőség. Bármelyik hisztidin oldallánc és a tőle N-terminális irányban lévő amid-nitrogén együttes koordinációja lejátszódhat hattagú kelátgyűrű(k) kialakulása közben. Esetleg a C-terminális részen két egymás melletti amid-nitrogén koordinációja is megvalósulhat. Ezen folyamatok során sztérikus okokból imidazol-nitrogén(ek) szorul(nak) ki a koordinációs szféra ekvatoriális síkjából. Az általános tapasztalat azonban az, hogy ha ilyen részecskék alakulnak ki, nem válnak ki csapadék. Lehetőség van vegyes hidroxokomplexek képződésére, melyek oldhatósága nem megfelelő, vagy a fémion hidrolizisével a Cu(OH)₂ csapadék kiválására. A cink(II)ionok esetében általában az utóbbi

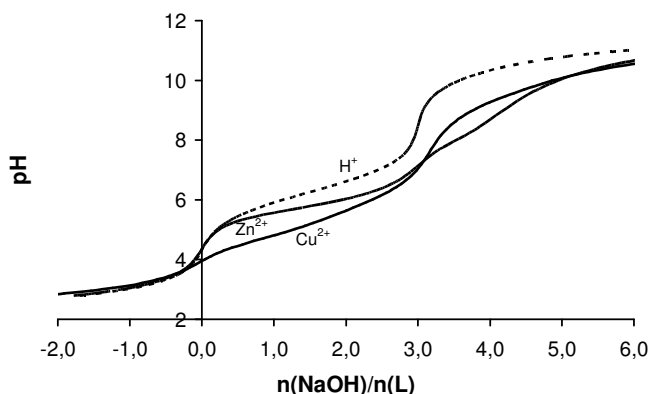
reakció lejátszódását feltételezik a komplexek kis stabilitásából kifolyólag. Mivel többféle folyamat is lejátszódhat, a további tervezés szempontjából hasznosnak tűnt meghatározni, vajon milyen összetételű a kiváló csapadék?

Annak eldöntésére tehát, hogy a csapadék képződése a réz(II)-, illetve cink(II)-hidroxid, vagy a ligandumot is tartalmazó kis oldhatóságú komplex kiválásának a következménye, a következő kísérleteket végeztük el. A réz(II)- és cink(II)-csapadékokat 0,1 mol/dm³ NaOH oldattal való leválasztás után 0,45 µm-es szűrőn leszűrtük, majd 0,1 mol/dm³ perklórsav hozzáadásával feloldva ismét megtitráltuk. A titrálási görbék alapján az eredeti ligandum mennyiségének 40–70%-át tudtuk visszanyerni a csapadék leválasztása és szűrése során. A ligandum anyagmennyiségére normált titrálási görbékét összehasonlítottuk az eredeti, szintén a ligandum anyagmennyiségére normált görbékkel (**6.2.9. ábra**). Amint az látható, az imidazol-nitrogének deprotonálódási tartományában a komplexek eredeti titrálási görbéinek fő jellegét kaptuk vissza (az ezen kívül eső tartományban a titrálási görbék alakját jelentősen befolyásolja a hígulás). Tehát a kivált csapadék mindkét esetben nagy valószínűséggel a fémionokat és a ligandumot sztöchiometrikus arányban tartalmazó, oldhatatlan vegyes-hidroxokomplexek képződéséhez rendelhető.

Az Ac-LysHisProHisProHisGln-NH₂ ligandum komplexei

A fenti eredmények azt mutatják, hogy a két prolin beépítése a HXHXH motívumban képes megakadályozni az amid-nitrogének koordinációját pH ~ 7 körül. Ugyanakkor annak ellenére, hogy a képződő vízzoldható komplexek stabilitása összevethető az Ac-HXHXH-NH₂ ligandumok hasonló komplexeinek stabilitásával, az oldatokból csapadék vált ki. Ezért a HPHPH szekvencia megtartása mellett, a következő lépésben megpróbáltuk a komplexek oldhatóságát megnövelni, az N- és a C-terminális részekre kapcsolt két poláros aminosavval. Az előállított új peptidben a semleges közegben még protonált állapotban lévő lizin oldalláncán lévő ε-aminocsoport, illetve a hidrofil glutamin oldallánca hozzásegíthet e cél megvalósulásához. Emellett a Gln oldallánci karboxamidcsoportja, illetve az ε-NH₂ csoport az általunk vizsgált pH tartományban várhatóan nem vagy csak gyengén koordinálódik a fémionhoz. Az Ac-KHPHPHQ-NH₂ szekvenciájában a Lys aminosav beépítése az oldhatóság növelése mellett a katalitikus tulajdonságok szempontjából is előnyös lehet, elősegítheti ugyanis a negatív töltésű szubsztátok, mint például a DNS és a komplex kölcsönhatását.

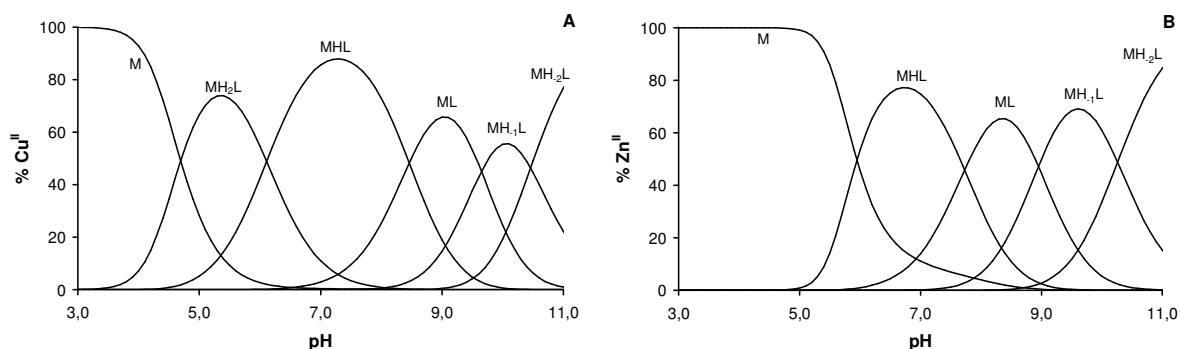
A várakozásainknak megfelelően a heptapeptid réz(II)- és cink(II)ionok jelenlétében képződő komplexei is a teljes vizsgált pH tartományban (pH 2 – 11) oldatban maradtak. A titrálási görbék az Ac-HPHPH-NH₂ pentapeptidhez hasonlóan alakultak – a ligandum mellett – a fémionokat tartalmazó rendszerekben is (**6.2.12. ábra**), ami alapján ezekben az esetekben is az előzőhöz hasonló koordinációs módot valószínűsítjük pH ~7-ig. A cink(II)ion-tartalmú rendszerekben, a kisebb stabilitású komplexek képződése miatt, az első imidazol-nitrogén koordinációja nagyobb pH-n játszódik le, vagyis nehezebben történik meg, mint a réz(II)ionok jelenlétében, de ezt követően a további deprotonálódások szűkebb pH tartományban játszódnak le.



6.2.12. ábra: A ligandum anyagmennyiségére normált titrálási görbék az Ac-KHPHPHQ-NH₂ ligandum, illetve cink(II)- és réz(II)ionokat tartalmazó rendszerek esetén ($c_{M^{2+}} = c_L = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, $I = 0,1 \text{ mol/dm}^3$ NaClO₄, $T = 298 \text{ K}$)

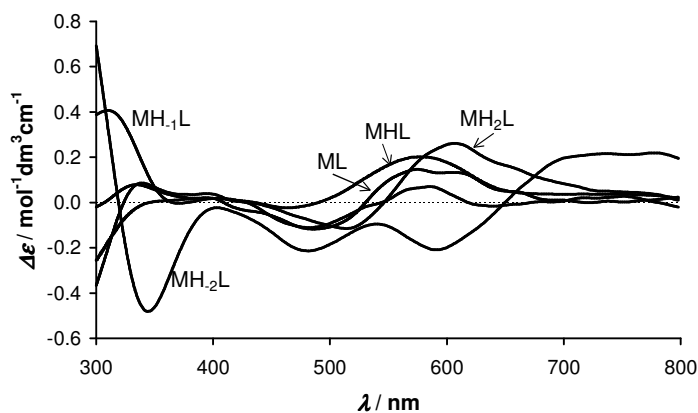
A titrálási görbékéből meghatározott stabilitási állandókat a **6.2.2. táblázatban** összegeztük. Az MH_xL részecskék $\log\beta_{prq}$ értékeinek a pentapeptiddel való összehasonlításakor azonban figyelembe kell vennünk, hogy a két peptid különböző protonáltsági állapotban van egész addig, amíg a lizin oldallánci aminos csoportja protonált. Az ε-NH₂ csoport magas pK értékének és gyenge kelátképző tulajdonságának ismeretében azt valószínűsítettük, hogy a lizin aminosav nem fogja jelentősen befolyásolni a képződő komplexek stabilitását. Ezzel szemben, a **6.2.2. táblázatban** szereplő adatok, illetve hasonló, védett peptidek réz(II)- és cink(II)komplexienek [90,92,93,95,97,134,135] stabilitási állandóit összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a heptapeptid MHL (M = Cu vagy Zn) komplexei kevésbé stabilak. Az Ac-HPHPH-NH₂ komplexeivel való összehasonlításhoz az Ac-KHPHPHQ-NH₂ esetén a $\log K = 6,56$ (M = Cu), illetve $4,79$ (M = Zn) értékeket kell összevetnünk a pentapeptid $\log\beta_{ML}$ értékeivel ($\log K = \log\beta_{111-pK_4}$). A kisebb stabilitásra magyarázat lehet a lizin oldallánci pozitív töltése és a szintén pozitív fémion közti taszítás [63,103,136], ami jelen esetben még kifejezettebb lehet a két prolin eredményezte merevebb szerkezet miatt.

A réz(II)ionok jelenlétében kialakuló komplexek eloszlási diagramján (**6.2.13.A. ábra**) jól látható, hogy a komplexképződés pH ~ 4 körül kezdődik a két imidazol-nitrogén koordinációt tartalmazó [CuH₂L]⁴⁺ részecske kialakulásával. A pH ~ 7 körüli tartományban a [CuHL]³⁺ részecske dominál {3×ImN} koordinációval, amit bizonyítanak a d-d átmenetek tartományában rögzített CD és UV/látható spektrumok. A pentapeptid réz(II)komplexeihez hasonlóan, itt is a flexibilis makrokelátokra jellemző kis intenzitású CD jeleket (**6.2.14. ábra**), és a szemiempirikus úton számolt $\lambda_{\max}$ értékekhez hasonló adatokhoz jutottunk a részecskék egyedi spektrumaiból (**6.2.3. táblázat**).



6.2.13. ábra: A $\text{Cu(II)-Ac-KHPHPHQ-NH}_2$ (A) és $\text{Zn(II)-Ac-KHPHPHQ-NH}_2$ (B) komplexek részecskeeloszlási diagramjai, $M:L = 1:1$, $c_{M^{2+}} = 0,0010 \text{ mol/dm}^3$, $I = 0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaClO}_4$, $T = 298 \text{ K}$

A következő deprotonálódási folyamat ($[\text{CuHL}]^{3+} = [\text{CuL}]^{2+} + \text{H}^+$) 8,46-os pK értéke nem egyezik meg a szabad ligandum lizin oldallánci csoportjának deprotonálódásával, így ez a lépés valószínűleg egy a fémionhoz koordinálódott vízmolekula protonjának távozását jelenti. Annak bizonyítására, hogy itt valóban vegyes hidroxokomplex kialakulásáról és nem amid-nitrogén deprotonálódásról van szó, megvizsgáltuk a kialakuló komplexek 300 – 800 nm hullámhossz tartományban kialakuló UV/látható- (6.2.3. táblázat) és CD spektrumait (6.2.14. ábra). Amint az látható, a $[\text{CuL}]^{2+}$ részecske kialakulása nem eredményezett jelentős CD változást, és az abszorpciós spektrum λ_{max} értéke is jó egyezést mutat a $\{3 \times \text{ImN}, 1 \times \text{OH}^-\}$ koordinációs környezetre számolt értékkel.

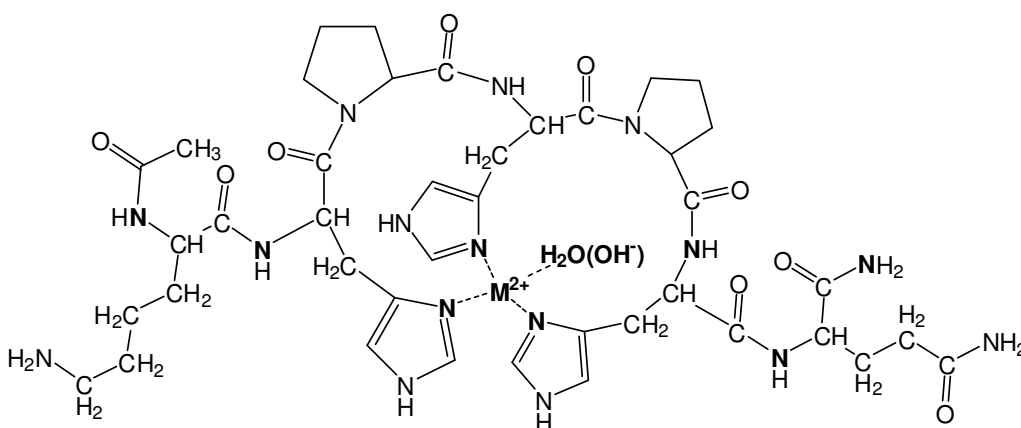


6.2.14. ábra: A $\text{réz(II)-Ac-KHPHPHQ-NH}_2$ rendszer domináns részecskéinek egyedi moláris CD spektrumai

A spektrális paramétereket figyelembe véve, a következő, $[\text{CuHL}_1\text{L}]^+$ részecske kialakulása tartozó 9,65-ös pK érték a lizin deprotonálódáshoz rendelhető. Ebben a folyamatban az abszorpciós spektrumokban nem látunk számottevő változást, és a CD jelek sem utalnak amid-nitrogén koordinációra. Az előző három részecskétől különböző, az UV tartományban tapasztalt pozitív CD jel a lizin gyenge koordinációjára utalhat, de eredményezheti ezt például hidrogénkötés vagy egyéb, szterikus okokból kialakuló intramolekuláris kölcsönhatás is.

A következő deprotonálódás $\text{pH} \sim 10$ körül játszódik le a $[\text{CuHL}_1\text{L}]^+ = [\text{CuHL}_2\text{L}]^0 + \text{H}^+$ lépésben. Az új részecske képződésével párhuzamosan jelentősen megváltozik az UV/látható spektrumok alakja, a

kék eltolódás a réz(II)ion körüli ligandum tér növekedésének a következménye. A CD spektrumon a 350 nm körül megjelenő negatív csúcs is az amid-nitrogén koordinációját bizonyítja. Azonban a CD spektrum alakja és kis intenzitása arra utal, hogy ebben a pH tartományban több izomer van jelen. A $[\text{CuH}_2\text{L}]^0$ részecske abszorpciós spektrumából számolt $\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$ egy $\{2 \times \text{ImN}, 2 \times \text{N}^-\}$ koordinációs környezetre utal, ami a fémion körüli ekvatoriális sík jelentős változásával jár, egy imidazol-nitrogén és a hidroxidion kiszorulásával egyidőben. A rendelkezésünkre álló adatokból nem tudjuk pontosan meghatározni, hogy mely amid-nitrogének koordinációja történik meg, a lehetséges donoratomokat a **6.2.15. ábrán** félkövér betűkkel jelöltük.



6.2.15. ábra: A $\{3 \times \text{ImN}\}$ koordinációt tartalmazó Ac-KHPHPHQ-NH₂ komplexek sematikus ábrája. Az N- és C-terminális végen levő amid-nitrogéneket, melyek lúgos pH tartományban a fémionhoz koordinálódhatnak félkövér betűkkel jelöltük

Ellentétben az Ac-HPHPH-NH₂ réz(II)- és cink(II)komplexeivel, a heptapeptid esetén nem tapasztaltunk jelentős biszkomplex képződést, ami az $\epsilon\text{-NH}_2$ csoport pozitív töltésének tasztításából és sztérikus okokból eredhet.

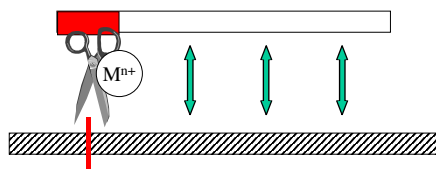
Érdemes viszont megjegyezni, hogy bár az imidazol-nitrogénnel kevésbé stabil cink(II)komplex alakul ki a heptapeptid esetén is, mint réz(II)ionok jelenlétében, addig a további deprotonálódási folyamatok a cink(II)ionok hatására kisebb pH-n mennek végbe (**6.2.12. ábra**). Ez jól látható akkor is, ha összehasonlítjuk a $[\text{ZnHL}]^{3+}$ és $[\text{ZnL}]^{2+}$ komplexek pK értékeit a megfelelő réz(II)komplexekek adataival. Ez igen biztató a hidrolitikus aktivitás szempontjából, hiszen itt már $\text{pH} \sim 7$ felett $[\text{ZnHL}(\text{OH})]^{2+}$ összetétellel jellemezhető, vegyes hidroxokomplex alakul ki, amint azt az eloszlási diagram (**6.2.13.B. ábra**) is mutatja. Ezenkívül a $[\text{ZnH}_1\text{L}] = [\text{ZnH}_2\text{L}] + \text{H}^+$ reakcióban képződő részecske $pK = 10,26$ értéke a lizin ϵ -oldallánci csoportjának deprotonálódáshoz rendelhető, ami azt jelenti, hogy a cink(II)iont tartalmazó rendszerekben nagy valószínűséggel nem fordul elő amid-nitrogén deprotonálódás.

6.3. Fehérjék fémkötő helyeinek modellezése a P20 és P24 oligopeptidek segítségével

Az eddigiek során csak kis tagszámú peptidek vizsgálatára láttunk példákat, viszont napjainkban a fehérjék tervezése és szintézise igen gyorsan fejlődő kutatási terület lett, melynek célja előre megjósolható szerkezetű és funkciójú proteinek szintézise. Az ilyen kutatások lehetőséget nyújtanak fémionkötőhelyek tervezésére egy fehérjén belül. Ily módon, például mesterséges metallonukleáz enzimeket állíthatunk elő, melyek jelentőségét igazolják ígéretes felhasználási lehetőségeik, mint a génspecifikus (kemo)terápia, az antivírus oltóanyagok kifejlesztése, illetve olyan betegségek gyógyítása, amelyek genetikai okok miatt a szervezetre veszélyes fehérjék képződésével járnak. Mindezek alapvető feltétele a megfelelő bázisszelektivitással rendelkező új restriktív enzimek előállítása [137].

Kutatásaink során olyan mesterséges metalloenzimek előállítását terveztük, melyek alkalmasak lehetnek a DNS, RNS vagy foszforilált fehérjemolekulák foszfodiészter kötéseinek katalitikus hidrolízisére, első közelítésben nem-specifikus módon. A cél nem csak a szintetikus hidrolázok előállítása, hanem az is, hogy a mesterséges enzimeken keresztül megértsük a természetes enzimek működését és a bennük található fémionok szerepét.

A koordinációs kémiai ismeretek alapján megtervezett kis tagszámú peptidek katalitikus aktivitásvizsgálata néha nehézségekbe ütközik, mint ahogy azt az irodalmi összefoglaló és az előző kísérleti leírásokból is láthattuk. A korábbi problémák mellett további hátrányt jelenthet, hogy esetenként az oligopeptidek fémkomplexei kinetikailag és termodinamikailag nem elég stabilak, így *in vitro* akár a szubsztrát is elvonhatja a fémionokat a komplexunktől. Bár a réz(II)ion jó komplexképző, hátrány lehet a hidrolitikus aktivitás vizsgálatoknál, hogy redoxifolyamatokban is részt vehet. Ilyen megfontolás alapján a cink(II)ion lenne a megfelelőbb választás, ez viszont mint láttuk, pH 7 körül könnyen hidrolizált. Tény az is, hogy a kis aminosavszerű egységű peptidkomplexekkel szemben a természetes enzimek aktív centrumában általában több fémion található. Mivel egyes enzimek, illetve a ma ismert modellvegyületek közül a leghatékonyabbak két- vagy többmagvú fémcentrumot tartalmaznak, ezért célkitűzéseink között szerepelt, hogy egy 20 – 24 aminosavból álló, stabil gerinckonformáció kialakítására és két fémion megkötésére alkalmas peptidet állítsunk elő. A későbbiekben, amennyiben sikerül katalitikus aktivitást mutató peptidkomplexet előállítanunk, lehetőségünk nyílna a molekulából szubsztrát- és szekvencia-specifikus mesterséges nukleáz előállítani úgy, hogy az oligopeptid részletet a nukleinsavak helyspecifikus megkötésére képes másik molekulához csatoljuk. Ez az elképzelés az eddigi vizsgálatok alapján – melyek azt mutatják, hogy a természetes enzimek egy részénél külön rész felelős a szubsztrát specifikus megkötéséért, és egy másik rész a hidrolitikus aktivitásért – működőképes lehet. A nukleáz aktivitással rendelkező mesterséges enzimben tehát a peptid fémkomplexe lenne a funkcionális egység, míg, például egy fehérje domén lenne felelős a szubsztrátspecifikusságért (6.3.1. séma). Mindez azért valószínű, mert módosított, illetve ún. fúziós fehérjék manapság már rutinszerűen és viszonylag olcsón állíthatók elő a molekuláris biológia eszközeinek felhasználásával. Ez mutatja a peptidtípusú modellvegyületek nagy előnyét a szintetikus modellekkel szemben.



6.3.1. séma: A fúziós fehérje alapú mesterséges nukleázok sematikus ábrája

Munkánk során a fémtartalmú foszforsavészter hidrolízist végző enzimek közül a bíforsav-foszfataáz (BSF) enzimesalád aktív központjának modellezésével szeretnénk mesterséges nukleáz enzimeket utánozó vegyületeket előállítani. A bíforsav-foszfataázokban kialakult fémionkötő hely a különböző élő szervezetekben igen jónak bizonyult, az evolúció során nagyon hosszú idő óta változatlanul megmaradt. Az irodalmi összefoglalóban (3.1.2. fejezet) részletesebben bemutatott BSF enzimek aktív központjában két fémion található: Fe^{III} és M^{II} (például Zn^{II}). Az elfogadott mechanizmus szerint [24] az M^{II} felelős a szubsztrát megkötéséért, a vas(III)ion pedig a nukleofil támadó csoportot generálja. Ez kitűnően mutatja a fémionok együttműködő szerepét a katalitikus reakció során.

A természetes BSF enzimek aktív központja alapján, egy cseh együttműködés keretén belül, molekuladinamikai számításokkal [138–140] megterveztünk néhány olyan peptidet, amelyek képesek a két fémion (Fe^{III} és Zn^{II}) megkötésére.

A tervezett *P20*-nak nevezett peptid szekvenciája (egybetűs aminosav jelöléssel): YKDPPTDHLDDQRVLDLPHHN, a *P24*-é pedig: DPPQVPHLYGLFQINDTVHGCCCHN. Mivel az ilyen nagy tagszámú peptidek SPPS-sel történő előállítása elég költséges és nehézkes, ezért első lépésként mikrobiológiai eszközöket használtunk, a kísérleti módszereknél leírtaknak megfelelően. Rekombináns DNS technológiát alkalmazva állítottuk elő a tervezett peptideket, vagyis a plazmid vektorba beépített peptid génjét, baktériumokba juttatva kifejeztük. Az alkalmazott plazmid a peptid N-terminális vége felől a Glutathion S-transzferáz (GST) génjét is tartalmazta, így a két molekula összefűzve, fúziós fehérjeként fejeződött ki.

