



KELÁTKÉPZŐ DONORCSOPORTOT TARTALMAZÓ PEPTIDSZÁRMAZÉKOK ÁTMENETIFÉM-KOMPLEXEI

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Ősz Katalin

Témavezető: *Dr. Sóvágó Imre* egyetemi tanár

Debreceni Egyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Debrecen, 2003

1. Bevezetés és célkitűzések

Különböző fémionok fontos szerepet játszanak az élő szervezetek szerves molekuláinak szintézisében és szállításában, illetve biológiai rendszerek sav-bázis- és redoxifolyamatainak a katalizálásában. Az egyik legfontosabb fémmegkötőhelyet a proteinek képezik. Ezek találhatóak meg a metalloenzimekben is, ahol a fémionok a polipeptidlánc speciális aminosavjaihoz (pl. a hisztidin aminosav imidazolil-oldalláncához) kötődnek. Metalloenzimeknél a fémion lehet csupán az enzim harmadlagos szerkezetét stabilizáló passzív tényező, azonban igen gyakran aktív szerepet is játszik a katalízis folyamatában. Részt vehet a szubsztrát kötésében, a reakció intermedierjeinek a stabilizálásában és magában a katalizált redoxireakcióban is.

Metalloenzimekben a hisztidin kétféle szerepet játszhat: egyrészt a fémiont koordinálja az imidazolnitrogénjén keresztül, másrészt – az imidazolil-oldallánc pirrol-típusú nitrogénjének deprotonálódása után – hídligandumként köthet össze két fémcentrumot.

A **réz** a növény- és állatvilágban egyaránt elterjedt, és redoxireakciói számos biológiai oxidációs folyamatban játszanak szerepet. Az élő szervezetben a réz többnyire fehérjékhez kötött formában (rézproteinekben) fordul elő. A biológiai szempontból aktív rézproteineket három fő típusba lehet sorolni:

- 1. *típusú* vagy “*kék*”-*rézproteinek*: egyetlen rézet tartalmaznak egy erősen torzult, [2·N(imidazol), S(tiol), S(tioéter)]-donoratomok által meghatározott koordinációs környezetben. Ezek a metalloenzimek főleg redoxireakciókat katalizálnak (pl. a növényekben előforduló lakkáz és aszkorbinsav-oxidáz, valamint a emlősökben megtalálható ceruloplazmin).
- 2. *típusú rézproteinek*: szabályos monomer réz(II)komplexekre jellemző torzult oktaéderes koordináció valósul meg, erős ekvatoriális és igen gyenge axiális kölcsönhatásokkal (pl. szuperoxid-diszmutázok).
- 3. *típusú rézproteinek*: két réz(I)iont tartalmaznak, mindkét réz hisztidil-oldalláncokon keresztül kapcsolódik a fehérjéhez. Ezen enzimek az oxigénmolekula transzportjában és aktiválásában vesznek részt (ilyen pl. a puhatestűekben előforduló hemocianin).

Újabban egy *4. típust* is javasolnak, ami egy három réz(II)ionból álló egységet jelöl. Szintén nem sorolható az első három csoportba a *citokróm-c oxidáz*, melyben kétféle réz van: a Cu_A a mitokondrium membránján kívül helyezkedik el, míg a Cu_B egy vasatommal csatolva a membránon belül található.

A **nikkel** egyik biológiai szerepe 1975-ben nyert bizonyítást, amikor is a már 50 éve ismert “*jack bean urease*” enzim nikkeltartalmát egyértelműen azonosították. Az *ureázok* a karbamid hidrolízisét katalizálják. Nikkeliont tartalmazó metalloenzimek emellett a baktériumokban előforduló [NiFe]- és [NiFeSe]-*hidrogenázok*, melyek az oxigén és a

hidrogén vízzé való alakulását katalizálják. A *szénmonoxid-dehidrogenáz* enzim szintén tartalmaz – vas mellett – nikkelt is, és a szénmonoxid széndioxiddá való oxidációját katalizálja. Emellett kis spinszámú, síknégyzetesen torzult nikkell(II)ion található a *metil-koenzim M redukáz*ban, mely a széndioxid metánná való konverziójában vesz részt.