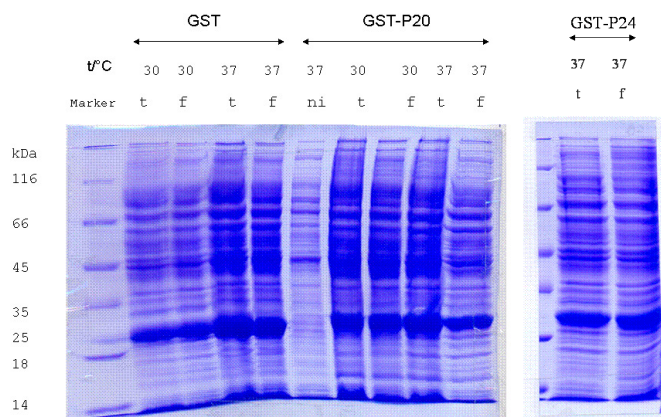
A GST enzimesalád tagjai a természetben széleskörben elterjedtek. A GST (*Schistosoma japonicum*-ból izolált (*SjGST*), 26 kDa körüli molekulatömegű fehérje) a molekuláris biológiában jól ismert „gén-fúziós rendszer”, amely egy sokoldalú és széles körben használt eszköz. Megkönnyíti a hozzá fűzött peptid génjéből annak az *E. coli* baktériumban történő kifejezését, valamint a fúziós fehérje tisztítását és kimutatását is. A baktériumban történő kifejezésekor a GST a C-terminális végéhez fűzött peptid jelenlétében is megőrzi az enzimatis aktivitását [141–143]. Ez azért fontos, mert a szubsztrát megkötésének képességét kihasználva a fúziós fehérje tisztítása szerencsés esetben egy affinitás kromatográfiás módszerrel egyetlen lépésben megoldható. A fuzionált peptidmolekula tömege, a GST tömegével megnövekszik, ami megkönnyíti a kisméretű polipeptidek detektálását poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE). Fontos még megemlíteni, hogy a célfehérjék vagy peptidek szerkezetét, illetve funkcióját az esetek többségében a fúziós GST nem befolyásolja, a C-terminális vég meglehetősen szabadon áll, így a hozzá fűzött peptid valószínűleg hozzáférhető lesz a fémionok számára. Ezenkívül a GST a természetes formájához hasonlóan, fúziós fehérjeként is alkothat dimereket, ami azért lehet fontos, mert a DNS-láncok foszfátészter kötéseit hidrolizáló nukleáz enzimek többsége is

dimerként működik. A GST dimerben a C-terminális végek egy irányba mutatnak, ami elősegítheti a hozzá fűzött peptidnek a kettős szálú DNS-hez való kötődését (GST kristályszerkezetét a *Függelékben* mutatjuk be). Emellett a GST fúziós rendszert alkalmazzák metalloproteinek vizsgálatára is, ugyanis a megfigyelések szerint a GST elősegítheti a fémionok beépülését a fehérjékbe.

6.3.1. A GST-P20 és GST-P24 fúziós fehérjék előállítása

A P20 illetve P24 peptidok fúziós fehérjeként történő előállításához szükséges plazmidok megtervezése és előállítása nemzetközi (japán) együttműködés keretében történt. Ennek során olyan DNS szekvenciát állítottak elő, amely kódolta a megtervezett peptid aminosav-sorrendjét. A pGEX-6P-nek nevezett, általuk használt plazmid vektor tartalmazta a GST fehérje génjét, olyan formában, hogy annak C-terminális végéhez lehetett fűzni (klónozni) a polimeráz láncreakcióval (PCR) előállított célpeptidok génjeit. Az így előállított plazmidokat azután baktériumokba juttattuk, mivel így egyszerűen és gyorsan termeltethető a fúziós fehérje, hiszen csak megfelelő tápanyagra van szükség a baktériumok szaporodásához.

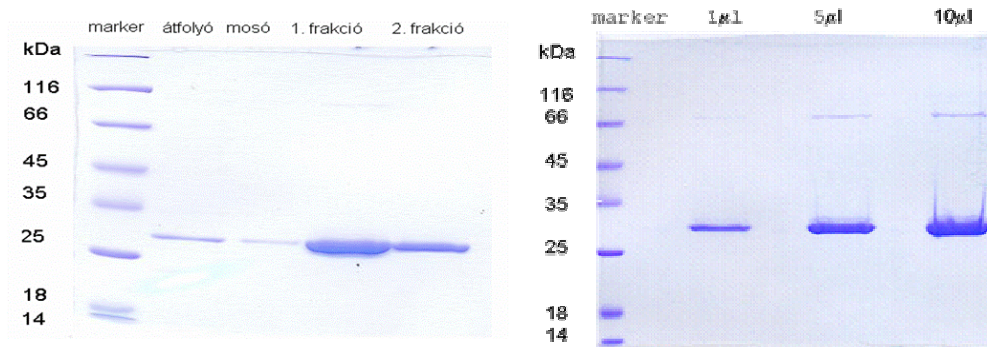
A **6.3.1. ábrán** jól látható a különböző kísérleti körülmények között kifejezett, poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) segítségével detektált fehérjék sokasága, melyet a baktériumok termeltek. Ismert molekulatömegű fehérjéket tartalmazó fehérjemarker segítségével azonosítható a megfelelő zsebekben a GST-P20, a maga 30512 Da tömegével (261 aminosav), a GST-P24, melynek molekulatömege 30806 Da (265 aminosav), illetve a jelen esetben (pozitív) kontrollként használt GST fehérje is (M_r = 28430 Da, 244 aminosav).



6.3.1. ábra: SDS-PAGE: GST, GST-P20, illetve GST-P24 fehérjék azonosítása; a rövidítések jelentése: t = teljes fehérje tartalom, f = felülúszó, vízzoldható frakció, ni = nem indukált baktériumok fehérje oldata

Miután a kísérleti módszereknél leírtak szerint optimalizáltuk az előállítás körülményeit, a fehérjéket két lépésben tisztítottuk. A vízzoldható frakciót első lépésként, az affinitás oszlop védelme érdekében, egy kationcserélő dietil-amino-etil-cellulóz (DEAE) oszlopon engedték át, melyről gradiens elúcióval mostuk le, növekvő NaCl sóoldatot használva. A célfehérjében dúsított oldatot ezután GST-affinitás kromatográfia segítségével tisztítottuk. Ennek eredményét láthatjuk a következő SDS-PAGE gél fotóján (**6.3.2. ábra**). A tisztított fehérje növekvő mennyiségének elektroforézise is igazolta a fehérje

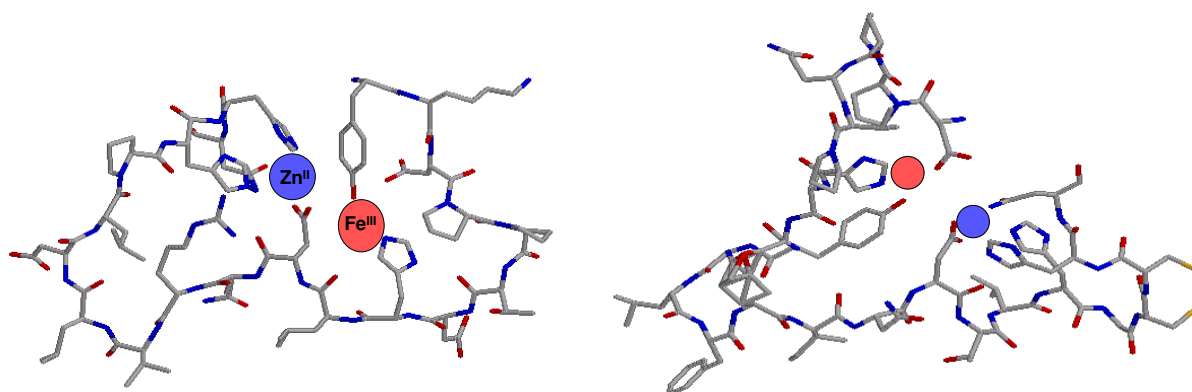
tisztaságát. A tisztítás eredményeként sikeresen előállítottunk első alkalommal 2,2 mg GST-P20 fehérjét, majd optimalizálás után 30 mg GST-P20-at, illetve 10 mg GST-P24-et.



6.3.2. ábra: A baloldalon a GST-P20 affinitáskromatográfiás tisztítását követő SDS-PAGE gél fényképe látható; az oszlopon megkötődött a fehérje, amit redukált glutationnal lehetett eluálni; a tiszta fehérjét az 1. és 2. frakciók összegyűjtésével nyertük. A jobb oldali képen a GST-P20 fehérjét látjuk növekvő koncentrációban SDS-PAGE gélen

6.3.2. A GST-P20 és GST-P24 fúziós fehérje fémkötő tulajdonságai

A természetes enzim aktív központjának analógiájára, az általunk tervezett peptidben található koordinálódó oldallánci donorcsoportokat tartalmazó aminosavak közül várhatóan egy Tyr, egy His és egy Asp koordinálódhat a vas(III)ionhoz, míg egy Asn és további két His a cink(II)ionhoz. A két fémion közti híd szerepét egy Asp karboxilcsoportja játszhatja, amint ez a **6.3.3. ábrán** is látható.

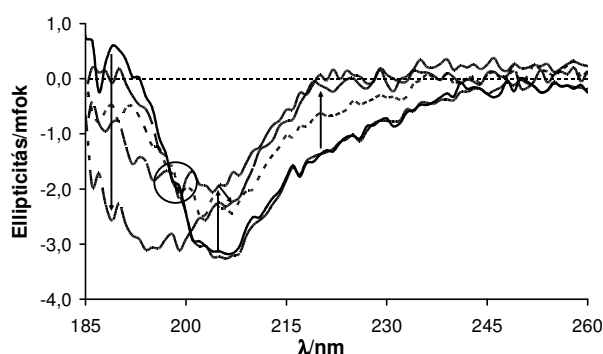


6.3.3. ábra: A bal oldali ábrán a P20, a jobb oldali ábrán a P24 peptid feltételezett szerkezete látható

Az előállított fehérjék fémkötő tulajdonságainak vizsgálatát cirkuláris dikroizmus spektroszkópia segítségével, részecskegyorsítóban előállított UV sugárnyalábbal végeztük (SRCD). A távoli UV hullámhossz-tartományban a víz elnyelése már a kereskedelmi CD spektroszkópokban szokásos 1-2 mm-es küvettákban jelentőssé válik. Ezért az elérhető legkisebb hullámhossz 200 nm körül van, és emiatt esetenként az informatív nagy intenzitású fehérjesávok nem láthatóak a színeképekben. Kisebb úthosszak esetében ($l < 0,1$ mm) pedig a fehérjekoncentrációt kellene növelni, ami a kis mennyiségben kifejezhető, vagy megnövelt fehérjekoncentráció esetén aggregálódáshoz vezető fehérjék esetében nem kivitelezhető. A szinkrotron sugárzás során keletkező nagy fluxusú sugárnyaláb lehetővé teszi igen kis koncentrációban lévő fehérjék távoli UV tartományban történő vizsgálatát is nagyobb

úthossz elérését biztosító küvetta használatával [110]. Kísérleteinkben $l = 0,5$ mm küvetát alkalmaztunk, melyben a fehérjekoncentráció $0,05 - 0,1$ mg/cm³ volt.

A **6.3.4. ábrán** a GST-P20 fehérje CD spektrumának változása látható feleslegben alkalmazott cink(II)ionok hatására. Megfigyelhető, hogy kis fémion:ligandum arány esetén egy izodikroikus ponton mennek át a spektrumok 198 nm körül (az ábrán egy körrel kiemelve), ami két részecske közti egyensúlyi folyamatra utal. Feltételezésünk szerint ezek a szabad fehérje és annak fémkomplexe. A peptidrész és a cink(II)ionok között kialakuló koordinatív kötés okozhatja a kismértékű szerkezetváltozást. Az ábrán a nyilak mutatják a cink(II)ionok növekvő koncentrációja során bekövetkező változások irányát.

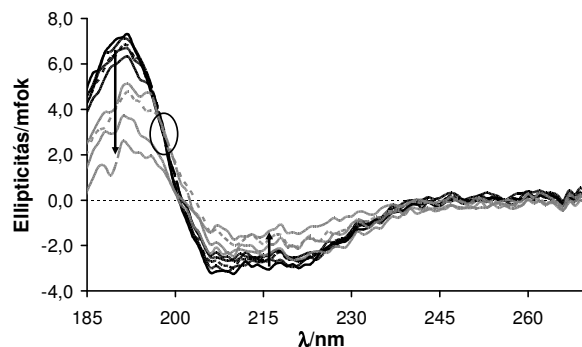


6.3.4. ábra: A GST-P20 fehérje SRCD spektrumai cink(II)ionok távollétében, illetve a fémion növekvő koncentrációja (az ábrán nyilak szemléltetik) mellett. A Zn^{II}:GST-P20 mólarányok a következők voltak: 0:1 (telvonal), 2:1, 4:1, 8:1, 16:1, 32:1

A cink(II)ionok mennyiségének további növelése során drámaian megváltozik a CD spektrumok alakja, ami egy másik folyamat, egy nem-specifikus elektrosztatikus kölcsönhatás, illetve ennek hatására bekövetkező denaturálódás eredménye lehet. Az előzőhöz igen hasonló eredményt mutatott a vas(III)ionokkal megismételt mérésorozat is. Azt is meg kell említenünk, hogy a különböző körülmények között előállított fehérjék CD jelei mutattak különbséget (például a dialízis ellenére esetlegesen jelenlevő glutation, ami a GST szubsztrátjaként hozzákötődik a fehérjéhez, befolyásolhatja annak szerkezetét). Bár emiatt esetenként eltérő konformációt mutatott a fehérje, de a fémkötés minden esetben nagyon hasonló spektrális változást eredményezett.

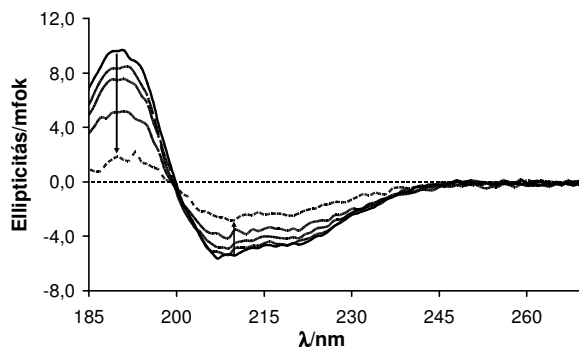
Ezt mutatja a GST-P24 cink(II)- és vas(III)ionok hatására bekövetkező szerkezeti változása is, amit az előzőekhez hasonlóan SRCD spektroszkópia segítségével próbáltuk nyomon követni. Az első előállítás során nagyobb mennyiségben sikerült ezt a fehérjét kifejezni, így a vizsgált rendszerben a GST-P24 koncentrációja $0,1$ mg/cm³ volt. Ebben az esetben is megfigyelhető az izodikroikus pont, majd az előzőekhez hasonlóan nagy cink(II)ion feleslegnél csökkenő intenzitást tapasztaltunk, azaz csökkent a fehérje rendezettsége, ami nem-specifikus kölcsönhatásokra, illetve denaturálódásra utal (**6.3.5. ábra**).

Felmerült a kérdés, hogy önmagában a GST fehérje, a fémkötésre tervezett C-terminális végen levő peptidrész nélkül, mutat-e hasonló viselkedést? Ennek eldöntése érdekében a rendelkezésünkre álló pGEX-6P plazmidból előállítottuk és megtisztítottuk, a fúziós fehérjékhez hasonló módon, a GST-t is.



6.3.5. ábra: A GST-P24 fehérje SRCD spektrumai cink(II)ionok távollétében, illetve a fémion növekvő koncentrációja (az ábrán nyilak szemléltetik) mellett. A $\text{Zn}^{\text{II}}:\text{GST-P24}$ molarányok a következők voltak: 0:1 (telvonal); 2,2:1; 5,2:1; 10:1; 18:1; 36:1; 60:1; 200:1; 1000:1

Amint az a **6.3.1. ábrán** is látható, 37°C hőmérsékleten, a kísérleti részben leírt körülmények között, önmagában a GST fehérje is nagy mennyiségben kifejezhető. Az eddigiekben alkalmazott kísérleti körülmények között CD méréseket végeztünk a tisztított GST fehérjével is. A spektrumok azt mutatták, hogy a fémion koncentrációjának folyamatos növelésével a CD jelek intenzitása változatlan jelalak mellett folyamatosan csökkent. Tehát itt csak nem-specifikus, elektrosztatikus fémion-ligandum kölcsönhatásról beszélhetünk, melynek végső szakaszában bekövetkezik a fehérje denaturálódása. A fémion kis feleslegének hozzáadása során itt nem figyelhető meg a fentiekhez hasonló kezdeti egyensúlyi folyamat. A spektrumok a zéruspontban metszik egymást, ami nem jelent izodikroikus pontot. A **6.3.6. ábrán** a nyilak a cink(II)ionok növekvő koncentrációját mutatják.

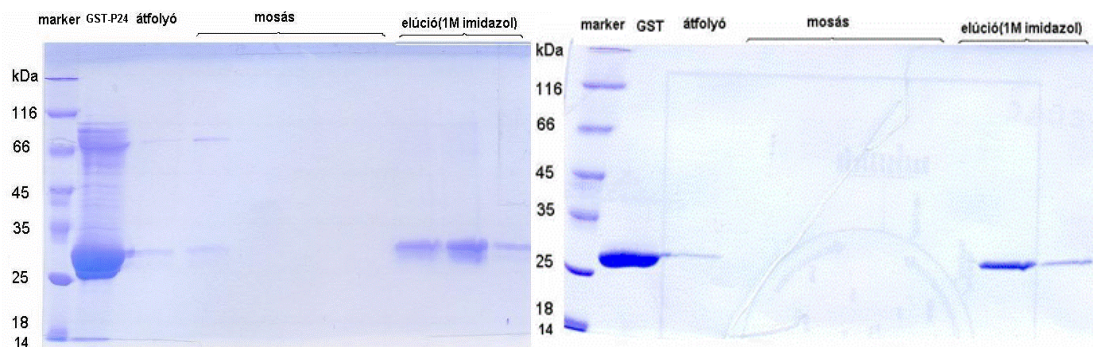


6.3.6. ábra: A GST fehérje SRCD spektrumai cink(II)ionok távollétében, illetve növekvő koncentrációja (az ábrán nyilak szemléltetik) mellett. A $\text{Zn}^{\text{II}}:\text{GST}$ molarányok a következők voltak: 0:1 (telvonal), 2:1, 10:1, 21:1, 500:1

A fentiek alapján megállapíthatjuk, hogy nagy valószínűséggel a C-terminális részhez fűzött oligopeptidok biztosították a fúziós a fehérje koordinatív fémkötő tulajdonságát.

A fúziós fehérjék fémkötésének további vizsgálatához Ni-affinitás kromatográfiát választottunk. Ez a módszer a multihisztidin-tartalmú fehérjék nikkel(II)ion koordinációján alapuló specifikus elválasztási módszer, melyet a molekuláris biológiában elterjedten alkalmaznak fehérjetisztításra. Amennyiben az általunk előállított GST-fúziós fehérjék képesek az oszlopon lévő nikkelionokhoz kötődni, a módszert a fémkötő tulajdonság bizonyítására is használhatjuk. A GST-P24 fehérjével végzett

kísérlet frakcióinak poliakrilamidgélén történő vizsgálata alapján látható (**6.3.7. ábra**), hogy a Ni-affinitás gyantán a fehérje megkötődik. Az átfolyó frakciókban nem detektáltunk fehérjét, míg az imidazzal végzett elúció során (a Ni-affinitás oszlop gyártójának leírása alapján az imidazol leszorítja a koordinálódó fehérjéket az oszlopról) a GST-P24 fehérjét a három azonos térfogatú elúciós frakció közül a másodikban detektáltuk legnagyobb koncentrációban. Ez a kísérlet azonban még nem bizonyítja kizárólagosan a peptid fémkötő tulajdonságát. Ezért ahogyan azt a CD vizsgálatoknál tettük, a kísérletet elvégeztük a fúziós rész nélküli GST fehérjével is az előzőekkel azonos körülmények között. Azt tapasztaltuk, hogy a GST a peptid rész nélkül is megkötődött az oszlopon, bár itt az első elúciós frakcióban találtuk a legtöbb fehérjét. Tehát a GST ugyan kevésbé erősen, de a fémionokhoz kötődik, ami jelentősen megnehezíti a fémion-kötés kvantitatív jellemzését. A GST aminosav-szekvenciája és töltéseloszlása nem utalt arra, hogy a fémionokhoz ennyire hatékonyan kötődhet, de a Protein Data Bank honlapjáról letölthető *pdb* fájlok, valamint kvantummechanikai számítások alapján feltételezhető, hogy a nagy felületi elektronsűrűség miatt alakít ki elektrosztatikus kölcsönhatást a fémionokkal.

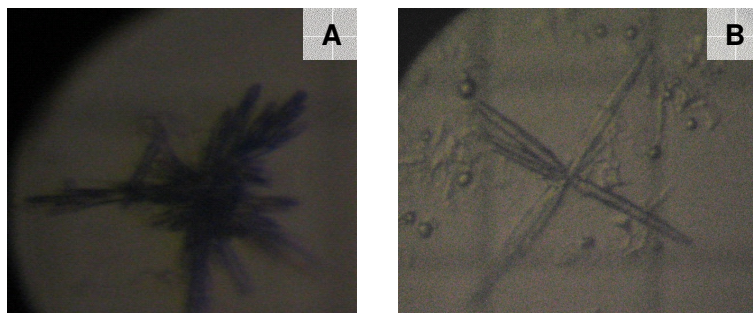


6.3.7. ábra: SDS-PAGE a Ni-affinitás kromatográfiáról. A bal oldali képen a GST-P24, a jobb oldali képen pedig a GST fehérje megkötődése, majd imidazol hatására történő elúciója látható

6.3.3. A GST-P20 fúziós fehérje kristályosítása

A fúziós fehérje szerkezetének, ezen belül a peptid elhelyezkedésének és fémionkötő tulajdonságainak további vizsgálata céljából megpróbálkoztunk a fehérjék kristályosításával. A GST-P20 fúziós fehérje kristályosítási kísérleteit a Dán Műszaki Egyetem (DTU, Lyngby) laboratóriumában végeztem. A kísérletsorozat első lépéseként a Molecular Dimensions Ltd. cég által forgalmazott, a különböző kísérleti paraméterek szűrőpróbaszerű változtatására kifejlesztett „Structure Screen MD1-01” készletet használtuk, amellyel a kicsapószer, a puffer és a sóoldat minőségét és koncentrációját változtattuk, hogy minél szélesebb körű információt kapjunk a GST-P20 fehérje viselkedéséről [144]. Ezt követően főként a fehérje oldhatósági profiljára vonatkozó további információk gyűjtéséhez a fent említett cég „Solubility Tool Kit, MD1-17 és MD1-18” készleteit használtuk, két pH-n, egyik a fehérje elméleti pI értéke alatt, a másik e fölött (pI = 5,71, adat: www.expasy.org). A néhány hét elteltével, mikroszkóp alatt megvizsgált cseppek állapotából levont következtetések, illetve az irodalomban megjelent GST fehérjére vonatkozó kristályosítási körülmények [145] figyelembevételével a 60 % (m/m)

polietilén-glikol (PEG) és megfelelő pH-jú káliumfoszfát puffer (pH 8,0 illetve 9,0) használata tűnt a legcélravezetőbbnek a fehérje kristályosításához. Az idő rövidsége miatt a körülményeket nem sikerült teljesen optimalizálni. Az ígéretesnek tűnő, cink(II)- és vas(III)ionokat is tartalmazó kristályokkal (többek között azok, amelyek a **6.3.8. ábrán** láthatóak) a későbbiekben elemanalízist, majd amennyiben azok fehérjét is tartalmaznak, röntgendiffrakciós vizsgálatokat tervezünk.

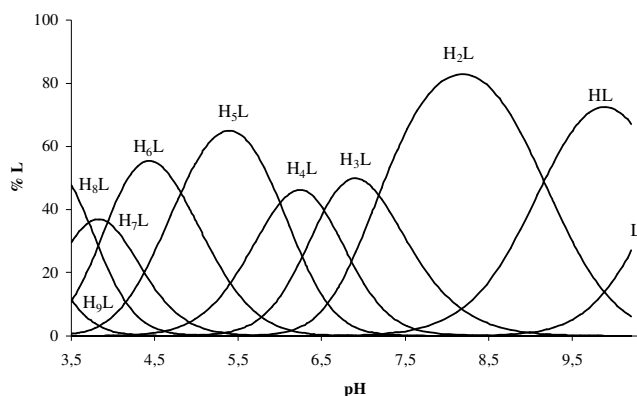


6.3.8. ábra: A GST-P20 kristályosítása során használt különböző körülmények mellett képződő kristályok; A.) 1,5 μl $c=9,5 \text{ mg/cm}^3$ GST-P20:Zn^{II}:Fe^{III} = 1:1:1 és 1,5 μl kristályosító oldat: 60 % (m/m) polietilén-glikol (végső koncentráció: 54% (m/m)) valamint KH₂PO₄/K₂HPO₄ puffer, pH 8,0; B.) 1,5 μl $c=9,5 \text{ mg/cm}^3$ GST-P20:Zn^{II} = 1:3 és 1,5 μl kristályosító oldat: 60 % (m/m) polietilén-glikol és KH₂PO₄/K₂HPO₄ puffer, pH 9,0

6.3.4. Ac-P20-NH₂ oldategyensúlyi viszonyai

Fémionok jelenlétében a GST-fúziós fehérjék és GST összehasonlítása során különbségeket tapasztaltunk az SRCD spektrumokban, illetve az affinitás kromatográfiás vizsgálatokban. Azt is megállapítottuk, azonban, hogy a nagyméretű fúziós GST fehérje zavarta az aktív központnak tervezett peptid tanulmányozására irányuló törekvéseinket. Ezért előállítottuk magát a P20 peptidet az SPPS Fmoc-stratégiájával. Az eddigiekkel analóg módon az N-terminálison acetil-, a C-terminálison amidcsoporttal védett ($M_{r, \text{monoizotópos}} = 2451,7 \text{ g/mol}$) peptidet szintetizáltunk. Az MS spektrum (Függelékben) igazolta az előállítás sikerét. A tisztítást és liofilizálást követően oldategyensúlyi vizsgálatokat végeztünk. Egy ilyen hosszú peptid esetében a szintézis lépései során meglévő kismértékű hibalehetőség a sok kapcsolási lépésben meglehetősen nagymértékben csökkenti a célpeptid tisztaságát és kitermelését. Emiatt a végtermék kis tömege és nagy molekulatömege a további vizsgálatok során csak kis koncentrációt eredményez, ami növeli ezen mérések hibáját.

A potenciometriás titrálások pH tartományában (a mérési tartományt behatárolta a ligandum elérhető maximális koncentrációja) a ligandumhoz 9 lépcsőzetes savi disszociációs állandó rendelhető: pH ~ 3 – 5 tartományban négy karboxilcsoport (Asp), pH ~ 6 – 7 között a három hisztidin imidazol-nitrogén, pH 9 körül a Tyr fenolos-OH hidroxil-, majd pH ~ 10 felett a Lys ϵ -ammóniumcsoportjának deprotonálódása játszódik le (**6.3.9. ábra**). A pH-metriás titrálások során a következő egyensúlyi állandókat határoztuk meg: $pK_1 = 2,9(3)$, $pK_2 = 3,7(2)$, $pK_3 = 3,94(3)$, $pK_4 = 4,82(2)$, $pK_5 = 6,00(3)$, $pK_6 = 6,53(3)$, $pK_7 = 7,18(3)$, $pK_8 = 9,16(3)$, $pK_9 = 10,6(2)$.



6.3.9. ábra: A Ac-P20-NH₂ ligandum különböző protonáltságú formáinak eloszlásai görbéi, $c_{Ac-P20-NH_2} = 4,5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $I=0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaClO}_4$; $T=298 \text{ K}$

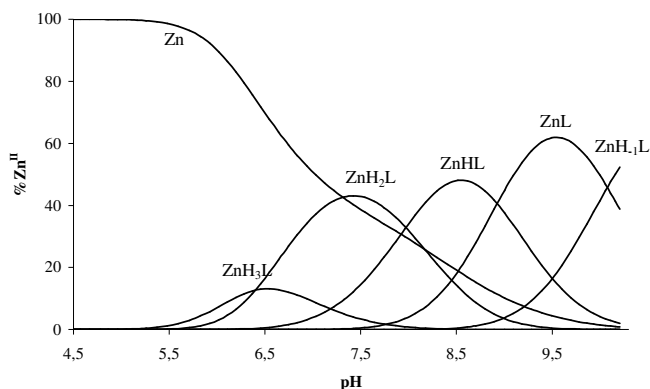
A fémionkötés vizsgálatokhoz a ligandumot cink(II)ionok jelenlétében titráltuk 1:1 fém:ligandum arány mellett. A meghatározott bruttó stabilitási állandók a **6.3.1. táblázatban** láthatóak. Az első jelentős mennyiségben képződő részecske a pH 7 körül domináns $[ZnH_2L]^0$ komplex, melyben a karboxilát-oxigének, illetve az imidazol-nitrogének koordinálódhatnak a cink(II)ionhoz. A részecske stabilitási állandója ($Zn^{2+} + [H_2L]^{2-} = [ZnH_2L]^0$) $\log K = 4,21$. A következő deprotonálódási folyamatra ($[ZnH_2L]^0 \rightarrow [ZnHL]^- + H^+$) számolt $pK_{121} = 7,97$ érték nem rendelhető a ligandum egyik nemkoordinálódó oldallánci donorcsoportjának deprotonálódásához sem (feltételezésünk szerint ennek közel kellene lennie a fémion távollétében mért értékhez). Így minden bizonnyal nem a Tyr-OH deprotonálódás közbeni koordinációja következik be. Valószínűbb, hogy egy hidroxidion kerül a cink(II)ion koordinációs szférájába, azaz a $[ZnHL]^-$ részecske vegyes hidroxokomplex.

6.3.1. táblázat: Az Ac-P20-NH₂ ligandum cink(II)komplexeinek bruttó stabilitási állandói ($\log \beta$), valamint a származtatott pK értékei ($I = 0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaClO}_4$, $T = 298 \text{ K}$)

prq	$\log \beta_{prq}$		pK_{prq}^*
ZnH ₃ L	30,38(3)	pK_{131}	6,4
ZnH ₂ L	23,98(3)	pK_{121}	7,97
ZnHL	16,01(3)	pK_{111}	8,93
ZnL	7,08(8)	pK_{101}	10,07
ZnH ₋₁ L	~ -3	pK_{1-11}	–
$pK_{prq}^* = \log \beta_{prq} - \log \beta_{p(r-1)q}$			

A következő deprotonálódási lépésre ($[ZnHL]^- \rightarrow [ZnL]^{2-} + H^+$) vonatkozó $pK_{111} = 8,93$ már sokkal inkább megegyezik a Tyr fenolos-hidroxilcsoportjára fémion távollétében számolt értékkel. Ha azt feltételezzük, hogy a fenolátcsoport nem koordinálódik a cink(II)ionhoz, ez a deprotonálódási folyamat nem jár szerkezetváltozással. A fentiek alapján a pH 8,5 körül domináns $[ZnHL]^-$ részecske valójában $[ZnH_2L(OH)]^-$, valamint a következő deprotonálódási folyamatban, pH 9 felett képződő

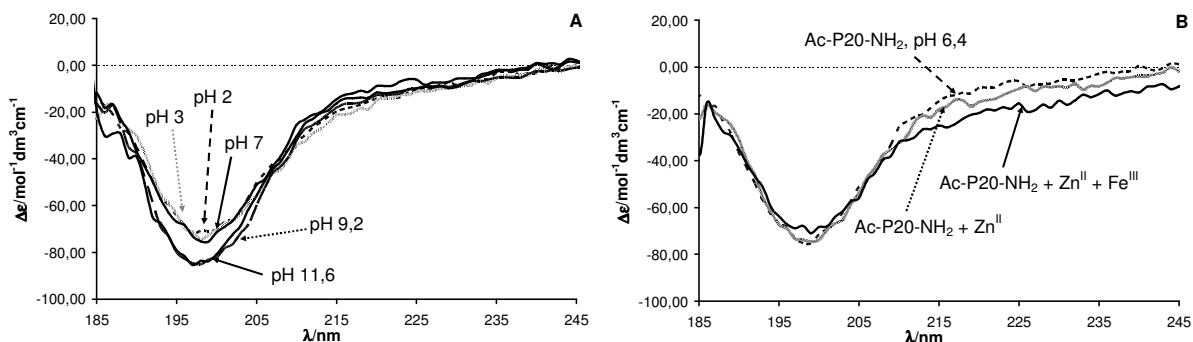
$[\text{ZnL}]^{2-}$, szintén vegyes hidroxokomplex $([\text{ZnHL}(\text{OH})]^{2+})$. Ezen tulajdonságuk előnyös lehet a kettős szálú DNS hidrolitikus hasítása során.



6.3.10. ábra: A $\text{Zn(II)}-\text{Ac-P20-NH}_2$ rendszer részecskeeloszlási diagramja, $\text{cink(II)}:\text{L} = 1:1$, $c_{\text{Zn}^{2+}} = 3,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $I=0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaClO}_4$; $T=298 \text{ K}$

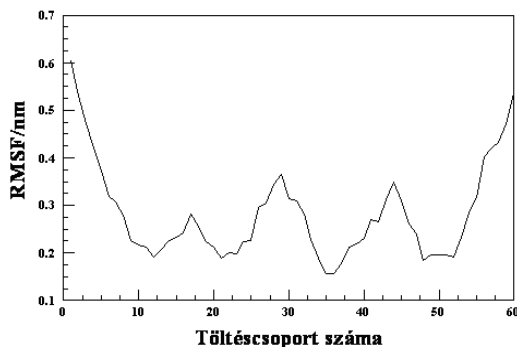
A vas(III)ionok jelenlétében történő titrálás nehézségei miatt erről a rendszerről egyelőre nem rendelkezünk több adattal.

A fehérjékhez hasonlóan az Ac-P20-NH_2 peptid esetében is rögzítettük UV tartományban az SRCD spektrumokat. Amint az a **6.3.11. ábrán** látható, már magának a peptidnek is van CD jele, tehát rendelkezik bizonyos másodlagos szerkezettel, azonban ez nem tartozik az ismert rendezett másodlagos szerkezeti elemek közé (α -hélix, β -redő, stb.). Ezt azonban a modellezés során nyert szerkezet ismerete alapján nem is vártuk. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon a peptid által kialakított szerkezet alkalmas-e a fémionok megkötésére? Méréseink során a pH változtatásával, illetve a különböző fémionok különböző sorrendben történő hozzáadásával bekövetkező spektrális változásokat vizsgáltuk. A **6.3.11.A. ábra** a ligandum spektrumának pH függését mutatja. Látható, hogy csak lúgos pH tartományban változik meg a peptid szerkezete, tehát az imidazol-nitrogén deprotonálódása nem, a Tyr-OH deprotonálódása viszont szerkezetváltozást indukál. A fémionok hatására bekövetkező változások nyomunkövetése céljából vas(III)- és cink(II)ionokat adtunk az Ac-P20-NH_2 rendszerhez 1:1 arányban (**6.3.11.B. ábra**). A bemutatott ábrán pH 6,4 értéknél láthatóak a ligandum, a cink(II)-, illetve mindkét fémiont tartalmazó komplexek spektrumai. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy nincs számottevő változás önmagában a peptid, a csak cink(II)ionokat és a vas(III)- és cink(II)ionokat is tartalmazó komplexek CD jelei között. Ugyanezt az eredményt mutatták a lúgos pH tartományban rögzített CD spektrumok is. Ez a tény megerősíti azt a feltevést, hogy a húsz aminosavat tartalmazó peptid már előre jól meghatározott konformációt vehet fel, és így a két fémion számára megfelelően kialakított kötőhelyet tud biztosítani.



6.3.11. ábra: Az Ac-P20-NH₂ rendszer UV-CD spektrumai: (A) pH; (B) cink(II)- és vas(III)ionok hatására bekövetkező változások; cink(II):vas(III):L = 1:1:1, $c_{\text{Ac-P20-NH}_2} = 5,5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, $T=298 \text{ K}$

A P20 peptid szerkezetének jobb megismeréséhez molekuláris dinamikai számolásokat is végeztünk. A peptidben kialakuló intramolekuláris kölcsönhatások számolása a GROMACS programcsomag segítségével történt. A számolás során az egyes csoportoknak egy referenciahelyhez viszonyított eltérését mértük. A **6.3.12. ábrán** az látható, hogy a szimuláció alatt a peptid melyik részén történt a legnagyobb szerkezeti változás. Az RMSF értékek (root mean square fluctuation) azt mutatják, hogy a peptidlánc nagy részében a gerinc konformáció változása kis mértékű, csak a peptid két végén nagyobb a flexibilitás. Ez az eredmény is azt mutatja, hogy a P20 peptid stabil konformáció, és így, a fentieknek megfelelően, a fémionok számára alkalmas kötőhely kialakítására képes.



6.3.12. ábra: A töltéscsoportok rugalmasságát mutató RMSF (root mean square fluctuation) érték változása a szimuláció ideje alatt a P20 peptidben

Eddigi munkánk során sikeresen előállítottunk biológiai szintézissel két hosszabb oligopeptidet (P20, P24) a GST fehérje C-terminális részéhez fűzve. Ezenkívül az Ac-P20-NH₂ peptide esetében szilárd fázisú peptidszintézist is végeztünk. A peptidek nagy mérete miatt a termékek néhány miligrammnyi mennyisége híg oldatokat eredményezett a vizsgálatok során. A oldatkémiai viselkedést pH-metria és SRCD spektroszkópia segítségével tanulmányoztuk. Meghatároztuk a cink(II)komplexelek stabilitási állandóit, és vizsgáltuk a különböző fémionok, különböző pH-n gyakorolt hatását a

komplexek szerkezetére. A fúziós fehérjék esetében a fémionkötő tulajdonságok vizsgálata mellett megpróbálkoztunk az előállított GST-P20 fehérje kristályosításával is. Rövidtávú terveink között szerepel a peptidek nagyobb mennyiségben történő előállítása, és fémionkötő tulajdonságainak részletesebb vizsgálata a CD mérések mellett, lehetőség szerint UV/látható elnyelési, ESR és NMR spektroszkópai módszerek segítségével.

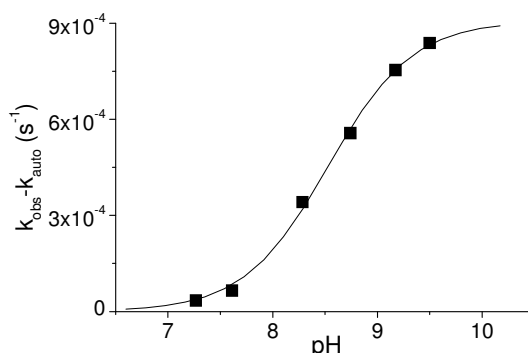
6.4. Katalitikus aktivitás vizsgálatok

6.4.1. Pirokatechin-oxidáz aktivitás vizsgálata

A réz(II)-Ac-HPHH-NH₂ rendszer oldategyensúlyi és -szerkezeti viszonyainak tárgyalását követően, a fiziológiai pH közelében kialakuló komplexek oxidáz-funkcióját vizsgáltuk. A pirokatechin-oxidáz a III-as típusú rézfehérjék családjába tartozik (3.1.1. fejezet), ezért modellezésére az eddigiek során [39,146–156] főleg kétmagvú réz(II)komplexeiket használták. Irodalmi adatok azonban olyan egymagvú komplexekről is vannak, melyek képesek az enzimek által katalizált folyamatokat utánozni [39,146,150,156].

A réz(II)-peptidkomplexekben a semleges közegben gyakran koordinálódó deprotonálódott amid-nitrogén stabilizálja a réz +2-es oxidációs állapotát, ami hátrányt jelent a redoxireakciók katalízisében. Amint az a 6.2.1. fejezetből kiderült, az Ac-HPHH-NH₂ réz(II)komplexeinél sem sikerült megakadályozni a peptid-nitrogén koordinációját. Már a pH 6,5 felett dominánssá váló [CuH₁L]⁺ részecskében {ImN, N⁻, ImN} típusú kötőmód valósul meg, viszont telítetlen a fémion körüli koordinációs szféra és a harmadik imidazol-nitrogén is a fémion közelében van, mint sok természetes enzim esetében.

A 3,5-di-tercbutil-pirokatechin (H₂dtbc) szubsztrát oxidációját a kísérleti részben leírtaknak megfelelően végeztük. A méréssorozatban elsőként az oxidáció kezdeti sebességének pH-függését vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a {3×ImN} koordinációjával kialakuló [CuL]²⁺ részecske, melynek szerkezete a legjobban hasonlít a természetes enzimek aktív központjához, nem képes elősegíteni a H₂dtbc oxidációját. A pH növelésével jelentős aktivitásnövekedést figyeltünk meg (6.4.1. ábra).

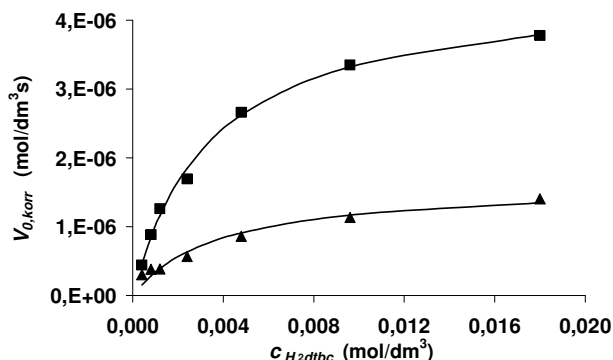


6.4.1. ábra: A réz(II)-Ac-HPHH-NH₂ rendszerben a H₂dtbc oxidációjára számolt korrigált sebességi állandók pH függése 86 % (m/m) metanol-H₂O elegyben ($c_{\text{Cu}^{2+}} = c_{\text{L}} = 5,49 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$; $c_{\text{H}_2\text{dtbc}} = 0,002 \text{ mol/dm}^3$; $T=298 \text{ K}$)

Bár a mérési körülmények különböztek a pH-metriás titrálások során alkalmazottaktól, a sebességi állandó pH függése alapján számolható $\text{p}K_{\text{számolt}} = 8,57$ értékből arra lehet következtetni, hogy egyetlen részecske vesz részt a katalízisben. Valószínű, hogy ez a [CuH₂L]⁰, vagy másként felírva a [CuH₁L(OH)]⁰ {2×ImN, N⁻, OH⁻} koordinációval rendelkező komplex, melynek képződése,

töltéssémlegessége miatt, sokkal kedvezményezettebb metanolos közegben, mint tiszta vízben. Ezt a feltevést a metanolos közegben rögzített CD spektrumok is igazolták.

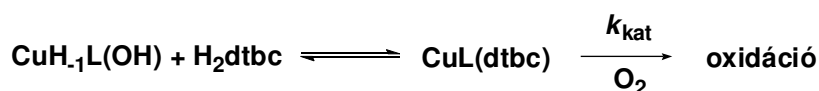
A kinetikai méréseket, állandó komplexkoncentráció mellett, a szubsztrát koncentrációjának növelésével, 8,19 és 8,90-es pH-n folytattuk. Itt a $[\text{CuH}_{-1}\text{L}(\text{OH})]^0$ részecske móltörtje jelentős, de az autooxidáció még nem befolyásolja számottevően a katalizált reakció sebességét. A kezdeti sebességek telítési görbe szerint változtak, amennyiben a H_2dtbc legalább negyvenszeres feleslegben volt a komplex koncentrációjához képest (6.4.2. ábra). Ez arra utal, hogy az oxidációs reakciót megelőzi egy, a $\text{CuL}(\text{dtbc})$ terner komplex kialakulásához vezető, gyors előegyensúly. Azaz viszonylag kis szubsztrátkoncentráció mellett a reakció sebessége azzal egyenes arányban nő, majd telítést ér el. Tehát a kísérleti pontokra a Michaelis-Menten féle elméletet alkalmazva, kiszámíthatóak a kinetikai paraméterek (K_M és k_{kat}).



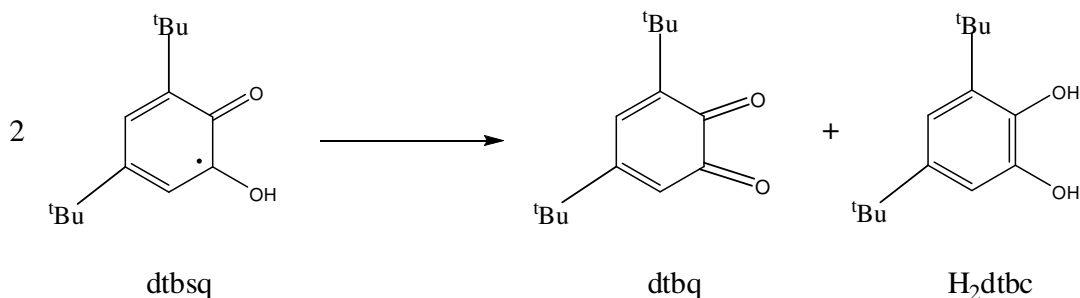
6.4.2. ábra: Az autooxidációval korrigált kezdeti sebesség függése a H_2dtbc koncentrációtól (mol/dm³) a réz(II)-Ac-HPHH-NH₂ rendszerben pH=8,19 (▲) és pH=8,90 (■) értéknél, 86 % (m/m) metanol- H_2O elegyben ($c_{\text{Cu}^{2+}} = c_L = 5,49 \times 10^{-5}$ mol/dm³, $T=298$ K)

A két különböző pH-n végzett mérés kiértékelése során mindkét illesztés hasonló K_M (0,0038 mol/dm³, illetve 0,0035 mol/dm³) és k_{kat} (0,10 s⁻¹, illetve 0,12 s⁻¹) értékeket eredményezett. Ez további bizonyítéka annak, hogy egyetlen részecske ($[\text{CuH}_{-1}\text{L}(\text{OH})]^0$) felelős a katalitikus aktivitásért. A pH 8,90-nél mért 0,12 s⁻¹ (= 432 h⁻¹) k_{kat} érték kimagasló az eddig vizsgált, és aktívnak bizonyult egy- [146,156] és többmagvú réz(II)komplexek körében [39,147,149–152,155]. A Michaelis állandó ($K_M = 3,5 \times 10^{-3}$ mol/dm³) specifikus kölcsönhatásra nem utaló, mérsékelt enzim-szubsztrát kötése erősséget mutat.

Az eddigi irodalmi adatok alapján többféle mechanizmus lehet alkalmas az egymagvú részecske által katalizált reakció leírására. A szubsztrát kötődése a fémionhoz két proton leadásával jár, melyeket feltételezésünk szerint a $[\text{CuH}_{-1}\text{L}(\text{OH})]^0$ részecskében a koordinálódott hidroxidion és amid-nitrogén donoratomok felvehetnék, megkönnyítve a $\text{CuL}(\text{dtbc})$ terner komplex kialakulását. A folyamat az alábbi feltételezett séma szerint játszódik le:



Ez a hipotézis magyarázhatja a koordinálódott amid-nitrogént tartalmazó részecske nagy aktivitását, és a mérsékelt K_M értéket is, mivel a szubsztrát kötődése a fémion körüli koordinációs szféra jelentős átrendeződését vonja maga után, melynek során három imidazol-nitrogénes koordináció jön létre. Ez az elrendeződés a természetes enzimek aktív központjához hasonló környezetet biztosít a rézion számára [11]. A reakcióhoz szükséges két elektron átvitele azonban nem valósulhat meg egyetlen egymagvú komplex részvételével. A közelmúltban megjelent Speier Gábor és Kaizer József által javasolt mechanizmus szerint [150], valamint a kutatócsoportunkban korábban vizsgált réz(II)-Ac-HHGH-OH [39] rendszerben feltételezettekhez hasonlóan, a H_2dtbc oxidációja során először egy $Cu^I L(dtbsq)$ átmeneti termék ($dtbsq$ = di-terc-butil-szemikinon) keletkezik. Ezután két réz(I)ionot tartalmazó részecske O_2 molekulával való reakciója egy $\mu-\eta^1:\eta^1$ vagy $\mu-\eta^2:\eta^2$ peroxo-hidas réz(II)-dimer részecske kialakulásához vezethet. Ez a végső és valószínűleg sebességmeghatározó lépésben két H_2dtbc molekulával lép reakcióba, mely folyamatban visszaalakul a kiindulási komplex, miközben H_2O_2 távozik. Az ugyancsak kilépő két szemikinon-gyök a terméké (3,5-di-tercbutil-ortokinonná) és H_2dtbc -vé diszproporcionálódik (6.4.3. ábra).



6.4.3. ábra: A $Cu^I L(dtbsq)$ rendszerben jelenlévő szemikinon-gyök diszproporcionálódásának sematikus ábrázolása

6.4.2. SOD aktivitás vizsgálata

A szuperoxid-dizmutáz aktivitás mérése során egy nagyon gyors, gyökös mechanizmusú redoxireakció sebességi állandóját kellene meghatározni. A közvetlen módszer drága és speciális technikákat igényelne. Ezért a kísérleti részben leírtaknak megfelelően a réz(II)-Ac-HPHH-NH₂ és réz(II)-Ac-KHPHPHQ-NH₂ rendszerek szuperoxid-dizmutáz aktivitását közvetett módon, a xantin/NBT tesztreakció segítségével követtük. A reakcióelegyben található tetrazólium-só gyökfogóként viselkedik, a szuperoxid gyökanion ($O_2^{\bullet-}$) hatására igen érzékeny és szelektív folyamatban a megfelelő formazán-származékká redukálódik (5.10.2. ábra).

A szuperoxid-dizmutázban, mint az enzimekben általában, a fémionok nem a fehérje felszínén helyezkednek el, hanem a másodlagos szerkezeti motívumok által kialakított megfelelő üregekben. A fehérjerésznek további szerepe van, például reakciópartnerek megfelelő sztereokémiai elrendezésében, hidrofíl vagy hidrofób környezet biztosításában, és a szubsztrátnak a katalitikus helyre történő szállításában. Ez utóbbi funkciót a szuperoxid-dizmutáz enzim esetében egy pozitív töltéssel rendelkező csatorna tölti be, ami a negatív töltésű szuperoxid szubsztrátot a reakciócentrumba vezeti. Maga az

enzimkatalizált folyamat tehát meglehetősen bonyolult. Vizsgálataink során ezért azt is megpróbáltuk kideríteni, milyen feltételeket kell teljesítenie egy hatékony peptidtípusú modellkomplexnek.

Az eddigi eredmények szerint a legjobb SOD-modelleknek homo- és heterodimer, imidazolato-hidas makrociklusos ligandumok réz(II)komplexei bizonyultak, de a peptidligandumok körében is találunk hatékony modellvegyületeket, amint az a **6.4.1. táblázat**ban szereplő adatokból látható. A publikált eredmények alapján, a különböző rendszerekben tapasztalt eltérő aktivitást a réz(II)komplexek termodinamikai stabilitásával és az ekvatoriális síkban ható ligandumtér erősségével hozták összefüggésbe [10]. A kutatócsoportunkban korábban vizsgált Ac-HHGH-OH réz(II)komplexeinek vizsgálata során [39] azt tapasztaltuk, hogy a pH 6,8 körül képződő, három imidazol-nitrogén koordinációt tartalmazó $[\text{CuL}]^+$ részecske egyike volt a legaktívabb modelleknek, míg a következő deprotonálódás során képződő $[\text{CuH}_2\text{L}]^0$ részecske ($\{3 \times \text{ImN}, \text{OH}^-\}$ koordináció) aktivitása valamelyest kisebb. A CuL részecske nagyobb aktivitására magyarázat lehet annak egyszerűen pozitív töltése, illetve, hogy ez esetben a fémion körül az ekvatoriális síkban lévő ligandumok kisebb térerőssége jobb hozzáférhetőséget biztosít a szuperoxid gyökanion számára.

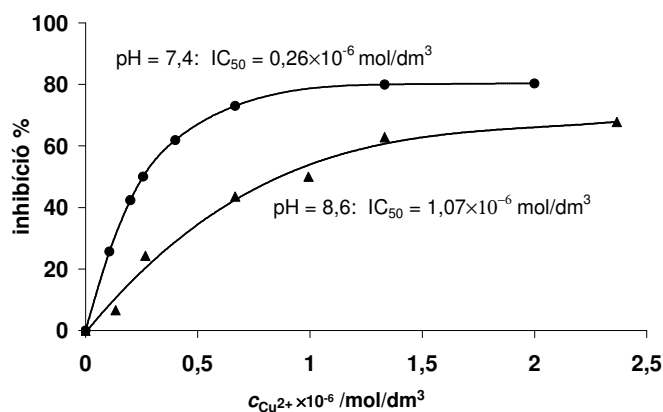
6.4.1. táblázat: Az általunk vizsgált rendszerek SOD aktivitása összehasonlítva néhány nagy aktivitást mutató réz(II)-peptidkomplex korábban meghatározott IC_{50} értékével:

komplex	$\text{IC}_{50} (\times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3)$	hivatkozás
réz(II):Ac-HPHH-NH ₂ ; 1:1 (pH 7,4)	0,26(2)	saját mérés
réz(II):Ac-HPHH-NH ₂ ; 1:1 (pH 8,6)	1,07(4)	saját mérés
réz(II):Ac-KHPHPHQ-NH ₂ ; 1:1 (pH 7,5)	0,56(2)	saját mérés
réz(II):Ac-KHPHPHQ-NH ₂ ; 1:1 (pH 8,3)	0,37(3)	saját mérés
Cu,Zn-SOD (pH = 6,8)	0,0045	39
Cu,Zn-SOD (pH = 7,4)	0,0084	157
réz(II):Ac-HHGH-OH; 1:1 (pH 6,8)	0,13	39
réz(II):Ac-HHGH-OH; 1:1 (pH 7,5)	0,15	39
réz(II):ciklo-HH; pH 7,4	0,11	41
réz(II):HVVH; 1:1 (pH 7,4)	0,20	10
réz(II):Ac-HVVH-NH ₂ ; 1:1 (pH 7,4)	0,16	10
réz(II):karnozin; 1:1000 (pH 7,4)	0,80	43
réz(II):Ac-HNPGYP-NH ₂ ; 1:1 (pH = 7,4)	0,261	83
réz(II):Ac-HNPGYP-NH ₂ ; 1:1 (pH = 6,6)	0,355	83
réz(II):Ac-PHGGGWGQ-NH ₂ ; 1:1 (pH = 7,4)	0,492	83
réz(II):Ac-(HNPGYP) ₂ -NH ₂ ; 1:1 (pH = 7,4)	0,188	83
réz(II):Ac-(HNPGYP) ₂ -NH ₂ ; 2:1 (pH = 7,4)	0,158	83
réz(II):Ac-(PHGGGWGQ) ₂ -NH ₂ ; 1:1 (pH = 7,4)	0,217	83
réz(II):Ac-(PHGGGWGQ) ₂ -NH ₂ ; 2:1 (pH = 7,4)	0,242	83
réz(II):Ac-(PHGGGWGQ) ₄ -NH ₂ ; 1:1 (pH = 6,6)	0,121	83
réz(II):Ac-(PHGGGWGQ) ₄ -NH ₂ ; 1:1 (pH = 7,4)	0,175	83
réz(II):Ac-(PHGGGWGQ) ₄ -NH ₂ ; 2:1 (pH = 7,4)	0,310	83
réz(II):Ac-(PHGGGWGQ) ₄ -NH ₂ ; 4:1 (pH = 7,4)	0,316	83
réz(II)-H ⁺ -PO ₄ ³⁻ (pH = 7,4)	1,06	43

A réz(II)-HVVH és réz(II)-Ac-HVVH-NH₂ [10] rendszerekben pH 7,4-nél hasonló IC_{50} értékeket határoztak meg, ami viszont kissé elmaradt a réz(II)-Ac-HHGH-OH esetén tapasztalttól. A vizsgált pH-n

4 N-es koordináció alakul ki az aktívnak bizonyuló CuH_2L komplexekben, az előbbi tripeptidnél $\{\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{ImN}\}$, míg utóbbinál $\{\text{ImN}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{ImN}\}$ koordinációs móddal. A feltételezés szerint az amid-nitrogének koordinációja miatt megnövekvő ligandumtér megnehezíti a $\text{O}_2^{\bullet-}$ axiális koordinációját, ami magyarázata lehet a csökkent aktivitásnak. A Kozlowski és munkatársai által csirke és humán prion fehérjék modellezésére használt $\text{Ac}-(\text{HNPGYP})_x\text{-NH}_2$ és $\text{Ac}-(\text{PHGGGWGQ})_x\text{-NH}_2$ ($x = 1, 2$ vagy 4) réz(II)komplexeinek SOD aktivitás vizsgálatából [83] is azt az általános megállapítást lehet levonni, hogy az imidazol-nitrogének koordinációja kedvező, míg az amid-nitrogének koordinációja csökkenti a SOD aktivitást. Ez az általuk vizsgált rendszerekben $\text{pH} = 7,4$ -nél, a réz(II)-Ac-HNPGYP-NH₂ és réz(II)-Ac-PHGGGWGQ-NH₂ 1:1 fém:ligandum arányok esetében a legszembetűnőbb. A hexapeptid vizsgálata során aktívnak bizonyuló, egy amid-nitrogén koordinációt tartalmazó CuH_1L részecske $\text{IC}_{50} = 0,261 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ értéke közel fele az oktapeptid esetében mért értéknek ($\text{IC}_{50} = 0,492 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$), ahol a vizsgált pH-n a két amid-nitrogén koordinációt tartalmazó CuH_2L részecske dominál. Ez utóbbi esetben az aktivitás csökkenésének magyarázata az lehet, hogy a két amid-nitrogén koordinációja stabilizálja a réz(II)komplext ezzel megnehezítve annak réz(I)-é történő redukcióját. Az általuk vizsgált monomer és dimer peptidek összehasonlítása alapján a nagyobb számú imidazol-nitrogén koordinációja az enzimatis aktivitás növekedését vonja maga után.

Megvizsgáltuk a réz(II)-Ac-HPHH-NH₂ 1:1 arányú rendszer SOD aktivitását különböző pH értékeknél. A pH 7,4 körül domináns részecske bizonyult a legaktívabbnak (6.4.4. ábra). Mivel az alkalmazott híg oldatban ($1 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$) a részecskeeloszlás eltérhet a pH-metriás vizsgálatok alapján számoltaktól (6.2.1. ábra), a stabilitási állandók alapján a PSEQUAD programmal új eloszlásgörbét szimuláltunk. E számolás alapján az $1 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú Ac-HPHH-NH₂ oldatban pH = 7,4-nél jelenlevő részecskék: 73% $[\text{CuH}_1\text{L}]^+$, 7% szabad réz(II)ion, 10% $[\text{CuH}_2\text{L}]^0$, 7% $[\text{CuL}]^{2+}$ és 2% $[\text{Cu}(\text{OH})]^+$. A nagyobb pH értéknél végzett mérések kisebb aktivitást mutattak: pH = 8,6-nél (a számolt részecskeeloszlás: 30,5% $[\text{CuH}_1\text{L}]^+$, 67% $[\text{CuH}_2\text{L}]^0$ és 1,5% $[\text{Cu}(\text{OH})]^+$) a mért IC_{50} ($= 1,07 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$) érték négyszer nagyobb, mint a pH 7,4-nél meghatározott $0,26 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$. Ezek alapján megállapítható, hogy a $[\text{CuH}_1\text{L}]^+$ részecske felelős a SOD aktivitásért.

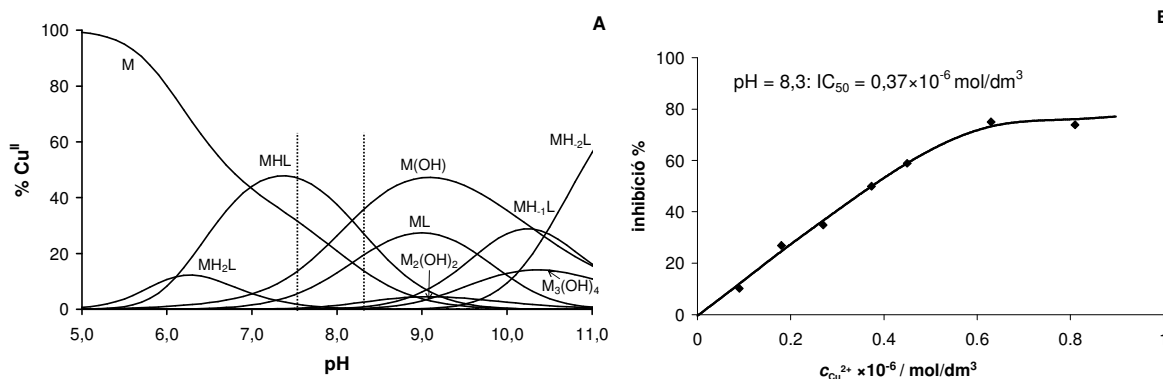


6.4.4. ábra: A réz(II)-Ac-HPHH-NH₂ rendszerben az NBT – szuperoxid gyökkanion reakciójának inhibíciója pH = 7,4 (●) és pH = 8,6 (▲) értékeknél ($c_{\text{NBT}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $c_{\text{xantin}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $T = 298 \text{ K}$)

A $[\text{CuH}_{-1}\text{L}]^+$ részecskéhez rendelhető nagyobb aktivitásra magyarázat lehet, hogy a $\{\text{ImN}, \text{N}^-, \text{ImN}, \text{H}_2\text{O}\}$ koordinációjú központi fémiont tartalmazó komplex könnyebben lép reakcióba a szuperoxid gyökánionnal, mint az erősebb terű ligandumok koordinációjával kialakuló $[\text{CuH}_2\text{L}]^0$ részecske ($\{\text{ImN}, \text{N}^-, \text{ImN}, \text{OH}^-\}$ feltételezett koordináció). További előnyt jelenthet $[\text{CuH}_{-1}\text{L}]^+$ részecske pozitív töltése, szemben a semleges $[\text{CuH}_2\text{L}]^0$ molekulával.

Az Ac-HPHPH-NH₂ ligandum réz(II)komplexeinek SOD aktivitását az oldhatósági problémák miatt nem vizsgáltuk.

A réz(II)-Ac-KHPHPHQ-NH₂ rendszerben pH 7,5 és 8,3 értékeknél teszteltük a kialakuló három imidazol-nitrogén koordinációt tartalmazó $[\text{CuHL}]^{3+}$ és $[\text{CuL}]^{2+}$ részecskék enzim utánzó aktivitását. A potenciometriás titrlásokhoz viszonyítva három nagyságrenddel kisebb koncentrációjú oldatban ($c_L = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$) a részecskeeloszlás a **6.4.5.A. ábrán** látható. Eszerint pH = 7,5-nél, az oldatban a megközelítőleg 47%-ban jelenlevő $[\text{CuHL}]^{3+}$ ($\{3 \times \text{ImN}, \text{H}_2\text{O}\}$) a domináns. A meghatározott IC₅₀ érték $0,56 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$. pH 8,3-nél az IC₅₀ érték $0,37 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ -nek adódott (**6.4.5.B. ábra**), ami a részecskeeloszlást figyelembe véve valószínűleg a $[\text{CuL}]^{2+}$ ($[\text{CuHL}(\text{OH})]^{2+}$) részecskéhez rendelhető. A korábbi eredmények alapján ezen részecskében három imidazol-nitrogén és egy hidroxidion koordinációja valószínűsíthető a fémion körüli ekvatoriális síkban. A **6.4.1. táblázat** adatai alapján megállapítható, hogy a vizsgált rendszer szuperoxid-dizmutáz aktivitása kisebbnek bizonyult a hasonló rendszerek aktivitásához képest, ami kissé meglepő, figyelembe véve, hogy komplexünkben nincs amid-nitrogén deprotonálódás és koordináció. Esetünkben azonban a bonyolult részecskeeloszlás miatt nem lehet egyértelműen egyetlen komplexhez hozzárendelni az aktivitást.



6.4.5. ábra: (A) A réz(II)-Ac-KHPHPHQ-NH₂ rendszer részecskeeloszlása a SOD aktivitás mérésénél alkalmazott körülmények mellett, $0,9 \times c_L = c_{\text{Cu}^{2+}} = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$, $T = 298 \text{ K}$, $I = 0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaClO}_4$ (a szaggatott vonalak jelzik a mért pH értékeket); (B) az NBT – szuperoxid gyökánion reakciójának inhibíciója pH = 8,3-nél ($c_{\text{NBT}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $c_{\text{xantin}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $T = 298 \text{ K}$)

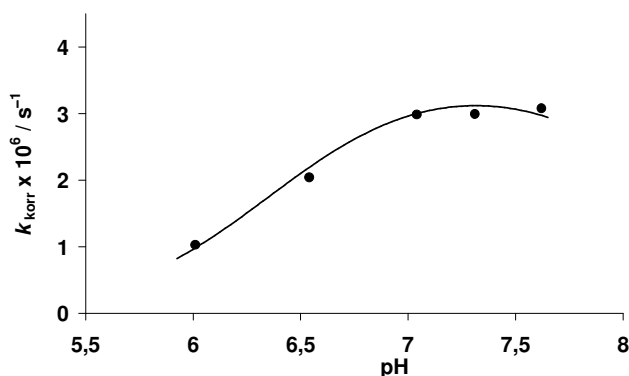
A korábbi vizsgálatok során Bonomo és munkatársai [43] azt találták, hogy a réz(II)-foszfát rendszer önmagában is mutat SOD-aktivitást ($1,06 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$). Azonban meg kell jegyezni, hogy a réz(II)-foszfát komplexek kis stabilitásúak, ezért ezekben a rendszerekben a szabad fémion mellett többnyire csak hidrolízis részecskék vannak jelen az oldatban, tehát a mért aktivitás ezekhez a részecskékhöz rendelhető. Azonban a réz(II)-Ac-KHPHPHQ-NH₂ rendszerben szignifikánsan nagyobb

aktivitást mértünk, mint ami a $[\text{Cu}(\text{OH})]^+$ részecskéhez rendelhető. Az eddigi eredmények ismeretében megállapítható, hogy a vizsgált réz(II)-Ac-HPHH- NH_2 rendszer a pH = 7,4-nél mért SOD aktivitása alapján a legjobb modellek közé sorolható, de a réz(II)-Ac-KHPHPHQ- NH_2 rendszerben pH = 8,3-nél mért aktivitás is a korábban vizsgált réz(II)komplexeik IC_{50} értékeihez hasonló. Az eddigi ismereteink alapján az a következtetés is levonható, hogy nem lehet teljes bizonyossággal megállapítani, hogy a vizsgált komplexek szerkezete hogyan befolyásolja a SOD aktivitást, hiszen a különböző szerkezetű réz(II)komplexeik, különböző körülmények között meghatározott IC_{50} értékei igen hasonlóak, és minden esetben legalább két nagyságrenddel elmaradnak a természetes enzim aktivitásától.

6.4.3. Hidrolitikus aktivitás-vizsgálat – aktivált foszfátészter átésztereződése

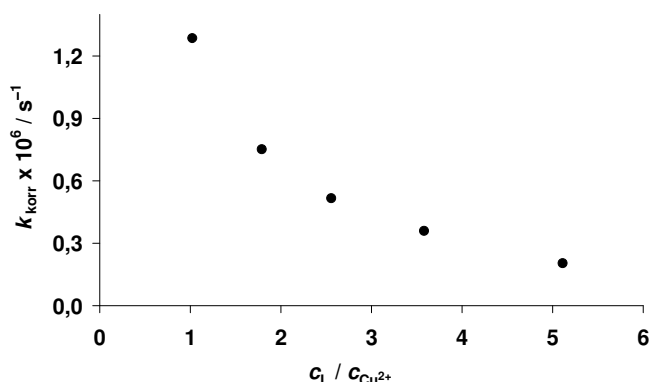
Az előállított oligopeptidek réz(II)- és cink(II)komplexeinek hatását megvizsgáltuk az RNS modellnek számító 2-hidroxi-propil-4-nitrofenil-foszfát (**hnp**) szubsztrát észterkötésének hidrolízisére, a kísérleti részben leírt körülmények alkalmazásával. Irodalmi adatok a foszfátészter kötés réz(II)-peptidkomplexeik katalizálta hidrolízisééről kis számban állnak rendelkezésünkre [158,159]. A cink(II)-peptidkomplexeik által elősegített hnp hidrolízisééről gyakorlatilag nincsenek irodalmi adatok, viszont Scrimin [160–162], illetve Kawai és munkatársai [163] több esetben beszámoltak egyes szintetikus, fémionkötő oldalláncsal funkcionizált peptidligandumok cink(II)komplexeinek hidrolitikus aktivitásáról.

A réz(II)-Ac-HPHH- NH_2 rendszer kinetikai tulajdonságait a pH, a komplexkoncentráció, illetve a fém-ligandum arány függvényében vizsgáltuk. Az ekvimoláris réz(II):Ac-HPHH- NH_2 oldatban a látszólagos sebességi állandók meghatározása pH 6 – 10 tartományban történt. A sebességi állandókat minden esetben korrigáltuk a fémiont és ligandumot nem tartalmazó oldatban mért autohidrolízis sebességével ($k_{\text{kor}} = k_{\text{obs}} - k_{\text{auto}}$). Ebben a rendszerben pH ~ 8 felett az autohidrolízis reakciósebessége összemérhető volt a katalizált reakció sebességével, így a k_{kor} meghatározása nagy hibával terhelt. Ezért a k_{kor} pH függését csak pH 6 – 7,7 tartományban értékeltük (6.4.6. ábra).



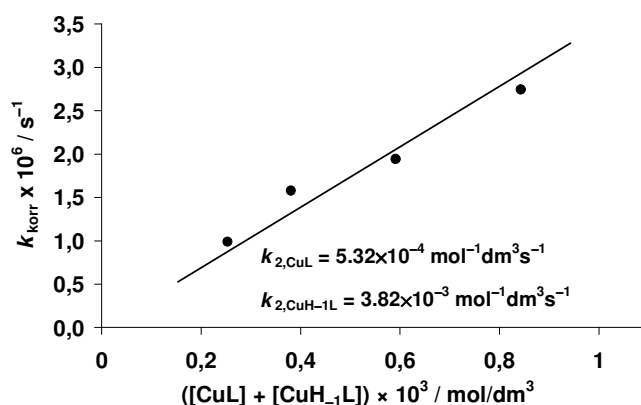
6.4.6. ábra: A hnp átésztereződésének pH függése a réz(II)-Ac-HPHH- NH_2 rendszerben ($c_{\text{Cu}^{2+}} = c_L = 9,99 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $c_{\text{hnp}} = 9,52 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $T = 298 \text{ K}$; a folytonos vonal az illesztett paraméterek alapján számított görbe)

A korrigált pszeudo-elsőrendű sebességi állandók monoton növekedése figyelhető meg a pH növelésével, ami pH 7,0 körül egy platót ér el. A görbe részecskeeloszlási diagrammal való összevetéséből (6.2.1. ábra) egyértelműen megállapítható, hogy főként a $[\text{CuH}_1\text{L}]^+$ részecske felelős a tapasztalt aktivitásért, bár valószínűleg a $[\text{CuL}]^{2+}$ hozzájárulásával is számolnunk kell pH 6 körül. Az oldategyensúlyi vizsgálatok során az alkalmazott pH tartományban *biszkomplexek* képződését is feltételeztük. Annak eldöntésére, hogy ezek részt vesznek-e a katalitikus folyamatban, megvizsgáltuk a ligandum:fém arány változtatásának hatását a hnpn átészterezési reakciójának sebességére pH 7,3-nál (6.4.7. ábra). Jól látható, hogy az aktivitás 1:1 aránynál a legnagyobb, majd a ligandumfelesleg növekedésével a görbe meredeken csökken, ami azt jelenti, hogy a *biszkomplexek* hidrolitikus aktivitása kizárható.



6.4.7. ábra: A hnpn átésztereződésére vonatkozó pszeudo-elsőrendű sebességi együtthatók függése a fém–ligandum aránytól a réz(II)-Ac-HPHH-NH₂ rendszerben pH = 7,3-nél ($c_{\text{Cu}^{2+}} = 4,65 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $c_{\text{hnpn}} = 9,52 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $T = 298 \text{ K}$)

A pszeudo-elsőrendű sebességi állandók komplexkoncentrációtól való függése a reakció rendűségéről ad információt. A pH 7,3-nál meghatározott k_{korr} vs. komplexkoncentráció diagram elsőrendű függést mutat (6.4.8. ábra).

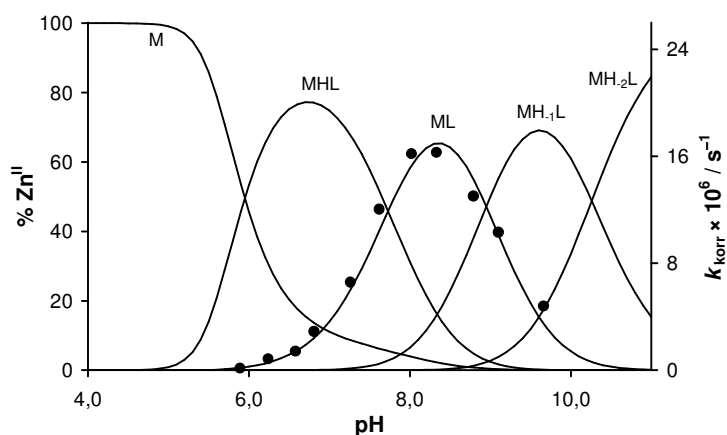


6.4.8. ábra: A pszeudo-elsőrendű sebességi együtthatók függése az aktív részecskék koncentrációjának összegétől pH 7,3-nél ($c_{\text{hnpn}} = 9,52 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $T = 298 \text{ K}$)

A 6.4.6. és 6.4.8. ábrák adatainak együttes illesztéséből kiszámítható a két aktív részecske másodrendű sebességi állandója: $k_2 = 3,8 \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ ($[\text{CuH}_1\text{L}]^+$), illetve $5,3 \times 10^{-4} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ ($[\text{CuL}]^{2+}$). Ez mérsékelt aktivitást jelent a hidroxidion által indukált folyamat másodrendű sebességi

állandójához képest ($k_{2,\text{OH}} = 9,8 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$) és elmarad az irodalomban található szintetikus ligandumok két-, illetve többmagvú réz-, cink- vagy vaskomplexeinek aktivitásától [31,164–167], ahol néhány esetben akár 10^4 – 10^5 -szeres sebességnövekedést értek el. Fontos viszont kiemelni, hogy pH 7,0-nél a hpnp átészterezési reakciójának százszoros gyorsulását mértük a nem katalizált reakcióhoz képest (sebességnövekedés = $k_{\text{kor}}/k_{\text{auto}}$), ami kiemelkedő az egymagvú réz(II)-oligopeptid komplexekre. A szintetikus ligandumok komplexeihez viszonyított kis aktivitásra magyarázat lehet, hogy a $[\text{CuH}_1\text{L}]^+$ komplexben koordinálódó deprotonálódott amid-nitrogén lényegesen csökkenti a réz(II)ion *Lewis*-sav jellegét, ami kedvezőtlenül hat a katalízisre. Az amid-nitrogén koordinációt tartalmazó peptidkomplexekkel szemben, ahol az ekvatoriális koordinációs sík teljesen telített, előnyt jelenthet, hogy az Ac-HPHH-NH₂ aktív komplexeiben egy könnyen cserélhető vízmolekula foglalja el a negyedik koordinációs helyet. A fentiek ismeretében felmerül a kérdés, hogy miért a $[\text{CuH}_1\text{L}]^+$ ($\{\text{ImN}, \text{N}^-, \text{ImN}, \text{H}_2\text{O}\}$) és nem a $[\text{CuL}]^{2+}$ ($\{3 \times \text{ImN}, \text{H}_2\text{O}\}$) részecske az aktívabb, annak ellenére, hogy az előbbi komplexben kisebb a központi fémion *Lewis* savassága. Eddigi ismereteink alapján valószínűsíthető, hogy a fémion közelében levő szabad imidazol-nitrogén is részt vesz a folyamat elősegítésében. A nem-koordinálódó nitrogénatomnak ugyanis fontos szerepe lehet a szubsztrát 2-hidroxipropil csoportjának deprotonálásában.

A cink(II)-Ac-KHPHPHQ-NH₂ rendszer vizsgálata során a teljes kinetikai vizsgálat helyett célunk az volt, hogy teszteljük a hpnp szubsztrát hidrolízisére kifejtett hatását, és hogy azonosítsuk az aktív részecskét. A kinetikai vizsgálatokat 1:1 fém:ligandum arány mellett, pH 5,9 – 9,7 tartományban végeztük, majd a korrigált pszeudo-elsőrendű sebességi állandók pH függését összevetettük a cink(II)-Ac-KHPHPHQ-NH₂ rendszer részecskeeloszlásával. Amint az a **6.4.9. ábrán** látható, a haranggörbe jellegű kinetikai profil jól követi a $[\text{ZnL}]^{2+}$ ($[\text{ZnHL}(\text{OH})]^{2+}$) komplex képződését. A pH 8,3 körül tapasztalható maximum tehát arra enged következtetni, hogy a kinetikai aktivitás ehhez az egyetlen részecskéhez rendelhető.



6.4.9. ábra: A cink(II)-Ac-KHPHPHQ-NH₂ rendszer részecskeeloszlási diagramja ($c_{\text{Zn}^{2+}} = 0,9 \times c_L = 9,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$; $I = 0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaClO}_4$; $T = 298 \text{ K}$), illetve körökkel ábrázolva az autohidrolízissel korrigált látszólagos pszeudo-elsőrendű sebességi együtthatók adatai láthatóak

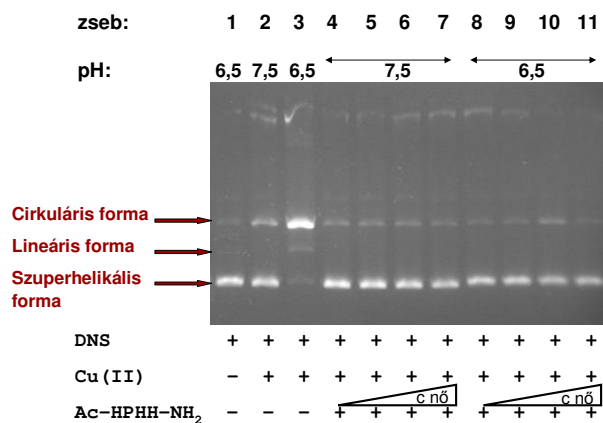
Mivel pH 7 – 9 tartományban az autohidrolízis segítségével gyorsabban növekszik, mint a komplex által elősegített folyamaté, maximális sebesség-növekedést pH 7,3 körül értünk el, ahol a $[ZnL]^{2+}$ komplex ~130-szorosára gyorsította a hidrolízis sebességét. Az általunk meghatározott kinetikai aktivitás összemérhető néhány korábban említett funkcionizált oligopeptid kétmagvú cink(II)komplexeinek aktivitásával [160,161], és nagyobb, mint az előző réz(II)-Ac-HPHH-NH₂ rendszer esetén mért ~100-szoros gyorsítás.

A cink(II)komplexek által elősegített hpnp átésztereződés mechanizmusát már tárgyalták az irodalomban [164]. Hasonló folyamatokkal a cink(II)-Ac-KHPHPHQ-NH₂ rendszerben is számolni lehet. A $[ZnHL(OH)]^{2+}$ komplex (mint *Lewis*-sav) koordinációja a szubsztrátnak annak aktiválását eredményezi. Az aktív részecske koordinációs szférájában levő hidroxidionnak is jelentős szerepe lehet: a Zn-OH egység elősegítheti a szubsztrát 2-hidroxipropil csoportjának deprotonálódását, ezzel megkönnyítve a képződő alkoxid nukleofil támadását a foszforatomon.

6.4.4. DNS hidrolízisének vizsgálata

A nukleáz aktivitást mutató fémkomplexek előállításának az egyik meghatározó területe a biokémiai kutatásoknak [31,37,168]. Ismereteink szerint az eddig megjelent közleményekben a leghatékonyabbnak bizonyuló réz(II)-, nikkel(II)- és vas(III)komplexek esetén a DNS oxidatív roncsolódása következett be [169,170], míg egyes lantanoidkomplexek hidrolitikus aktivitása jól ismert, ezekről kimutatták, hogy újraligálható hidrolízistermékeket eredményeznek. Jelenleg is több kutatócsoport foglalkozik ezen katalitikus egységek bázis specifikusságával [171,172]. A vizsgált ligandumok cink(II)komplexeinek hidrolitikus hatásáról azonban eddig nem számoltak be.

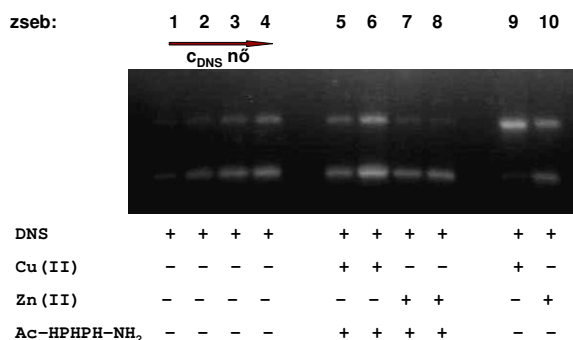
Méréseink során a kísérleti részben tárgyalt összes négytagú és annál nagyobb peptid fémkomplexeinek megvizsgáltuk a természetes makromolekuláris szubsztrát (pUC18 plazmid DNS) hidrolízisére kifejtett hatását, a kísérleti részben leírt körülmények mellett. A komplexek oldatához minden esetben, a részecskeeloszlásnak megfelelően, olyan pufferoldatot adtunk, hogy a fiziológiás pH közelében keletkező, várhatóan hidrolitikus aktivitással rendelkező részecskék hatékonyságát vizsgálhassuk. Minden esetben több párhuzamos kontrollkísérletet is végeztünk: vizsgáltuk, hogy azonos körülmények mellett, de fémkomplex, illetve ligandum vagy fémion távollétében és jelenlétében mi történik a DNS-sel. A reakció során először a kettős szálú DNS egyik szálán történhet véletlenszerű bemetszés (mivel az általunk vizsgált komplexek bázisspecifikusságot nem mutatnak), azaz a foszfátészter kötés hidrolízise csak egy szálon következik be. A bemetszés következtében a kiindulási, ún. szuperhelikális szerkezetű DNS (I. forma) ún. relaxált vagy nyílt cirkuláris DNS-sé (II. forma) alakul, mely lassabban vándorol az agarózgélben. Mivel bemetszések mindkét szálon megvalósulhatnak, amennyiben két elhidrolizált kötés kellően közel esik egymáshoz a DNS láncon belül – aminek a valószínűsége a bemetszések számának növekedésével nő –, kialakulhat a lineáris forma is, amely általában az I-es és II-es forma között fut a gélben.



6.4.10. ábra: A gélelektroforézis eredménye az Ac-HPHH-NH₂ ligandum réz(II)komplexeinek, valamint a réz(II)ionok aktivitása különböző pH értékeknél a DNS hidrolízisben (inkubálás 16 h, $T=310\text{ K}$, $c_{\text{Cu}^{2+}} = 0,9 \times c_L = 2,9 \times 10^{-4} - 1,2 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, a + jel jelöli a megfelelő komponens jelenlétét, a – jel annak hiányát az adott elegyben)

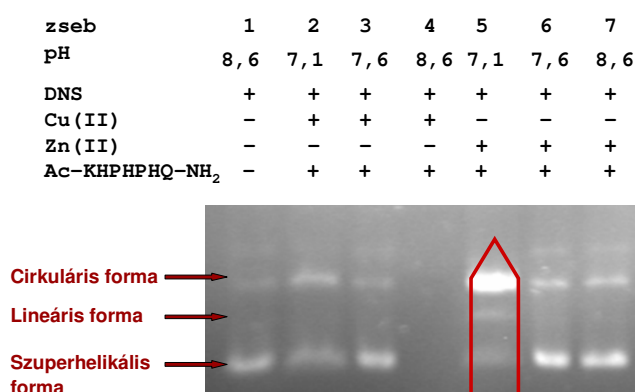
Az Ac-HPHH-NH₂ ligandum fémkomplexei esetén (6.4.10. ábra) a csak réz(II)iont tartalmazó oldatban pH 6,5-nél (3. zseb) történt DNS hasítás, de a növekvő koncentrációban alkalmazott réz(II)komplekek egyik pH értéken sem mutattak hidrolitikus aktivitást (4. – 11. zsebek). A 3. zsebben a hidratált réz(II)ion olyan hatékonynak bizonyult, hogy a nyílt forma mellett kis mennyiségben a DNS lineáris alakja is megfigyelhető. Ezen eredmények tehát egyrészt azt mutatják, hogy az Ac-HPHH-NH₂ réz(II)komplexei nem képesek a natív DNS hidrolitikus hasítására, másrészt azt is látjuk, hogy a ligandum jelenlétében nem volt aktív szabad fémion az oldatban. A réz(II)ion által mutatott nagy aktivitás pedig valószínűleg oxidatív roncsolás, nem pedig hidrolízis eredménye, aminek a gyakorlati haszna jóval kisebb, mint a hidrolitikus hasításé.

Hasonló eredményhez jutottunk az Ac-HPHPH-NH₂ pentapeptid réz(II)- és cink(II)komplexei esetében is. A csapadék kiválása előtt, pH 6,7 körül, ahol az oldategyensúlyi mérések szerint 25,5%-ban van jelen a CuH₁L részecske (34% CuL, 15,5% CuL₂ és 14% Cu^{II} mellett), valamint a 22%-ban megjelenő ZnH₁L (22% ZnL, 23% ZnL₂, 23% Zn^{II} mellett) vegyes hidroxokomplekek egyike sem mutatott hidrolitikus aktivitást. A 6.4.11. ábra tanúsága szerint, bár a tiszta DNS oldatában is megjelenik egy kevés nyílt cirkuláris forma (1. – 4. zseb), számottevő változás csak a szabad réz(II)ionok (9. zseb) jelenlétében tapasztalható, hasonlóan a korábbi eredményekhez.



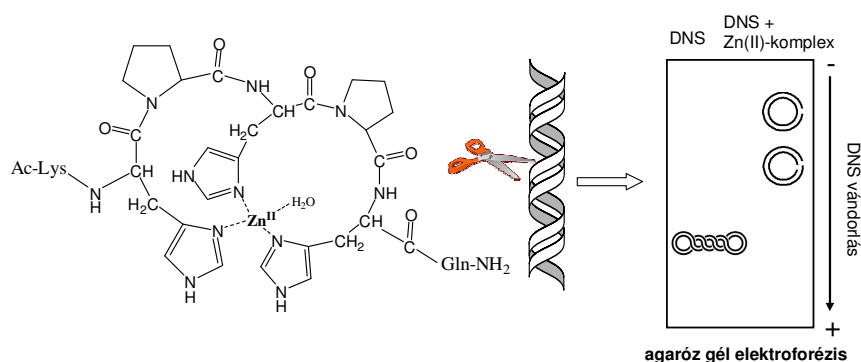
6.4.11. ábra: Az Ac-HPHPH-NH₂ ligandum réz(II)- és cink(II)ionok jelenlétében kialakított komplexei, valamint a réz(II)- és cink(II)ionok aktivitásának vizsgálata gélelektroforézis segítségével (pH = 6,7, inkubálási idő 16 h, $T = 310\text{ K}$, $c_{\text{Cu}^{2+}} = 0,9 \times c_L = 2,7 \times 10^{-4}$ illetve $5,4 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $c_{\text{Zn}^{2+}} = 0,9 \times c_L = 1,7 \times 10^{-4}$, illetve $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$)

A 6.2.3 fejezetben láttuk, hogy az Ac-KHPHPHQ-NH₂ esetében, tudomásunk szerint először, sikerült olyan peptidet előállítani, amelynek mind a réz(II)-, mind a cink(II)komplexei a teljes vizsgált pH tartományban oldatban maradtak, és ugyanakkor a réz(II)komplexekben az amid-nitrogén(ek) koordinációját is sikerült megakadályozni fiziológiás pH-n. Ez biztató eredmény a DNS hidrolízisének vizsgálata szempontjából, ami a kísérletek során igazolódni látszott. A **6.4.12. ábrán** látható, hogy a heptapeptid cink(II)ionok jelenlétében kialakított komplexe(i) pH 7,1-nél (5. zseb) olyan nagy hatékonysággal képesek a natív DNS-t hidrolitikusan hasítani, hogy a szuperhelikális forma szinte teljesen átalakul nyílt cirkulárisná, valamint – a kettős szálon egymáshoz közel eső egyszálú bemetszések következtében – kis mértékben a DNS lineáris formája is megjelenik. A pH növelésével, a részecskeeloszlás változásával megszűnik az aktivitás.



6.4.12. ábra: Az Ac-KHPHPHQ-NH₂ ligandum réz(II)- és cink(II)ionok jelenlétében kialakított komplexeinek a pUC18 hidrolízisére kifejtett aktivitása különböző pH értékeknél (inkubálás 16 h, T=310 K, $c_{\text{Cu}^{2+}} = 0,95 \times c_L = 2,3 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $c_{\text{Zn}^{2+}} = 0,90 \times c_L = 1,8 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$)

A **6.2.13.B ábrán** látható részecskeeloszlási diagram alapján valószínűsíthető hogy a pH 7,1-nél domináns [ZnHL]³⁺ komplex felelős a tapasztalt aktivitásért, és a **6.4.13. ábrán** sematikusan vázolt módon hidrolizálja a natív DNS-t. A lizin pozitív töltésének is szerepe lehet az aktivitásban, hisz ez elősegítheti a DNS-hez való kötődést.



6.4.13. ábra: A cink(II)-Ac-KHPHPHQ-NH₂ rendszerben képződő [ZnHL]³⁺ komplex natív DNS-re kifejtett nukleáz aktivitásának sematikus ábrázolása

A hidrolízis esetleges bázisszekvencia-specifikusságát nem vizsgáltuk, és a mechanizmus tisztázása is további kutatást igényel, de a tapasztalt nagy hatékonyság reményt ad arra, hogy ezen peptidszekvencia mesterséges nukleázok aktív központját alkothassa.

A DNS hidrolízisének vizsgálatát kiterjesztettük a P20 peptid cink(II)- és vas(III)ionokat különböző arányban tartalmazó oldataira is, de aktivitást ezekben az esetekben eddigi vizsgálataink során nem tapasztaltunk.

7. Összefoglalás

A metalloenzimek aktív központjának fémkomplexekkel történő modellezése során pontosabb képet kaphatunk az enzimek működési mechanizmusáról, az eredmények pedig hozzájárulhatnak új, mesterséges enzimek kifejlesztéséhez. Az eddigi vizsgálatok során több esetben sikerült megismerni a fémtartalmú fehérjék szerkezeti és funkcionális tulajdonságait kis molekulatömegű fémkomplexekkel történő modellezés révén. A vizsgálatokhoz a peptidek megfelelő választásnak tűnnek a fehérjékhez való hasonlóságuk miatt.

A bioszervetlen és koordinációs kémia területén belül a hisztidintartalmú peptidek átmenetifémion koordinációja részletesen vizsgált terület, melynek eredményeit nagyszámú közleményben foglalták össze. Köztudott, hogy a hisztidint tartalmazó peptidek fémion koordinációja igen változatos és bonyolult, valamint, hogy ezen peptidek rézkomplexeinek biológiai szerepe jelentős és szerteágazó. Néhány példát említve, a réz(II)-Xaa-Yaa-His komplexek egyes szérumban albuminok szerkezetének felderítésében segítettek, a réz(II)-Xaa-His-Yaa típusú peptidek a humán növekedési faktor modellkomplexeiként szolgáltak, illetve a réz(II)-His-Xaa-Yaa szekvencia megfelelőnek bizonyult a prion fehérjék szelektív réz(II)ion kötő régiójának modellezésére. Mivel a réz(II)ion koordinációja már a kistagszámú peptidkomplexeknél is erősen függ a hisztidin aminosav-sorrendben elfoglalt helyétől, ezért e rendszereket széles körben tanulmányozták. Ennek ellenére jelenleg is sok megválaszolatlan kérdés van a vizes közegben kialakuló egyes részecskék jelenlétére és oldatbeli szerkezetére vonatkozóan.

A kialakuló kötéstípusok megismeréséhez egyszerű, hisztidintartalmú tripeptidek réz(II)komplexeit vizsgáltuk, melyek a következők voltak: Xaa-Xaa-His, Xaa-His-Xaa és His-Xaa-Xaa, ahol Xaa = Gly vagy Ala. A biológiai szempontból is jelentős tripeptidek réz(II)komplexeinek kombinált potenciometriás, spektrofotometriás, cirkuláris dikroizmus (CD) és esetenként ESR spektroszkópiás vizsgálata hasznos, egymást kiegészítő információkat szolgáltat a réz(II)-peptidkomplexek oldatkémiai viselkedésének és szerkezetének megismerésében. A szerkezet és a CD spektrumok alakja közti összefüggésekből megállapítottuk, hogy a kelátgyűrűk királis hozzájárulása a tripeptidekben egymástól független, ezért additív módon jelentkezik. Vizsgálataink arra is rávilágítottak, hogy a hisztidin jelenléte a peptidekben jelentős királis hozzájárulást eredményez, ami minden esetben pozitív Cotton-effektusban nyilvánul meg, és ennek mértéke a hisztidinnek a szekvenciában elfoglalt helyével jelentősen változhat. Megállapítottuk, hogy további királis hozzájárulások figyelhetők meg a réz(II)ion koordinációs szférájában jelenlevő két ligandum egymással (sztérikus okokból) történő kölcsönhatása miatt. Rávilágítottunk arra, hogy néhány esetben szokatlan koordinációs mód valósul meg, és ezen részecskékre oldatbeli szerkezeteket javasoltunk. Eredményeink alátámasztják, hogy a CD hozzájárulások ismeretében, az oldategyensúlyi adatok segítségével számított moláris CD spektrumok alapján, kellő körültekintéssel, megjósolható számos réz(II)komplex oldatbeli szerkezete. Noha az eredmények nem általános érvényűek, általuk jobban megismerhetők a bonyolultabb rendszerek.

Munkánk során a biokoordinációs kémiai modellezés területén szerzett ismereteinket használva, megpróbáltunk olyan fémionkötő kismolekulákat tervezni és előállítani, melyek az enzimek aktív központjának szerkezeti és/vagy funkcionális modelljei lehetnek. A kis molekulatömegű peptidkomplexek, mint modellvegyületek, azonban számos hátránnyal rendelkeznek a természetes makromolekulákkal szemben. A metalloenzimek esetében ugyanis a fémion koordináció csupán a fehérje oldallánci donorcsoportjai révén valósul meg, míg a kistagszámú peptidek esetén, például a réz(II)ionok amid-nitrogén deprotonálódást indukálnak, a cink(II)ionokat tartalmazó oldatokból pedig az esetek többségében fiziológiás pH-n a fémion teljes vagy részleges hidrolízise miatt csapadék válik ki. A megfelelő oldallánci donorcsoportokkal ellátott oligopeptidekkel a fenti problémák várhatóan kiküszöbölhetőek. Ezért a hisztidinben gazdag peptidek réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)komplexeinek vizsgálatával jelenleg is számos kutatócsoport foglalkozik. Bár az eddig vizsgált ligandumok többségénél $\{3 \times \text{ImN}\}$ vagy $\{4 \times \text{ImN}\}$ koordinációt tartalmazó részecskék képződtek pH 5 – 7 tartományban, az amid-nitrogén deprotonálódást vagy a csapadék-képződést nem sikerült meggátolni semleges közegben. Munkánk során célul tűztük ki olyan oligopeptidek előállítását, melyeknél fiziológiás pH tartományban kiküszöbölhetőek a fenti problémák a komplexképződés során. Ez, amint az eredményeink mutatják, megvalósítható a prolin aminosav beépítésével, mely töréspontot jelent a sorozatos amid-nitrogén koordinációban. Így a kialakuló komplexekben makrokelát-szerű koordinációs mód valósul meg.

A fentiek alapján tehát különböző oligopeptid szekvenciákat terveztünk, nevezetesen az Ac-HisProHisHis-NH₂, Ac-HisProHisProHis-NH₂ és Ac-LysHisProHisProHisGln-NH₂ ligandumokat. Ezek a peptidek a természetes fehérjéhez hasonló koordinációs környezetet biztosíthatnak a cink(II)- és réz(II)ionok számára. A komplexek összetételét, speciációját és oldatbeli szerkezetét kombinált pH-potenciometriás titrálással, UV/látható, CD és ESR spektroszkópiás módszerekkel határoztuk meg.

A prolin jelenléte az N- és C-terminális csoportjain is védett, hisztidinben gazdag Ac-HisProHisHis-NH₂ peptid esetében elsőként egy három imidazol-nitrogén koordinációt tartalmazó stabil komplexet eredményezett. Réz(II)ionok jelenlétében pH 7 körül a $\{2 \times \text{ImN}, \text{N}^-, \text{H}_2\text{O}\}$ típusú koordináció jött létre, egy deprotonálódott amid-nitrogén részvételével. Ez a szerkezet fenntartható pH ~ 10-ig egy koordinálódott vízmolekula deprotonálódásával. Nikkel(II)ionok jelenlétében a fémion indukálta amid-nitrogén deprotonálódás csak pH 8 felett kezdődik, így a három imidazol-nitrogén koordinációt tartalmazó $[\text{NiL}]^{2+}$ a domináns részecske igen széles pH tartományban (pH 6,5 – 8,5). Ugyanakkor a csupán oldallánci imidazolgyűrűk koordinációjával kialakuló részecskék stabilitása nem volt elég nagy ahhoz, hogy a cink(II)ionokat oldatban tartsa pH 7 felett. Mindemellett a $\{3 \times \text{ImN}\}$ koordinációt tartalmazó részecskék bruttó stabilitási állandói mintegy egy nagyságrenddel kisebbek voltak, mint a HXHXH szekvenciát tartalmazó peptidek vízzoldható fémkomplexei esetén meghatározott értékek.

Az amid-nitrogén deprotonálódásának megakadályozása és a komplexek stabilitásának növelése érdekében egy további Pro aminosavat építettünk be a peptidszekvenciába. Az Ac-HisProHisProHis-NH₂ vizsgálata során mind a réz(II)-, mind a cink(II)ionok jelenlétében csapadék kiválását tapasztaltunk

pH 6,9 felett, a $[\text{CuH}_1\text{L}]^+$ és $[\text{CuH}_2\text{L}]^0$ részecskék megjelenésével párhuzamosan, annak ellenére, hogy a képződő törzskomplex stabilitása nagyobb volt, mint a megfelelő Ac-HisProHisHis-NH₂ komplexé. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a csapadék megjelenése a ligandumot is tartalmazó kis oldhatóságú, töltéssemleges komplex kiválásának a következménye.

A következő lépésben, az előbbi szekvencia megtartása mellett, a komplexek vízdoldhatóságát próbáltuk elérni semleges közegben, ezért előállítottuk az Ac-LysHisProHisProHisGln-NH₂ peptidet a pozitívan töltött Lys, illetve a hidrofíli oldalláncot tartalmazó Gln aminosavak beépítésével. A réz(II)- és cink(II)komplexek is vízdoldhatónak bizonyultak a teljes vizsgált pH tartományban (pH 2 – 11). A CD és UV/látható spektroszkópiás adatoknak megfelelően az amid-nitrogén deprotonálódás csak pH 9 felett történt, ami jelentős spektrális változást eredményezett. A peptid-nitrogén deprotonálódása a $\text{CuH}_1\text{L} = \text{CuH}_2\text{L} + \text{H}^+$ folyamathoz rendelhető, melyet a CD spektrumban megjelenő intenzív negatív csúcs jelez 350 nm körül. Fiziológiai pH körül a vegyes hidroxokomplexek dominálnak, főleg a cink(II)ionok esetében.

A hidrolitikus aktivitással rendelkező természetes enzimek aktív központjának mintájára, munkánk során megpróbáltunk néhány nagyobb tagszámú peptidet tervezni. Ennek alapjául a metallohidrolázok családjába tartozó, széles körben tanulmányozott bíborsav-foszfataáz (*BSF*) enzimcsaládot választottuk. Ezen enzimek mindegyike kétmagvú aktív központtal rendelkezik, egy Fe^{III} és egy M^{II} (ahol M^{II} = Fe^{II}, Zn^{II}, Mn^{II}) számára tartalmaz kötőhelyet, melyek elősegítik a foszforsav-észterek hidrolízisét. Munkánk célja tehát olyan peptidek előállítása volt melyek két fémiont is képesek megkötni, a *BSF* enzimek katalitikus központját alapul véve. Egy 20 és egy 24 aminosavból álló oligopeptidet választottunk ki vizsgálataink célpontjául (ezek szekvenciája P20: YKDPPTDHLQDVLDLPHHN és P24: DPPQVPHLYGLFQINDTVHGCCHN), melyek molekuláris dinamikai számítások alapján képesek stabil gerinckonformáció kialakítására, és bennük két fémion (Fe^{III} és Zn^{II}) számára található kötőhely. Első lépésként a peptidek előállítását és tisztítását mikrobiológiai módszerek segítségével végeztük, pGEX-6P plazmid vektor felhasználásával. Ezáltal az előállított peptidek N-terminális részén a Glutathion S-transzferáz (*GST*) fehérjemolekula található. A fúziós GST-P20 és GST-P24 fehérjék fémionkötő tulajdonságait SRCD spektroszkópia segítségével igazoltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy kis fémion felesleg esetén specifikus, nagyobb felesleg alkalmazásakor viszont nem-specifikus kölcsönhatás alakul ki a fehérje és a fémion között, mely végeredményben a fehérje denaturálódásához vezet. Önmagában a GST fehérje nem mutatott specifikus fémion kötést.

A továbbiakban szilárd fázisú peptidszintézis segítségével is előállítottuk a P20 peptidet, *Fmoc*-stratégiával. Vizsgáltuk a peptid oldatkémiai viselkedését cink(II)ionok jelenlétében, és fémionkötő tulajdonságait CD spektroszkópia segítségével.

A fehérjék előállításában és tisztításában a GST fúziós tagnak több előnye is van, mégsem ez a fúziós fehérje a célmolekula a későbbi vizsgálataink során. A mesterséges metalloenzimek előállítását

jövőbeni terveink szerint egy hidrolitikus aktivitással rendelkező peptid és egy nukleinsavkötő fehérje génjének összekapcsolásával tervezzük. Ily módon a fehérje tulajdonsága fogja a továbbiakban meghatározni a mesterséges metallohidroláz szubsztrát-specifikusságát, a fémionkötő peptid pedig az enzim aktív centrumát. Ezt az ötletet támasztják alá azok a vizsgálatok, miszerint egyes nukleáz enzimekben a fehérje más-más doménjei felelősek a hidrolitikus funkcióért és a szubsztrát megkötésért. A mesterséges metallonukleáz enzimek jelentőségét igazolja az a tény, hogy ígéretes felhasználási területük lehet például a génspecifikus (kemo)terápiában, vírusos, öröklődő, illetve rákos megbetegedések esetén, valamint a géntechnológiában és a rekombináns DNS technikában.

Eredményeink azt mutatták, hogy a vizsgált peptidkomplexek szerteágazó katalitikus aktivitással rendelkeznek: oxidatív (szuperoxid-dizmutáz vagy pirokatechin-oxidáz utánzó) és hidrolitikus (2-hidroxi-propil-4-nitrofenil-foszfát vagy plazmid DNS hidrolízis) aktivitással. A Cu(II)-Ac-HisProHisHis-NH₂ [CuH₁L]⁺ és [CuH₂L]⁰ komplexei többfunkciós modelleknek bizonyultak. Habár a [CuH₁L]⁺ részecske SOD-aktivitása közel harmincszor kisebbnek adódott, mint a természetes enzimé, mégis egyike az eddig vizsgált legaktívabb peptidkomplexeknek. A pirokatechin-oxidáz aktivitás vizsgálatok azt mutatták, hogy a [CuH₁L(OH)]⁰ részecske kimagasló katalitikus aktivitással bír ($k_{\text{kat}} = 0,12 \text{ s}^{-1}$) az egymagvú réz(II)komplexek körében. A Cu(II)- és Zn(II)-Ac-LysHisProHisProHisGln-NH₂ komplexek is hasonló aktivitást mutattak, de a pH 7,1 körül képződő cink(II)komplex egyedülálló hatást gyakorolt a kettős szálú cirkuláris DNS hasítására. A továbbiakban a kísérleti munkánk a P20 peptid katalitikus aktivitásának vizsgálatára irányul.

A fenti eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy sikerült olyan hisztidin-prolin gazdag minimális peptidszekvenciát találnunk, mely fiziológiás pH-n kizárólag az oldalláncban található donorcsoportokkal koordinálódik a fémionhoz, vízzeloldható vegyes hidroxokomplexek képződése mellett. A réz(II)- és cink(II)-Ac-LysHisProHisProHisGln-NH₂ komplexek esetében – ismereteink alapján először egymagvú oligopeptid-fémkomplexeinél – sikerült az amid-nitrogén deprotonálódást és a csapadékképződést is egyidejűleg megakadályozni. A vizsgált ligandumok réz(II)- és cink(II)komplexei jelentős redoxi és hidrolitikus aktivitással rendelkeznek. Ezek alapján a stratégiánk ígéretesnek bizonyul mind szerkezeti, mind funkcionális enzimmodellek kialakítására.

8. Summary

The study of metal complexes as models for metalloenzymes may provide a deeper insight into the enzymatic processes, and also it may serve as a basis for the development of artificial enzymes. In some cases the structural or functional properties of the active centre of metalloenzymes have been discovered by modelling the metal ion containing molecules with low molecular weight metal complexes. Peptides look as the obvious models for proteins, because of their similar composition.

In the bio-inorganic and complex chemistry field, the transition metal ion coordination to histidine containing peptides have been widely studied and the results are summarized into chapters of several reviews on metal-peptide interaction. It is well known, that histidine containing peptides exert a great variety of coordination modes toward metal ions, and the copper(II) complexes of these peptides are of significant biological importance, e.g. Cu(II)-Xaa-Yaa-His type complexes were utilized as models for certain serum albumins, Cu(II)-Xaa-His-Yaa type peptides as models for human growth modulating factor, or the His-Xaa-Yaa sequence came into forefront since it may mimic the selective copper(II) binding to the octarepeat region of prion proteins. Although the copper(II) coordination of these peptides, with histidine at different position, have been extensively investigated, there is still disagreement about the existence and the solution structure of some minor species in aqueous solutions.

To reveal the structural modalities, we have investigated the copper(II) complexes of the tripeptides Xaa-Xaa-His, Xaa-His-Xaa and His-Xaa-Xaa, where Xaa = Gly or Ala by combined pH-metry, spectrophotometry, circular dichroism (CD) and in part EPR spectroscopy. The combination of these methods give useful complementary information about the speciation and structure of the formed complexes. It has been shown that in certain complexes unusual coordination of the metal ion occurs and possible structures were proposed for these species. Concerning the structure – CD spectral relationships, we found that the chelate rings in the tripeptide complexes seem to be isolated from the point of view of their contribution to the chirality of the metal ion, thus their contributions are additive. Our results also showed that the coordinated side-chain of the histidine residue has a great contribution to the chirality, with a significant positive Cotton effect, the intensity of the CD band being strongly dependent on the position of histidine in the amino acid sequence of the peptide. We observed new contribution to the optical activity, caused by the steric or non-covalent interactions between two coordinated ligands. Our findings of the CD contributions allowed us to make an initial prediction on the structure of more complicated peptide complexes. However, such predictions can only be made when the molar CD spectra for the individual species are calculated, and certainly they are not decisive.

Applying the knowledge collected in the field of bio-coordination chemistry in modelling studies we attempted to design and prepare small metal binding molecules that may make up the functional and/or structural models of the enzymes' active centres. However, the use of short metal-binding peptides for modelling faces several difficulties. It is well known, that the metal ion coordination in metalloenzymes occurs mainly through the amino acid side-chains of the proteins. In

short peptides strongly competitive processes take place, like the amide nitrogen coordination in copper(II), and the hydrolysis of the metal ion in zinc(II)-containing systems, preventing the formation of suitable model complexes. The side-chain type coordination may be achieved by increasing the number of efficient donor groups. For these reasons the study of copper(II)-, nickel(II)- and zinc(II)-complexes of multihistidine peptides is a current hot topic in the literature. Although the ligands investigated so far form stable $\{3 \times \text{ImN}\}$ or $\{4 \times \text{ImN}\}$ coordinated complex species between pH 5 – 7, the amide nitrogen coordination or precipitation usually occurs at neutral pH. Thus one of our goals was to design an appropriate peptide sequence preventing both the amide-coordination and the hydrolysis at physiological pH. This, as demonstrated by our results, can be achieved by inserting the proline residue, which serves as a “break-point” in the successive amide nitrogen deprotonation. The interaction of the side chain donor groups with the metal ion, resulting in macrochelate or loop structures is promoted in this way.

Based on the above facts, we have designed different peptide sequences, namely Ac-HisProHisHis-NH₂, Ac-HisProHisProHis-NH₂, Ac-LysHisProHisProHisGln-NH₂. These peptides could provide similar coordination environment for zinc(II) and copper(II) ions as in many proteins, mimicking in this way the active centre of metalloenzymes. We characterized the equilibrium features of these oligopeptide complexes with copper(II), nickel(II) and zinc(II) ions in aqueous solution. The composition, speciation and the solution structure of the complexes have been studied by combination of pH-potentiometric titrations, UV/visible, EPR and CD spectroscopy.

In Ac-HisProHisHis-NH₂ the presence of a proline residue within the short (N- and C-terminally protected) multihistidine peptide resulted in the formation of a three imidazole-N coordinated species as a first stable complex. Around pH ~ 7 a $\{\text{ImN}, \text{N}_{\text{amide}}^-, \text{ImN}, \text{H}_2\text{O}\}$ coordinated copper(II) complex, possessing one bound amide nitrogen, formed. This structure was maintained up to pH 10, with deprotonation of a coordinated water molecule. The metal promoted amide deprotonation shifted to above pH 8 in the nickel(II) complex, therefore the three imidazole nitrogen coordinated $[\text{NiL}]^{2+}$ was the dominant species in a wide pH range (6.5 – 8.5). At the same time, the coordination of side chain imidazole rings alone was not able to keep zinc(II) in solution above pH 7, preventing further investigations. The overall formation constants of the $\{3 \times \text{ImN}\}$ coordinated species were by around one order of magnitude smaller than those published for HXHXH peptides.

To avoid the amide nitrogen deprotonation, and to increase the stability, a further Pro residue was inserted in the peptide sequence. In this case both in the Cu(II)- and in the Zn(II)-Ac-HisProHisProHis-NH₂ system precipitation was observed above pH 6.9, in parallel with the formation of $[\text{CuH}_1\text{L}]^+$ and $[\text{CuH}_2\text{L}]^0$ species. Since the precipitation occurred in spite of the higher stability of the parent complex compared to Ac-HisProHisHis-NH₂, we have determined the composition of the solid substance to be equal to the neutral complexes.

Thus to increase the solubility of the complex around the neutral pH, we have designed a new sequence containing a positively charged Lys, and a polar, uncharged Gln: Ac-KHPHPHQ-NH₂. The

copper(II), as well as, the zinc(II) complexes were soluble in the whole investigated pH range (pH 2 – 11). Concerning the CD and UV/visible spectroscopic data the amide nitrogen coordination appeared only above pH 9, resulting in fundamental changes in spectral parameters. It is most likely that the amide nitrogen coordination corresponds to the $\text{CuH}_1\text{L} = \text{CuH}_2\text{L} + \text{H}^+$ process, indicated *e.g.* by the intensive negative Cotton effect around 350 nm. However mixed hydroxo complexes dominate around physiological pH, particularly in the case of zinc(II) ions.

We have also tried to design somewhat longer peptides based on the active site of a natural enzyme with hydrolytic activity. One of the best candidate for this was the thoroughly studied metallophosphohydrolase family of purple acid phosphatases (*PAPs*), which utilize bimetallic active sites: one Fe^{III} and a second divalent ion, commonly Zn^{II} , Mn^{II} or Fe^{II} to facilitate phosphoester hydrolysis. The aim of our work was to synthesize artificial metalloenzymes based on the active centre of the *PAPs*. Using computational calculations we have found a 20 and a 24 amino acid containing peptides (the sequence of P20 is YKDPPTDHLQDVLDLPHHN and of P24 is DPPQVPHLYGLFQINDTVHGCCHN) able to form stable backbone conformation, with cavities for binding two metal ions: Zn^{II} and Fe^{III} . As a first step, by molecular biology tools the expression and purification of the above mentioned peptides was performed, using the pGEX-6P plasmid vector. In this way the Glutathione S-transferase (*GST*) is fused to the oligopeptide at the N-terminal part of the peptide. The metal ion binding has been proven by the SRCD experiments on GST-P20 and GST-P24 proteins. These results showed that at low metal ion to protein ratio a specific metal complex is formed, while at higher excess the non-specific binding dominates, causing the denaturation of the protein. The specific metal ion binding was not observed in GST protein itself.

In addition, we have also synthesized the P20 peptide by solid phase peptide synthesis, using the *Fmoc* strategy. We have investigated the solution chemical properties of the P20 peptide in the presence of zinc(II) ions and we have performed CD spectroscopic measurements.

Although the GST fusion tag represents a number of advantages both in the preparation and purification procedures, we have to note that GST is not the target fusion tag in our future investigations. Instead the genes of the potent short peptides, which possess hydrolytic activity in the presence of metal ions, can be fused to the genes of specific proteins binding the target molecules. Such artificial hydrolases are expected to show substrate specificity, determined by the nature of the fusion protein. The above idea is supported by investigations on certain nucleases enlightening that different domains of the protein are responsible for the hydrolytic function and for the substrate specificity. Thus, combined with recognition agents (*e.g.* a DNA binding protein), artificial nucleases are useful for the non-oxidative, sequence specific cleavage of nucleic acids and might become important tools in future biotechnology and medicine. The gene specific (chemo)therapy is one of the most promising application, *i.e.*, in the treatment of diseases involving the production of hazardous proteins. The gene technology is another promising area of artificial nucleases.

Based on our results, the investigated peptide complexes possess versatile catalytic activity: oxidative (superoxide dismutase- or catecholase-like activity) and hydrolytic activity (transesterification of 2-hydroxypropyl-4-nitrophenyl phosphate or the cleavage of plasmid DNA). In the case of Cu(II)-Ac-HisProHisHis-NH₂, the [CuH₁L]⁺ and [CuH₂L]⁰ complexes proved to be multifunctional model catalysts in redox and hydrolytic reactions with remarkable activity. Although the SOD-like activity of the [CuH₁L]⁺ complex is c.a. thirtyfold lower than that of the native enzyme, it is one of the most active peptide type model system reported so far. In the catecholase-like activity assay the above complex showed an outstanding activity for a mononuclear copper(II) complex. The activity was related to the [CuH₁L(OH)]⁰ species ($k_{\text{cat}} = 0.12 \text{ s}^{-1}$). The redox and hydrolytic activity of the Cu(II)- and Zn(II)-Ac-LysHisProHisProHisGln-NH₂ complexes were also investigated. We demonstrated a very high hydrolytic activity of the zinc(II) complexes at pH 7.1 in a cleavage assay of the double stranded circular DNA. Our future work is directed toward the investigation of the catalytic activity of the P20 peptide.

According to the above results, we could approach the minimal HP-rich peptide with increased solubility, which is able to bind metal ions solely by the amino acid sidechains at physiological pH in parallel with the formation of water-soluble mixed hydroxo complexes. Both the amide nitrogen coordination and the precipitation was hindered in the case of the copper(II)- and zinc(II)-Ac-LysHisProHisProHisGln-NH₂ complexes, which concerning to our knowledge is for the first time reported in the case of small mononuclear peptide complexes. The copper(II) and zinc(II) complexes of the investigated peptides showed remarkable redox and hydrolytic activity. Thus our strategy is promising for the preparation of both structural and functional enzyme models.

9. Rövidítések

C – Cys - cisztein
D – Asp - aszparaginsav
G – Gly - glicin
H – His - hisztidin
K – Lys - lizin
L – Leu - leucin
N – Asn - aszparagin
P – Pro - prolin
Q – Gln - glutamin
R – Arg - arginin
S – Ser - szerin
T – Thr - treonin
V – Val - valin
W – Trp - triptofán
Y – Tyr – tirozin

BSF (PAPs) – bíborsav-foszfátáz enzimek (purple acid phosphatases)

CHES – 2-[ciklohexilamino]-etánszulfonsav

dbsq – ditercbutil-semikinon gyök

DIEA – N,N-diizopropil-etilamin

DMF – N,N-dimetil-formamid

dtbq – 3,5-di-terc-butyl-1,2-benzokinon

Fmoc – 9-fluorenil-metoxi-karbonil

GST – Glutation S-transzferáz

H₂dtbc – 3,5-di-terc-butilpirokatechin

HBTU – 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium hexafluorofoszfát

HEPES – 4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-etánszulfonsav

HOBt – N-hidroxibenzotriazol

hnp – 2-hidroxipropil-4-nitrofenil foszfát

ImN – imidazol-nitrogén

LB – Luria Bertani táptalaj

MES – 2-[N-morpholino]-etánszulfonsav

N⁻ – amid-nitrogén

NBT – nitroblue-tetrazólium só

NH₂ – amino-nitrogén

NMP – 1-metil-2-pirrolidon

P20 – YKDPPTDHLQQRVLDLPHHN

P24 – DPPQVPHLYGLFQINDTVHGCCHN

PBS – Phosphate Buffered Saline = foszfát puffer (összetétele: 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄)

rpm – round per minute = fordulatszám

SDS-PAGE – Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gelelectrophoresis = nátrium-dodecil-szulfátos poliakrilamid gélelektroforézis

SOD – szuperoxide-dizmutáz

SPPS – szilárd fázisú peptidszintézis

TFA – trifluorecetsav

TRIS – trisz(hidroximetil)-aminometán

10. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **184**, 319
2. H. Kozłowski, T. Kowalik-Jankowska, M. Jezowska-Bojczuk, *Coord. Chem. Rev.*, 2005, **249**, 2323
3. M. Orfei, M.C. Alcaro, G. Marcon, M. Chelli, M. Ginanneschi, H. Kozłowski, J. Brasun, L. Messori, *J. Inorg. Biochem.* 2003, **97**, 299
4. I. Sóvágó, K. Ósz, *Dalton Trans.*, 2006, 3841
5. F.A. Cotton, G. Wilkinson, P.L. Gaus, *Basic Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, INC, 3rd Ed., Canada, 1995
6. W. Kaim, B. Schwederski, *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, John Wiley & Sons, INC, England, 2004
7. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, 5th Ed, New York, 2002
8. J.A. Tainer, E.D. Getzoff, J.S. Richardson, D.C. Richardson, *Nature (London)*, 1983, **306**, 284
9. R.H. Holm, P. Kennepohl, E.I. Solomon, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2239
10. B. Boka, A. Myari, I. Sovago, N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 113
11. T. Klabunde, C. Eicken, J.C. Sacchettini, B. Krebs, *Nat. Struct. Biol.*, 1998, **5**, 1084
12. R.J.P. Williams, *Polyhedron*, 1987, **6**, 61
13. J.B. Vincent, G.L. Olivier-Lilley, B.A. Averill, *Chem. Rev.*, 1990, **90**, 1447
14. D.E. Wilcox, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2435
15. D. Gani, J. Wilkie, *Struct. Bonding*, 1997, **89**, 133
16. W.N. Lipscomb, N. Strater, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2375
17. T. Klabunde, B. Krebs, *Struct. Bonding*, 1997, **89**, 177
18. A. Durmus, C. Eicken, B.H. Sift, A. Kratel, R. Kappl, J. Hüttermann, B. Krebs, *Eur. J. Biochem.*, 1999, **260**, 709
19. N. Strater, T. Klabunde, P. Tucker, H. Witzel, B. Krebs, *Science*, 1995, **268**, 1489
20. B.H. Sift, A. Durmus, W. Meyer-Klaucke, B. Krebs, *J. Synchrotron Rad.*, 1999, **6**, 421
21. S. Priggemeyer, P. Eggers-Borkenstein, F. Ahlers, G. Henkel, M. Körner, H. Witzel, H.-F. Nolting, C. Hermes, B. Krebs, *Inorg. Chem.*, 1995, **34**, 1445
22. E.L. Hegg, J.N. Burstyn, *Coord. Chem. Rev.*, 1998, **173**, 133
23. T. Klabunde, N. Strater, B. Krebs, H. Witzel, *FEBS Lett.*, 1995, **367**, 56
24. M. Merckx, B.A. Averill, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 6683
25. R. Cammack, *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.*, 1988, **32**, 297
26. C.T. Walsh, W.H. Orme-Johnson, *Biochemistry*, 1987, **26**, 4901
27. S. Benini, W. Rypniewski, K. Wilson, S. Ciarli, S. Mangani, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2001, **8**, 778
28. J. Wuerges, J.-W. Lee, Y.-I. Yim, H.-S. Yim, S.-O. Kang, K.D. Carugo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, **101**, 8569
29. D.P. Barondeau, C.J. Kassmann, C.K. Bruns, J.A. Tainer, E.D. Getzoff, *Biochemistry*, 2004, **43**, 8038
30. T. Gajda, *Acta Pharm. Hung.*, 2000, **70**, 109
31. R. Krämer, T. Gajda, *Perspectives on Bioinorganic Chemistry*, Vol. **4** (Szerk.: R.W. Hay, J.R. Dilworth, K.B. Nolan), JAI Press Inc., Stanford, 1999, 207
32. S. Kuusela, H. Lönnberg, *"Metal Ions in Biological Systems"*, Vol. **32** (Szerk.: A. Sigel, H. Sigel), Marcell Dekker Inc., New York, 1996, 271
33. G. Pratviel, J. Bernadou, B. Munier, *Adv. Inorg. Chem.*, 1998, **45**, 251
34. B.N. Trawick, A.T. Daniher, J.K. Bashkin, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 939
35. J.A. Cowan, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2001, **5**, 634
36. E. Kimura, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2000, **4**, 207
37. R. Ott, R. Krämer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **52**, 761
38. E. Gaggelli, H. Kozłowski, D. Valensin, G. Valensin, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 1995
39. A. Jancsó, Z. Paksi, N.I. Jakab, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, T. Gajda, *Dalton Trans.*, 2005, 3187
40. M. L. Pires dos Santos, A. Faljoni-Aláro, A. S. Mangrich, A. M. da Costa Ferreira, *J. Inorg. Biochem.*, 1998, **71**, 71
41. L. L. Constanzo, G. De Guidi, S. Giuffrida, E. Rizzarelli, G. Vecchio, *J. Inorg. Biochem.*, 1993, **50**, 273

42. M. González-Arvarez, G. Alzuet, J. Borrás, L. del Castillo Agudo, J. M. Montejo-Bernardo, S. Garcia-Granda, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2003, **8**, 112
43. R. P. Bonomo, V. Bruno, E. Conte, G. De Guido, D. La Mendola, G. Maccarone, F. Nicoletti, E. Rizzarelli, S. Sortino, G. Vecchio, *Dalton Trans.*, 2003, 4406
44. H. Ohtsu, Y. Shimazika, A. Odani, O. Yamauchi, W. Mori, S. Itoh, S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 5733
45. E.J., Billo, *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, 1974, **10**, 613
46. H. Sigel and R.B. Martin, *Chem. Rev.*, 1982, **82**, 385
47. E. Prenesti, P.G. Daniele, S. Berto, S. Toso, *Polyhedron*, 2006, **25**, 2815
48. S. Bruni, F. Cariati, P.G. Daniele, E. Prenesti, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2000, **56**, 815
49. T. Kiss, T. Gajda, B. Gyurcsik, *Bevezetés a bioszervetlen kémiába*, Nemzeti Tankönyvkiadó, 2007, 3. fejezet
50. J. H. Viles, E. Cohen, S. B. Prusiner, D. B. Goodin, P. E. Wright, H. J. Dyson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, **96**, 2042
51. E. Aronoff-Spencer, C. S. Burns, N. I. Avdievich, G. J. Gerfen, J. Peisach, W. E. Antholine, H. L. Ball, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, G. L. Millhauser, *Biochemistry* 2000, **39**, 13760
52. S. Lehmann, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002, **6**, 187
53. I. Sóvágó, *Metal complexes of peptides and their derivatives*, *Biocoordination Chemistry*, (K. Burger szerk.), Ellis Hoorwood, London, 1990, IV. fejezet, 135
54. I. Sóvágó, E. Farkas, A. Gergely, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1982, 2159
55. A. Yokoyama, H. Aiba and H. Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1974, **47**, 112
56. R.P. Agarwal, D.D. Perrin, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1975, 268
57. L.D. Pettit, J.E. Gregor, H. Kozlowski, *Perspectives on Bioinorg. Chem.*, 1991, **1**, 1
58. T. Szabó-Plánka, N.V. Nagy, A. Rockenbauer, L. Korecz, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 3483
59. E. Farkas, I. Sóvágó, A. Gergely, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1983, 1545
60. G. Brooks, L.D. Pettit, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1975, 2112
61. I. Sovago, G. Petocz, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1987, 1717
62. P. Daniele, O. Zerbinati, R. Aruga, G. Ostacoli, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1988, 1115
63. M. Remelli, Ch. Conato, A. Agarossi, F. Pulidori, P. Mlynarz, H. Kozlowski, *Polyhedron*, 2000, **19**, 2409
64. A. Demaret, A. Ensuque, G. Lapluye, *J. Chim. Phys.*, 1983, **80**, 475
65. E.J. Billo, D.W. Margerum, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 6811
66. W. Bal, H. Kozlowski, R. Robbins, L.D. Pettit, *Inorg. Chim. Acta*, 1995, **231**, 7
67. C.E. Livera, L.D. Pettit, M. Bataille, B. Perly, H. Kozlowski, B. Radomska, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1987, 661
68. E. Farkas, I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1984, 611
69. P.G. Daniele, O. Zerbinati, V. Zelano, G. Ostacoli, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1991, 2711
70. P.J. Morris, R.B. Martin, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1971, **33**, 2913
71. C. Conato, H. Kozlowski, J. Swiatek-Kozlowska, P. Mlynarz, M. Remelli, S. Silvestri, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 153
72. R.B. Martin, J.T. Edsall, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, **82**, 1107
73. R.P. Agarwal, D.D. Perrin, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1975, 1045
74. C. Harford, B. Sarkar, *Acc. Chem. Res.*, 1997, **30**, 123
75. E. C. Long, *Acc. Chem. Res.*, 1999, **32**, 827
76. T. Gajda, B. Henry, A. Aubry, J.-J. Delpuech, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 586
77. J-P. Laussac, B. Sarkar, *Biochemistry*, 1984, **23**, 2832
78. R.P. Agarwal, D.D. Perrin, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1977, 53
79. K. Várnagy, J. Szabó, I. Sóvágó, G. Malandrinos N. Hadjiliadis, D. Sanna, G. Micera, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2000, 467
80. D. Sanna, C.G. Agoston, I. Sovago, G. Micera, *Polyhedron*, 2001, **20**, 937
81. C. S. Burns, E. Aronoff-Spencer, Ch.M. Dunham, P. Lario, N. I. Avdievich, W. E. Antholine, M.M. Olmstead, A. Vrielink, G. J. Gerfen, J. Peisach, W.G. Scott and G. L. Millhauser, *Biochemistry*, 2002, **41**, 3991
82. G.F. Bryce, R.W. Roeske, F.R.N. Gurd, *J. Inorg. Biochem.*, 1965, **240**, 3837
83. P. Stanczak, H. Kozlowski, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, **352**, 198
84. M. Mylonas, A. Krezel, J.C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, W. Bal, *J. Molec. Liquids*, 2005, **118**, 119

85. M.A. Zoroddu, M. Peana, T. Kowalik-Jankowska, H. Kozlowski, M. Costa, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2002, 458
86. W. Bal, J. Lukszo, M. Jozowska-Bojczuk, K.S. Kasprzak, *Chem. Res. Toxicol.*, 1995, **8**, 683
87. W. Bal, J. Lukszo, K. Bialkowski, K. S. Kasprzak, *Chem. Res. Toxicol.*, 1998, **11**, 1014
88. P. Gockel, R. Vogler, H. Vahrenkamp, *Chem. Ber.*, 1996, **129**, 887
89. P. Gockel, M. Gelinsky, R. Vogler, H. Vahrenkamp, *Inorg. Chim. Acta*, 1998, **272**, 115
90. D. Valensin, F. M. Mancini, M. Luczkowski, A. Janicka, K. Wisniewska, E. Gaggelli, G. Valensin, L. Lankiewicz, H. Kozlowski, *Dalton Trans.* 2004, 16
91. R. P. Bonomo, L. Casella, L. De Gioia, H. Molinari, G. Impellizzeri, T. Jordan, G. Pappalardo, R. Purello, E. Rizzarelli, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997, 2387
92. Cs. Kállay, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, *Dalton Trans.*, 2006, 4545
93. D. Sanna, G. Micera, Cs. Kállay, V. Rigó and I. Sóvágó, *Dalton Trans.*, 2004, 2702
94. O. Spiga, M. Scarselli, A. Bernini, A. Ciutti, L. Giovannoni, F. Laschi, L. Bracci, N. Niccolai, *Biophys. Chem.*, 2002, **97**, 79
95. P. Stanczak, M. Luczkowski, P. Juszczak, Z. Grzonka, H. Kozlowski, *Dalton Trans.*, 2004, 2102
96. M. Casolaro, M. Chelli, M. Ginanneschi, F. Laschi, L. Messori, M. Muniz-Miranda, A.M. Papini, T. Kowalik-Jankowska, and H. Kozlowski, *J. Inorg Biochem.*, 2002, **89**, 181
97. M. Luczkowski, K. Wisniewska, L. Lankiewicz, H. Kozlowski, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2002, 2266
98. R. Vogler, H. Vahrenkamp, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2002, 761
99. L.A. Gaither, D.J. Eide, *BioMetals*, 2001, **14**, 251
100. H. Kozlowski, *Proceedings of the 9th Conference on Coordination Chemistry*, Smolenice, 1983, p. 201
101. M. Bezer, L.D. Pettit, I. Steel, M. Bataille, S. Djemil, H. Kozlowski, *J. Inorg. Biochem.*, 1984, **20**, 13
102. L.D. Pettit, I. Steel, T. Kowalik, H. Kozlowski, M. Bataille, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1985, 1201
103. L.D. Pettit, W. Bal, M. Bataille, C. Cardon, H. Kozlowski, M. Leseine-Delstanche, S. Pyburn, A. Scozzafava, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1991, 1651
104. W.C. Chan, P.D. White, *Fmoc solid phase peptide synthesis, A Practical Approach*, Oxford Univ. Press, 2000
105. Fekete Jenő, *Folyedékkromatográfia elmélete és gyakorlata*, Edison House, 2006
106. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1985, 1195
107. L. Zékány, I. Nagypál, G. Peintler, *PSEQUAD for chemical equilibria*, Technical Software Distributors: Baltimore, MD, 1991
108. A. Rodger, B. Nordén, *Circular Dichroism and Linear Dichroism*, Oxford Univ. Press, 1997
109. K.E. van Holde, W.C. Johnson, P. Shing Ho, *Principles of Physical Biochemistry*, Prentice-Hall Inc., 1998, 10. fejezet
110. B.A. Wallace, R.W. Janes, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2001, **5**, 567
111. W.K. Purves, D. Sadava, G.H. Orians, H.C. Heller, *Life: The Science of Biology*, Vol. I., Ed. Sinauer Assoc. Inc., 2001, 17. fejezet
112. M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248
113. A. Ducruix, R. Giegé, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, Practical Approach*, Oxford Univ. Press, 1992
114. Teresse M. Bergfors, *Protein Crystallization: Techniques, Strategies, and Tips, A Laboratory Manual*, International Univ. Line, La Jolla, USA, 1999
115. R. G. Bates, *Determination of pH*, John Wiley & Sons, New York, 2nd Ed., 1964, 226
116. C.H. Rochester, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1972, 5
117. R. Oesterberg, B. Sjöberg, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1975, **37**, 815
118. Sh.-J. Lau, Th. P. A. Kruck, B. Sarkar, *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, 5878
119. Sh.-J. Lau and B. Sarkar, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1981, 491
120. R.W. Hay, M.M. Hassan, Ch. You-Quan, *J. Inorg. Biochem.*, 1993, **52**, 17
121. K. Takehara, Y. Ide, *Inorg. Chim. Acta*, 1991, **183**, 195
122. G. Peintler, I. Nagypál, A. Jancsó, I.R. Epstein, K. Kustin, *J. Phys. Chem. A.*, 1997, **101**, 8013

123. B. Gyurcsik, I. Vosekalna, E. Larsen, *Acta Chem. Scand.*, 1997, **51**, 49
124. B. Gyurcsik, I. Vosekalna, E. Larsen, *J. Inorg. Biochem.*, 2001, **85**, 89
125. P.J. Moris, R.B. Martin, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1971, **33**, 2913
126. I. Török, T. Gajda, B. Gyurcsik, G.K. Tóth, A. Péter, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1998, 1205
127. G. Facchin, M.H. Torre, E. Kremer, E.J. Baran, A. Mombrú, H. Pardo, M.P. Araujo, A.A. Batista, A.J. Costa-Filho, *Inorg. Chim. Acta*, 2003, **355**, 408
128. A. Yokoyama, H. Aiba, H. Tanaka, *Chem. Lett.*, 1972, 489
129. R. Wilson, D. Kivelson, *J. Chem. Phys.* 1966, **44**, 154
130. G.F. Bryce, F.R.N. Gurd, *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 1439
131. W. Bal, M. Jezowska-Bojczuk, K.S. Kasprzak, *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, **10**, 906
132. G. Pappalardo, G. Impellizzeri, R.P. Bonomo, T. Campagna, G. Grassia, M. Grazia Saita, *New J. Chem.*, 2002, **26**, 593
133. M. Klewpatinond, J.H. Viles, *FEBS Letters*, 2007, **581**, 1430
134. Cs. Kállay, K. Ősz, A. Dávid, Z. Valastyán, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, I. Sóvágó, *Dalton Trans.*, 2007, 4040
135. K. Kulon, D. Valensin, W. Kamysz, G. Valensin, P. Nadolski, E. Porciatti, E. Gaggelli, H. Kozłowski, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 960
136. B. Radomska, I. Sovago, T. Kiss, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1990, 289
137. B.N. Trawick, A.T. Daniher, J.K. Bashkin, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 939
138. L. Rulíšek, Z. Havlas, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 10428
139. L. Rulíšek, Z. Havlas, *J. Phys. Chem. A*, 2002, **106**, 3855
140. L. Rulíšek, Z. Havlas, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 2376
141. GST Gene Fusion System, *Handbook*, Amersham Biosciences, 2001
142. D. B. Smith, K. S. Johnson, *Gene*, 1988, **67**, 31
143. M.W. Parker, M. Lo Bello, G. Federici, *J. Mol. Biol.*, 1990, **213**, 221
144. J. Jancarić, S.H. Kim, *J. Appl. Cryst.*, 1991, **24**, 409
145. K. Lim, J.X. Ho, K. Keeling, G.L. Gilliland, X. Ji, F. Ruker, D.C. Carter, *Prot. Sci.*, 1994, **3**, 2233
146. M.R. Malachowski, J. Carden, M. G. Davidson, W. L. Driessen, J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta*, 1997, **257**, 59
147. J. Reim, B. Krebs, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997, 3793
148. P. Gentshev, N. Möller, B. Krebs, *Inorg. Chim. Acta*, 2000, **300-302**, 442
149. C. Fernandes, A. Neves, A.J. Bortoluzzi, A.S. Mangrich, E. Rentschler, B. Szpoganicz, E. Schwingel, *Inorg. Chim. Acta*, 2001, **320**, 12
150. J. Kaizer, J. Pap, G. Speier, L. Párkány, L. Korecz, A. Rockenbauer, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **91**, 190
151. A. Neves, L.M. Rossi, A.J. Bortoluzzi, B. Szpoganicz, C. Wiezbicki, E. Schwingel, W. Haase, S. Ostrovsky, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 1788
152. I.A. Koval, K. Selmečzi, C. Belle, C. Philouze, E. Saint-Aman, I. Gautier-Luneau, A.M. Schuitema, M. van Vliet, P. Gamez, O. Roubeau, M. Lüken, B. Krebs, M. Lutz, A.L. Spek, J.-L. Pierre, J. Reedijk, *Chem. Eur. J.*, 2006, **12**, 6138
153. J. Ackermann, S. Buchler, F. Meyer, *C. R. Chimie*, 2007, **10**, 421
154. N.A. Rey, A. Neves, A.J. Bortoluzzi, C.T. Pich, H. n Terenzi, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 348
155. K. Born, P. Comba, A. Daubinet, A. Fuchs, H. Wadepohl, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2007, **12**, 36
156. J. Chen, R. Russo, W. Chao, L.D. Margerum, M.R. Malachowski, R. White, Z. Thawley, A. Thayer, A.L. Rheingold, L.N. Zakharov, *Dalton Trans.*, 2007, 2571
157. J. Muller, K. Felix, C. Maichle, E. Lengfelder, J. Strahle, U. Weser, *Inorg. Chim. Acta*, 1995, **233**, 11
158. Y. Jin, J.A. Cowan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 8408
159. R. Nagane, T. Koshigoe, M. Chikira, *J. Inorg. Biochem.*, 2003, **93**, 204
160. P. Rossi, F. Felluga, P. Tecilla, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, P. Scrimin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 6948
161. P. Rossi, F. Felluga, P. Tecilla, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, P. Scrimin, *Biopolymers*, 2000, **55**, 496
162. P. Rossi, P. Tecilla, L. Baltzer, P. Scrimin, *Chem. Eur. J.*, 2004, **10**, 4163
163. K. Yamada, Y.-I. Takahashi, H. Yamamura, S. Araki, K. Saito, M. Kawai, *Chem. Comm.*, 2000, 1315

164. J.R. Morrow, O. Iranzo, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2004, **8**, 192
165. T. Gajda, A. Jancsó, S. Mikkola, H. Lönnberg, H. Sirges, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2002, **8**, 1757
166. S. Albedyhl, D. Schnieders, A. Jancsó, T. Gajda, B. Krebs, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2002, **6**, 1400
167. F. Mancin, P. Tecilla, *New J. Chem.*, 2007, **31**, 800
168. A. Sreedhara, J.A. Cowan, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2001, **6**, 337
169. T. Hirohama, Y. Kuranuki, E. Ebina, T. Sugizaki, H. Aarii, M. Chikira, P. T. Selvi, M. Palaniandavar, *J. Inorg. Biochem.*, 2005, **99**, 1205
170. Y. Jin, M.A. Lewis, N.H. Gokhale, E.C. Long, J.A. Cowan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 8353
171. I. Boll, L. Kovbasyuk, R. Krämer, T. Oeser, A. Mokhir, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 2781
172. Y. Yamamoto, M. Mori, Y. Aiba, T. Tomita, W. Chen, J.-M. Zhou, A. Uehara, Y. Ren, Y. Kitamura, M. Komiyama, *Nucl. Acids Res.*, 2007, DOI:10.1093/nar/gkm052

Függelék

F.1. A GST-fúziós fehérjék előállítása és tisztítása ioncsere, illetve affinitás kromatográfiával

Gazdasejtek (*E. coli* BL21) előkészítése CaCl_2 -os módszerrel. Az *E. coli* baktériumot 10 cm^3 táptalajon, 37°C hőmérsékleten felnevesztjük $0,5 - 0,7 \text{ OD}_{600}$ -ig, majd jégen lehűtjük és 4°C -on, 15 percig 4000 rpm fordulatszámon centrifugáljuk. A sejteket ezt követően 5 cm^3 ($\frac{1}{2}$ térfogatnyi) $0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ MgCl}_2$ oldattal felfuszpendáljuk, azonnal 10 percig centrifugáljuk (4000 rpm) és végül a felülúszót leöntjük. Ezután 1 cm^3 $0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ CaCl}_2$ oldatban, amely permeabilissá teszi a sejtmembránt, ismét felfuszpendáljuk, majd egy órán át jégen állni hagyjuk.

Transzformálás, azaz a plazmid bejuttatása a sejtbe:

- Általános módszer: az előkészített sejteket $0,2 \text{ cm}^3$ -ként szétosztjuk steril kémcsövekbe, majd hozzáadjuk a DNS-t ($1-2 \text{ }\mu\text{l}$) és fél órán át jégen állni hagyjuk; ezt követi a hősokkolás, amit 42°C hőmérsékleten végzünk 1,5 percig. Ezután a kémcső(vek)be 1 cm^3 steril LB tápoldatot teszünk, és 1 órára 37°C hőmérsékletű vízfürdőbe tesszük. Az így előkészített sejtekből $\sim 150 \text{ }\mu\text{l}$ -t lemezelünk.
- Gyors módszer: csak ampicilinre szelektálható transzformálásnál használható ez a módszer. $200 \text{ }\mu\text{l}$ *E. coli* kompetens sejthez hozzáadunk $1-2 \text{ }\mu\text{l}$ plazmid DNS-t és jégen állni hagyjuk 10 percig, majd következik a hősokkolás, ami 2 percig tart, 42°C -on. Az így előkészített sejteket rögtön lehet lemezelni.

Lemezelés és a baktériumtörzsek növesztése: a lemezelés során az agarózgél lemezekben baktérium telepeket növesztünk. Az alkoholba mártott, majd leégetett üvegeszköz segítségével a lemezre cseppentett transzformált sejteket óvatosan szétterítjük a gélen, megszáritjuk, és egy éjszakán keresztül 37°C -on növesztjük a kolóniákat. Másnap reggel egy törzset kiválasztva, azt az LB tápoldatba (20 cm^3) oltjuk, hozzáadunk $20 \text{ }\mu\text{l}$ ampicilint (100 mg/cm^3), majd 37°C -on növesztjük a baktériumokat, amíg a szuszpenzió eléri a megfelelő OD_{600} $0,6 - 0,8$ értéket.

Indukálás, vagyis a plazmidba kódolt célfehérje termelésének megindítása. A baktériumok $3 - 4$ órán át történő növesztése után, a sejtek kellő mennyiségben lesznek jelen, így a következő lépés az indukció. Mivel esetünkben a protokoll még nem volt ismert, ezért a 20 cm^3 oldatot két részre osztjuk, és csak az egyik felénél végezzük el az indukciót; az indukálatlan sejtek egy részt glicerinen -80°C -on tároltuk. Az indukciót $10 \text{ }\mu\text{l}$, $1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ IPTG-vel végezzük. A plazmidban mindig jelen van egy „promoter” régió, amely a laktóz analóg IPTG hozzáadását követően elindítja az mRNS nagy mennyiségű termelését, ezzel megkezdődik transzkripció, és a riboszómák elkezdik termelni a fehérjét. Az indukált oldatot is két részre osztjuk, és az egyik részt 30°C -on, míg a másik 37°C hőmérsékleten növesztjük tovább, $2 - 3$ órán át, a megfelelő hőmérsékletű rázógépben.

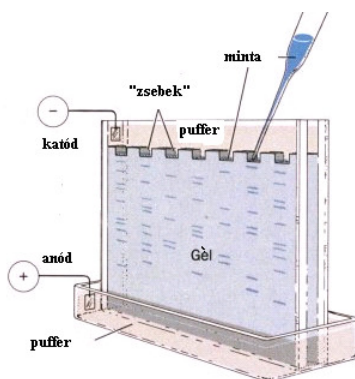
Roncsolás: Az indukciós idő letelte után ($2 - 3$ óra) következik a centrifugálás, 13000 rpm fordulatszámmal, 4°C -on. A fölülúszó vákuummal eltávolítható. A sejteket -20°C hőmérsékleten tárolhatjuk. A következő lépésben a sejteket 1 cm^3 foszfátpufferben felfuszpendáljuk, és ultrahanggal roncsoljuk a sejtfalat. Teljes feltisztulásig, $\sim 7 - 8$ -szor 15 másodpercig, közben 15 másodpercet várunk, hogy a szuszpenzió ne melegedjen fel. A szétroncsolt sejtek centrifugálását ismét $12-13000 \text{ rpm}$ -en végezzük, $10-15$ percig, 4°C -on. A végén a felülúszóból mintát veszünk a gélelektroforézishez.

Gélelektroforézis (BioRAD): SDS PAGE

A nátrium-dodecil-szulfátos poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) a fehérjék molekulatömeg szerinti eloszlásának vizsgálatára használt módszer. A fehérjék eredeti konformációja

redukálószer (például β -merkaptotanol, mely a fehérjében lévő diszulfid hidakat redukálja) és denaturálószer (detergensek, például Na-dodecil-szulfát) jelenlétében megváltozik, és egységes pálcikára emlékeztető alakot vesz fel, felületükön méretükkel arányos mennyiségű, negatív töltésű dodecil-szulfát-iont megkötve. Ezen fehérjekomplexek töltéssűrűsége közel állandó értékű lesz, így állandó feszültség mellett, az egyes fehérjék azonos sebességgel vándorolnak a gélben. A poliakrilamidgél pórusátmérője azonban elég kicsi ahhoz, hogy molekulaszűrőként viselkedjen, és a fehérjék méretükkel arányos sebességgel fussanak a gélben. Ezért az SDS-PAGE jól alkalmazható a fehérjék molekulatömegének meghatározására, ismert molekulatömegű fehérjékkel való kalibrálás alapján. A gélelektroforézis történhet vízszintes vagy az általunk is használt függőleges helyzetű kádban (f.1. ábra).

Az elkészített poliakrilamidgélre felvisszük a mintákat (15 μ l). A futtatáshoz 10-szeresre hígítjuk az elektródpuffert (összetétel lásd F.2.) (~ 500 cm³ szükséges), és 200 V feszültséget használva 35 – 40 perc alatt, végigfuttatjuk a fehérjét a gélen, a pozitív pólus irányába. Az egyik zsebben minden esetben fehérje markert futtatunk (5 μ l), amely tartalmaz ismert molekulatömegű, esetünkben 14 és 116 kDa közötti mérettartományt átölelt fehérjéket.



f.1. ábra: Gélelektroforézis függőleges kádban

A fehérjék rögzítése és láthatóvá tétele a gélen:

A futtatás befejeztével a gél kivesszük a két üveglap közül, amelyek segítségével a függőleges kádba helyeztük, majd *fixíroldattal* kicsapjuk a fehérjét, ennek leöntése után pedig a *festőoldattal* tesszük láthatóvá a fehérjéket. A festékkel teli kádban 15 percig óvatosan rázogatójuk a gél, majd vízzel, ezt követően pedig fixíroldattal rázogatóva mossuk mindaddig, amíg a gél színe ismét áttetsző lesz, vagyis az összes felesleges festék kidiffundált a gélből.

Az eredmények alapján az általunk használt protokoll jónak bizonyult, ezért nagyobb mennyiségben is elkezdjük a fehérjék előállítását. A -80°C hőmérsékleten tárolt transzformált sejtekből egy cseppet 10 cm³ LB tápoldatba oltunk. Ehhez 10 μ l ampicilint adunk és 37°C-on, egy éjszakán át növesztjük a baktériumokat, majd ezzel oltjuk be a 200 cm³ tápoldatot. 3 – 4 óra elteltével hozzáadjuk az IPTG-t (200 μ l) az indukáláshoz, majd további 3 órán keresztül növesztettük a sejteket a 37°C hőmérsékletű inkubátorban. Ezután a már fent leírt receptet követtük: centrifugálás 4°C-on, PBS pufferben való felszuszpendálás, ultrahangos roncsolás teljes feltisztulásig, újabb centrifugálás 18000 rpm fordulatszámmal, 0°C-on, 30 percig, majd a fölülúszót lepipettázzuk a sejtörmelékről.

Tisztítás: a fúziós fehérje tisztítását hidegszobában kell végezni, ahol a hőmérséklet folyamatosan 4°C, ezzel elkerülve a hosszadalmas munka során esetlegesen bekövetkező degradálódást. Az affinitás kromatográfia előtt célszerűnek láttunk egy előtisztítást végezni. Mivel az ioncsere kromatográfia az egyik leggyakrabban használt módszer peptidek és fehérjék tisztítására, mi is ezt választottuk. Az **anioncsere kromatográfiához** *diethyl-amino-ethyl-cellulóz* polimert használtunk, melyet egy 30 ml-es oszlopba töltöttünk, tízszeresre hígított PBS pufferrel átmostunk. Az előkezelt DEAE oszlopra felvittük az oldatot. Az elúció az elválasztandó molekula méretétől, töltésétől függően különböző pH-jú és/vagy sótartalmú pufferekkel történhet. Esetünkben a fehérjét növekvő koncentrációjú NaCl sóoldattal tudjuk lemosni ($c_{\max} = 1 \text{ mol/dm}^3$ NaCl PBS-ben), és $\sim 10 \text{ cm}^3$ frakciókat szedünk. A frakciók vizsgálatához a gélre felvittük a markert (5 μl), a fölülúszót (10 μl), az átfolyómosó oldatot (15 μl), és az egyes frakciókat (15 μl). Az SDS PAGE-ből kiderült, hogy a fehérje mely frakcióban van jelen.

A következő lépés az **affinitás kromatográfia**. Az affinitás kromatográfia a biomolekulák specifikus kölcsönhatásán alapuló elválasztási módszer. Az állófázisként alkalmazott mátrix, ha enzimekről van szó, akkor általában egy koenzimet vagy szubsztrátot (ligandum) hordoz a felületén. Ehhez az elválasztandó molekula specifikusan és reverzibilisen kötődik, míg az egyéb fehérjék könnyen lemoshatók az oszlopról. Az elúció megfelelően megválasztott oldatokkal történik, például az elválasztandó molekula szubsztrátját tartalmazó pufferrel. Esetünkben a fehérje tisztítása során az állófázison rögzített szubsztrát a glutation (GluCysGly) volt, amihez a GST fúziós fehérje szubsztrátspecifikus enzimként reverzibilis kölcsönhatással kötődik, de feleslegben alkalmazott redukált glutationnal a fehérje leoszorítható az oszlopról.

A tisztítás során egy kilyukasztott Eppendorf csövet megtöltöttük a *Glutathion Sepharose 4B* géllal, majd átmostuk PBS pufferrel. Erre az oszlopra vittük fel a megfelelő frakciókat, amit egy pufferrel történő mosás követett. A megkötődött fehérjét 50 cm^3 , $50 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ TRIS-HCl (pH=8,0) pufferben feloldott 0,154 g redukált glutationnal ($20 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ mostuk le. Az SDS PAGE segítségével megbizonyosodtunk arról, hogy a fehérje tiszta, majd dializáltuk az oldatot.

Dialízis: a cellulóz alapú dializáló zsák egyik végét csipesszel összefogjuk, beletöltjük a fehérjeoldatot és a másik végét is lezárjuk, majd a zsákot egy főzőpohárba téve, amelybe előzőleg beletöltjük az 500 cm^3 dializáló puffert (összetétel lásd F.2.), hidegszobában másnapig kevertetjük, mágneses keverő segítségével. A fehérje a zsák pórusain nem tud kivándorolni, a glutation viszont igen. Ezután az elkészült fehérjét -20°C -on tároljuk.

Koncentráció meghatározás: Bradford módszer segítségével végezzük. A Bradford módszer [112] gyors és egyszerű módja a fehérjekoncentráció meghatározásának, 5-100 μg mennyiségekben. A módszer lényege, hogy a Coomassie Brilliant Blue G-250 színe megváltozik, halvány barnából kékre vált, pontosabban 465 nm-ről 595 nm-re tolódik el az abszorpció maximuma, amikor a fehérjéhez kötődik, mind hidrofób, mind ionos kölcsönhatás kialakulása során. A fehérjéből kiveszünk 5 vagy 10 μl -t, hozzáadunk 1 μl Bradford reagenst és vízzel 100 μl -re egészítjük ki. Megmérjük az oldatok abszorbanciáját, majd egy ismert koncentrációjú standard fehérjeoldatok segítségével készített kalibrációs egyenes segítségével meghatározzuk a koncentrációt.

F.2. A mikrobiológiai munka során használt oldatok és a gélek elkészítéséhez szükséges anyagok

I. Oldatok az SDS PAGE-hez (minden oldatot steril desztillált vízzel készítettem):

A vegyszerek Sigma termékek voltak, a kivételeket a megfelelő helyen jelöltem.

1. 4-szeres töménységű szeparálógél-puffer: 500 cm³

1,5 mol/dm³ TRIS-HCl (pH 6,8): 9,8 g TRIS

0,4 % SDS: 2 g SDS

2. 4-szeres töménységű rétegzőgél-puffer: 200 cm³

0,5 mol/dm³ TRIS-HCl (pH 6,8): 12,11 g TRIS

0,4 % SDS: 0,8 g SDS

3. 10-szeres töménységű elektródpuffer: 1000 cm³

0,25 mol/dm³ TRIS-HCl: 30,275 g TRIS

1,92 mol/dm³ glicerín: 144,1 g glicerín

1 % SDS: 10 g SDS

4. Rögzítő és mosó folyadék: 1000 cm³

100 cm³ ecetsav

100 cm³ etanol

800 cm³ desztillált víz

5. SDS festőpuffer: 1000 cm³

Commasie Blue R250: 2,5 g

etanol: 454 cm³

feloldás után hozzáadunk:

desztillált vizet (UltraPure víz): 454 cm³

ecetsavat: 80 cm³

6. Szeparálógél: SDS –PAGE-hez (két gélhez elegendő, 2 × 3,6 – 3,8 cm³ szükséges)

UP víz: 5 cm³

rétegző puffer: 2,5 cm³

akril-amid (40%): 2,5 cm³

APS (ammónium-perszulfát) (10 %(m/m): 100 µl

TEMED (tetrametiletiléndiamin): 10 µl

7. Koncentrálógél: (két gélhez elegendő, 2 × 1,0 – 1,2 cm³ szükséges)

UP víz: 4,25 cm³

szeparáló puffer: 1,5 cm³

akril-amid (40%): 0,75 cm³

APS: 60 µl

TEMED: 6 µl

8. 5-szörös töménységű SDS felvevőpuffer: 10 cm³

1×10⁻³ mol/dm³ TRIS-HCl (pH 7,0): 3,0 cm³

SDS festő: 1 g

β-merkapto-etanol: 2,5 cm³

87% glicerín: 4,0 cm³

II. További szükséges anyagok:

9. Tápoldat (LB oldat): 1000 cm³

NaCl: 5 g

élesztő kivonat: 5 g

TRIPTON: 10 g

1000 cm³ desztillált víz

10. 10-szeres töménységű PBS foszfát puffer:

1,400 mol/dm³ NaCl

0,100 mol/dm³ Na₂HPO₄

20×10⁻³ mol/dm³ KH₂PO₄

11. Dializáló puffer: 500 cm³

0,100 mol/dm³ NaCl: 10 cm³, 5 mol/dm³

50 % (V/V) glicerín: 250 cm³

50×10⁻³ mol/dm³ TRIS-HCl (pH=8,0): 25 cm³, 1 mol/dm³

UP víz: 215 cm³

12. Bradford reagens:

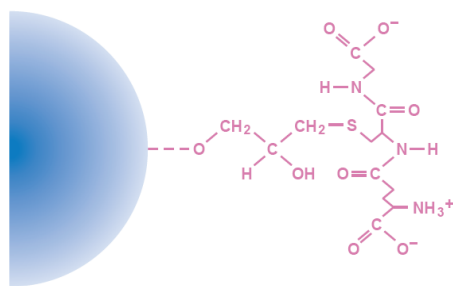
Bradford reagens összetétele: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250-t feloldanak 50 cm³ 95% etanolban, hozzáadunk 100 cm³ 85 % (m/m) foszforsavat, és 1000 cm³-re egészítjük ki a festék teljes feloldódása után.

13. Fehérje marker (MBI Fermentas):

A fehérjék molekulatömegei kDa egységben: 116,0; 66,2; 45,0; 35,0; 25,0; 18,4; 14,4. A marker oldatának összetétele: 0,1 – 0,2 mg/ cm³ mind a hét fehérje esetében, 62,5 × 10⁻³ mol/dm³ Tris-HCl (pH 7,5) pufferben, 1 × 10⁻³ mol/dm³ EDTA, 2% SDS, 50 × 10⁻³ mol/dm³ DTT, 30 × 10⁻³ mol/dm³ NaCl, 1 × 10⁻³ mol/dm³ NaN₃, 0,01% brómfenol kék és 50% glicerol.

14. Glutathion Sepharose 4B (Amersham Biosciences):

A glutathiont (GluCysGly) a szilárd hordozóra oxirán csoporttal rögzítik. A glutathion szerkezete komplementere a *Glutathion S-transzferáz* (GST) fehérje kötőhely szerkezetének, ezért megkötődik a gélen, de redukált glutationnal lemosható róla.



f.2. ábra: A Glutathion Sepharose gél sematikus ábrázolása

F.3. A mikrobiológiai munka során használt GST fúziós fehérje kristályszerkezete



f.3. ábra: A dimer GST (*Schistosoma japonicum* Glutathion S-transferáz, SjGST) fehérje kristályszerkezete (a nyílak a C-terminális részt jelölik) [145]

F.4. A GST-P20 szekvenciája

	1	11	21	31	41	51	
1	MSPILGYWKI	KGLVQPTRLL	LEYLEEKYEE	HLYERDEGDK	WRNKKFELGL	EFPNLPYYID	60
61	GDVKLTQSMA	IIRYIADKHN	MLGGCPKERA	EISMLEGAVL	DIRYGVSRIA	YSKDFETLKV	120
121	DFLSKLP EML	KMFEDRLCHK	TYLNGDHVTH	PDFMLYDALD	VVLYMDPMCL	DAFPKLVCFK	180
181	KRIEAI PQID	KYLKSSKYIA	WPLQGWQATF	GGGDHPPKSD	LEVLFQG PLG	SPEF YKDPPT	240
241	DHLD	QRVLDLPHHN	LE	RPHRD			

f.4. ábra: A GST-P20 aminosav-sorrendje, pirossal kiemelve a P20 peptid szekvenciája (késsel a GST szekvenciája, míg feketével jelölve a klónozáshoz szükséges egyéb aminosavak szerepelnek)

F.5. A GST-P24 szekvenciája

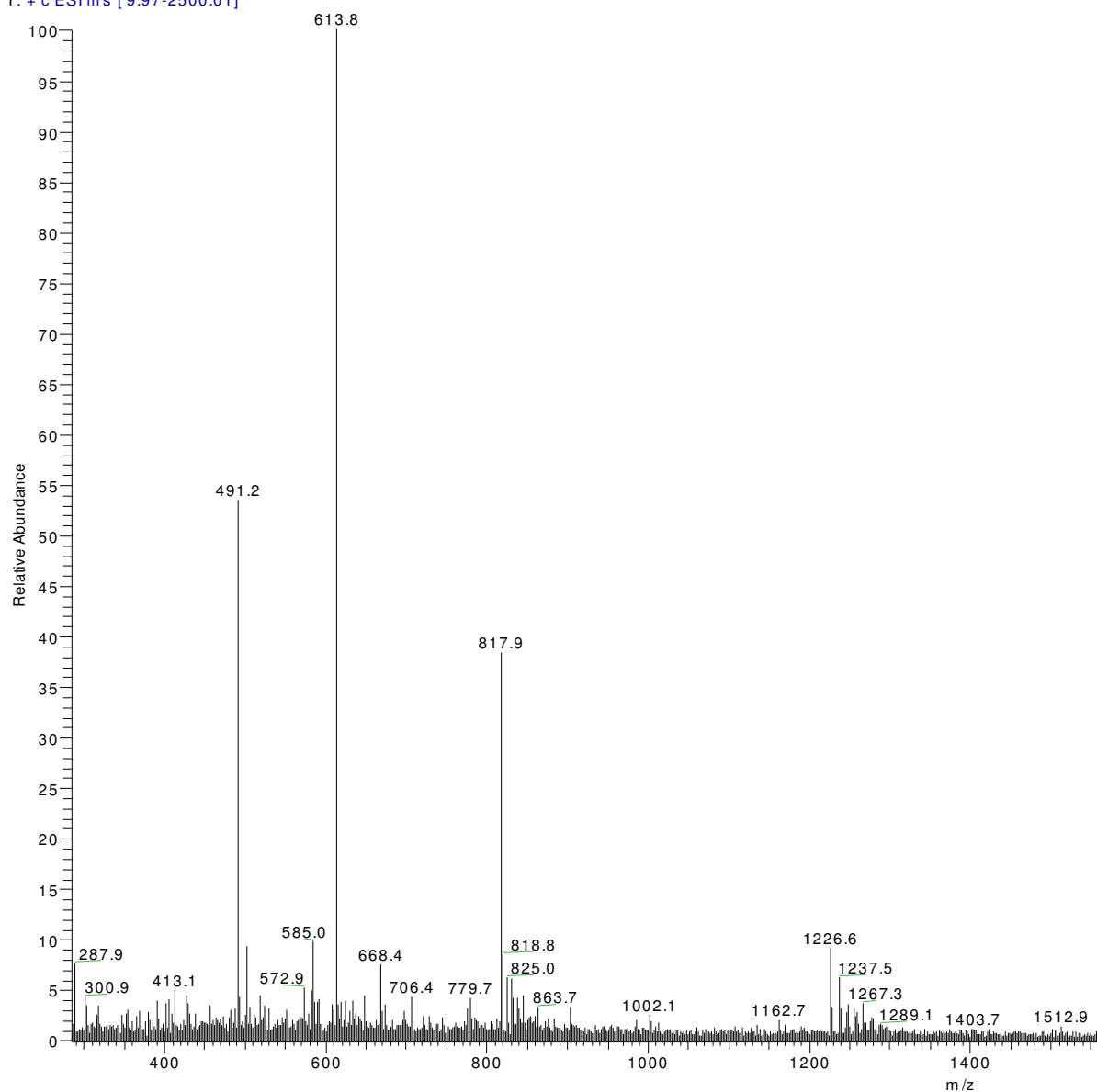
	1	11	21	31	41	51	
1	MSPILGYWKI	KGLVQPTRLL	LEYLEEKYEE	HLYERDEGDK	WRNKKFELGL	EFPNLPYYID	60
61	GDVKLTQSMA	IIRYIADKHN	MLGGCPKERA	EISMLEGAVL	DIRYGVSRIA	YSKDFETLKV	120
121	DFLSKLP EML	KMFEDRLCHK	TYLNGDHVTH	PDFMLYDALD	VVLYMDPMCL	DAFPKLVCFK	180
181	KRIEAI PQID	KYLKSSKYIA	WPLQGWQATF	GGGDHPPKSD	LEVLFQG PLG	SPEF DPPQVP	240
241	HLYGLFQIND	TVHGCCHN	LE	RPHRD			

f.5. ábra: A GST-P24 szekvenciája, pirossal kiemelve a P24 peptid aminosav-sorrendje (késsel a GST szekvenciája, míg feketével jelölve a klónozáshoz szükséges egyéb aminosavak szerepelnek)

F.6. Ac-P20-NH₂ tömegspektruma

A számolt monoizotópos molekulatömeg 2451,7 g/mol, a spektrumon a kétszeresen-, háromszorosan-, négyszeresen- és ötszörösen protonált molekulaion megfelelő m/z értéke látható (1226,6; 817,9; 613,8; 491,2).

sztl060524 #48-56 RT: 2.02-2.36 AV: 9 NL: 5.96E5
T: + c ESI ms [9.97-2500.01]



A disszertáció alapját képező közlemények*

- (1.) **I.N. Jakab**, B. Gyurcsik, T. Körtvélyesi, I. Vosekalna, J. Jensen, E. Larsen: "Design of histidine containing peptides for better understanding of their coordination mode toward copper(II) by CD spectroscopy", *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2007, 101, 1376-1385 IF = 3,663
- (2.) **I.N. Jakab**, A. Jancsó, T. Gajda, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer: "The coordination behaviour of N-acetyl-His-Pro-His-His-NH₂ peptide toward copper(II), nickel(II) and zinc(II) ions", *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2008, **102**, 1438-1448 IF = 3,663
- (3.) **I.N. Jakab**, O. Lőrincz, A. Jancsó, T. Gajda, B. Gyurcsik: „Approaching the minimal metal ion binding peptide for structural and functional metalloenzyme mimicking”, *Dalton Transactions*, elfogadva IF = 3,212
- (4.) **I.N. Jakab**, Zs. Jenei, B. Gyurcsik, T. Gajda, T. Körtvélyesi, A. Mikulová, L. Rulíšek, T. Raskó, A. Kiss: „Design, synthesis and metal ion binding properties of a peptide mimicking the active centre of purple acid phosphatases”, *Achievements In Coordination, Bioinorganic And Applied Inorganic Chemistry*, 2007, **8**, 80-90 (Monograph Series of the International Conferences on Coordination and Bioinorganic Chemistry held periodically at Smolenice in Slovakia, Eds: M. Melník, J. Šima, M. Tatarko, ISBN 978-80-227-2647-4; ISSN 1335-308X; Slovak Technical University Press, Bratislava.)

Egyéb közlemények

- (5.) **I.N. Jakab**, K. Hernádi, D. Méhn, T. Kollár, I. Pálínkó: "Anchoring copper–amino acid complexes on silica or in montmorillonite", *Journal of Molecular Structure*, 2003, 651-653, 109-114 IF = 1,122
- (6.) I. Labádi, I. Szilágyi, **I.N. Jakab**, K. Hernádi, I. Pálínkó: "Metal complexes immobilised on porous matrices - possible enzyme mimics", *Materials Science*, 2003, 21, 235-244 IF = 0,099
- (7.) **I.N. Jakab**, K. Hernádi, J.T. Kiss, I. Pálínkó: "Covalent grafting of copper-amino acid complexes onto chloropropylated silica gel - an FT-IR study", *Journal of Molecular Structure*, 2005, 744-747, 487-494 IF = 1,440
- (8.) A. Jancsó, Z. Paksi, **I.N. Jakab**, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, and T. Gajda: "Solution chemical properties and catecholase-like activity of the copper(II)-Ac-His-His-Gly-His-OH system, a relevant functional model for copper containing oxidases", *Journal of the Chemical Society: Dalton Transactions*, 2005, 3187-3194 IF = 3,003
- (9.) **I.N. Jakab**, É. Szabó, K. Hernádi, I. Pálínkó: "The synthesis and the catalytic (catalase and tyrosinase) activities of amino acid copper complexes covalently grafted onto silica gel", Proc. 8th Pannonian Intern. Catal. Symp., Sampling Catalysis Research in the Pannonian Region, Szeged (Hungary); (Ed. I. Pálínkó), Hungarian Zeolite Association, Szeged, 2006, pp. 51-56

ΣIF = 16,202

Konferenciák

- (1.) **I.N. Jakab**, K. Hernádi, D. Mehn, T. Kollar, I. Pálínkó: "Anchoring copper-amino acid complexes on silica or in montmorillonite – an FT-IR study" (előadás); *26th European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS XXVI)*, 2002. szeptember 1 - 6, Villeneuve d'Ascq, Franciaország

* A szerző születési neve: **Jakab Ida Noémi**

- (2.) **I.N. Jakab**, Z. Paksi, B. Gyurcsik, M. Győr, T. Gajda: “II-es típusú rézfehérjék szerkezeti és funkcionális modellezése multihisztidin peptidok segítségével” (előadás); *XXXIX. Komplexkémiái Kollokvium*, 2004. május 26 - 28, Agárd-Gárdony, Magyarország
- (3.) **Z. Paksi**, **I.N. Jakab**, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, T. Gajda: “Multihisztidin peptidok réz(II)- és cink(II)komplexeinek oldatkémiai vizsgálata és DNS-sel való kölcsönhatása” (előadás); *XXXIX. Komplexkémiái Kollokvium*, 2004. május 26 - 28, Agárd-Gárdony, Magyarország
- (4.) **I.N. Jakab**, É. Szabó, K. Hernádi, **I. Pállinkó**: “The synthesis and catalytic activities of amino acid copper complexes covalently grafted onto silica gel” (poszter); *13th International Congress on Catalysis*, 2004. július 11 - 16, Párizs, Franciaország
- (5.) **I.N. Jakab**, K. Hernádi, J.T. Kiss, **I. Pállinkó**: “Covalent grafting of copper-amino acid complexes onto chloropropylated silica gel – an FT-IR study” (poszter); *XXVII European Congress on Molecular Spectroscopy*, 2004. szeptember 5 - 10, Kraków, Lengyelország
- (6.) **T. Gajda**, **I.N. Jakab**, Z. Paksi, B. Gyurcsik: “Metallopeptides mimicking the structure and/or function of metalloenzymes” (előadás); *International Symposium on Metals, Environment and Health*, 2004. június 24 - 27, Szklarska Poreba, Lengyelország
- (7.) **I.N. Jakab**, T. Gajda, B. Gyurcsik, T. Raskó, A. Kiss, R. Lubomir: “Bíborsav-foszfataz enzimek aktív centrumának modellezése” (előadás), *XL. Komplexkémiái Kollokvium*, 2005. május 18 - 20, Dobogókő, Magyarország
- (8.) **I.N. Jakab**, B. Gyurcsik, T. Gajda, T. Raskó, A. Kiss: “Fémionkötő peptidok tervezése, előállítás és vizsgálata - a bíborsav foszfataz enzim aktív centrumának modellezése” (előadás), *XLI. Komplexkémiái Kollokvium*, 2006. május 31- június 2, Mátrafüred, Magyarország
- (9.) **Z. Paksi**, A. Jancsó, **I.N. Jakab**, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, T. Gajda: “Solution chemical properties and catecholase-like activity of the copper(II)-Ac-His-His-Gly-His-OH system, a relevant functional model for copper containing oxidases” (poszter), *Eurobic8*, 2006. július 1 - 6, Aveiro, Portugália
- (10.) **I.N. Jakab**, B. Gyurcsik, T. Gajda, A. Kiss: “Design, preparation and investigation of metal binding peptides – models for the active site of the purple acid phosphatases” (poszter), *2nd International IMBG Meeting on Metals in Biocatalysis*, 2006. szeptember 24 - 27, Autrans, Franciaország
- (11.) **A. Jancsó**, Z. Paksi, **I.N. Jakab**, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, T. Gajda: “Catecholase-like activity and solution chemical properties of the copper(II) complex of a multihistidine tetrapeptide, a functional model for copper containing oxidases” (poszter), *2nd International IMBG Meeting on Metals in Biocatalysis*, 2006. szeptember 24 - 27, Autrans, Franciaország
- (12.) **B. Gyurcsik**, **I.N. Jakab**, A. Kolozsi, A. Jancsó, T. Gajda: “Nukleáz hatású peptidkomplexek tervezése és vizsgálata” (előadás), *XLII. Komplexkémiái Kollokvium*, 2007. május 23 - 25, Mátrafüred, Magyarország
- (13.) **B. Gyurcsik**, **I.N. Jakab**, A. Kolozsi, A. Jancsó, T. Gajda: “Nukleáz hatású peptidkomplexek tervezése és vizsgálata” (előadás), *Centenárium vegyészkonferencia*, 2007. május 29 - június 2, Sopron, Magyarország
- (14.) **I.N. Jakab**, Zs. Jenei, **B. Gyurcsik**, T. Gajda, T. Körtvélyesi, L. Rulíšek, T. Raskó, A. Kiss: “Design, synthesis and metal ion binding properties of a peptide mimicking the active centre of purple acid phosphatases” (előadás), *XXI. International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry (ICCBIC)*, 2007. június 3 - 8, Smolenice, Szlovákia

(15.) **I.N. Jakab**, O. Lorincz, T. Gajda, B. Gyurcsik “Metalloenzyme mimicking His-Pro-rich peptide complexes” (poszter), *Graduate School on Metal Ions in Biological systems (MIBS) – Characterization methods in biological systems*, 2007. június 18 - 21, Søminestationen, Holbæk, Dánia

(16.) **I.N. Jakab**, B. Gyurcsik, T. Gajda, T. Körtvélyesi: „Az L-hisztidin-glicin-Cu(II)komplexeinek konformációs analízise” (előadás), Kemometria és Molekulamodellzés Munkabizottság – 7. KeMoMo-QSAR miniszimpózium, 2007. december 6 - 7, Szeged, Magyarország

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Kiss Tamás tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetőséget biztosított számomra a tanszéken a Ph.D. munkám elkészítéséhez, és hogy ez alatt az évek alatt mindvégig biztatott és segített céljaim elérésében.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Gyurcsik Bélának és Gajda Tamásnak, a szakmai és emberi támogatásukért; amiért munkámat mindvégig figyelemmel kísérték, biztattak, és akiknek hasznos tanácsai és segítsége nélkül nem szerezhettem volna jártasságot a bioszervetlen kémia és a koordinációs kémiai vizsgálati módszerek terén. Külön köszönettel tartozom Gyurcsik Bélának, aki bevezetett a molekuláris biológia mesés világába.

Köszönettel tartozom Jancsó Attilának a kinetikai vizsgálatokban nyújtott elengedhetetlen segítségéért, és baráti támogatásáért.

Szeretnék köszönetet mondani Pálinkó Istvánnak, aki egyetemi hallgató korom óta figyelemmel kísérte és segítette munkámat.

Köszönöm Kiss Antalnak és Raskó Tamásnak, az MTA-SZBK Biokémiai Intézet munkatársainak, hogy biológiai szaktudásukkal segítették munkámat. Köszönettel tartozom Kele Zoltánnak (SzTE Orvosi Vegytani Intézet) az MS mérésekért.

Megköszönöm a két külföldi kutatócsoport vezetőjének, Erik Larsennek (The Royal Veterinary and Agricultural University (KVL), Koppenhága, Dánia) és Hans E. M. Christensennek (Technical University of Denmark (DTU), Lyngby, Dánia), hogy laboratóriumaikban dolgozhattam, és hasznos szakmai tanácsaikkal segítették munkámat.

Hálás vagyok munkatársaimnak, a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék minden jelenlegi és egykori dolgozójának, akik támogatásukkal, türelmükkel és tanácsaikkal segítették munkámat, és mindennekfelett kellemes baráti légkört teremtettek.

Köszönetet szeretnék mondani minden barátomnak, akik az elmúlt években mellettem voltak.

Hálával tartozom szüleimnek, testvéremnek és férjemnek, akikre bármikor számíthatok.