Szintén nikkell- és réz(II)iont tartalmaznak az “*ATCUN motif*” (Amino Terminal Cu(II)-, Ni(II)-binding) modellek, melyben a ligandum bármilyen, szabad N-terminális aminocsoportot és harmadik helyen hisztidint tartalmazó peptid (albumin) lehet. Az albumin egyik legfontosabb feladata különböző kismolekulák és ionok szállítása, beleértve a szervezetben előforduló fémionokat is. Ezen peptidek alkalmasak emellett a DNS-lánc specifikus hasítására, azaz mesterséges restikációs endonukleázok.

A **cink** biológiai szempontból az egyik legfontosabb fémion, így metalloenzimekben is sokkal elterjedtebb központi ion, mint a réz(II)- vagy nikkell(II)ion. Azok az enzimek, amelyek karbonsavészterek, amidok, peptidek vagy foszfátok hidrolízisében vesznek részt, majdnem mindig cink(II)iont tartalmaznak az aktív centrumban. Cink(II)iont tartalmazó enzim pl. a *szénsavanhidráz*, *karboxipeptidáz*, *termolizin*, *alkohol-dehidrogenáz*, *szuperoxid-diszmutázok* és az *elasztáz*. A cink egy újabban felfedezett szerepe azokhoz a fehérjékhez kapcsolódik, amelyek a DNS bázisszekvenciájának a felismerésében játszanak szerepet, a genetikai információ átadását szabályozzák. Ezek az úgynevezett “cink ujjak” (zinc fingers) 9–10 cink(II)iont tartalmaznak tetraédes koordinációban.

Az imidazolnitrogén előzőekben bemutatott, enzimekben betöltött alapvető szerepe miatt a különböző poliimidazol-vegyületek igen jó enzimmodellek lehetnek. Vizsgálataink célja az volt, hogy – egy, a korábbi irodalmi adatok alapján a metalloenzimek aktív centrumának a modellezésére alkalmas kelátképző ligandum – a bisz(2-imidazolil)-metilamin (BIMA) különböző aminosav- és peptidszármazékainak réz(II)-, nikkell(II)- és cink(II)ionnal való komplexképzését tanulmányozzuk. Célul tűztük ki a komplexkémiail rendszerek oldategyensúlyi szempontból való jellemzését és a kialakuló komplexek szerkezetvizsgálatát.

Mivel a vizsgált bisz(2-imidazolil)-metilamin származékait tartalmazó rendszerek igen összetett képet mutattak, jelentős részben az imidazolcsoportok két-két nitrogén donoratomjának tulajdoníthatóan, a vizsgálatokat kiegészítettük a bisz(2-imidazolil)-metil-származékoknál egyszerűbb modellrendszer, a bisz(2-piridil)-metil-származékok komplexkémiail vizsgálatával. A különféle oligopeptid-származékokkal képzett fémkomplexek vizsgálata elősegíti a fémionok és proteinek közötti kölcsönhatás megértését. Ezek a kismolekulák alkalmasak lehetnek a metalloproteinek aktív centrumának a modellezésére, illetve – ezen molekulák fémionhoz való speciális, igen erős kötődését kihasználva – metalloenzimek szelektív gátlására is.

2. Kísérleti körülmények, vizsgálati módszerek

pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg a ligandumok protonálódási állandóit és a réz(II)-, nikkell(II)- és cink(II)komplexek stabilitási állandóit. Valamennyi vizsgált rendszert vizes oldatban tanulmányoztuk. A fémion/ligandum arányt 1:3 és 2:1 között változtattuk. A potenciometriás mérések kiértékelését számítógépes program segítségével végeztük el. A ligandumok protonálódási állandóit és a komponensek teljes koncentrációját *SUPERQUAD* programmal határoztuk meg, míg a komplexek stabilitási állandóit *PSEQUAD* program segítségével számoltuk. A kapott stabilitási állandó értékek (β_{pqr}) alapján a rendszerre jellemző koncentrációeloszlási görbéket *SED* és *CED* program segítségével szerkesztettük meg.

UV-látható spektrofotometriás vizsgálatokat réz(II)- és nikkell(II)komplexek esetében végeztünk. A fémkomplexek spektrumának vizsgálatához szükség volt a ligandum spektrumának az ismeretére is, mivel ezen ligandumoknak van elnyelési sávja a közeli UV-tartományban. A kapott spektrumok elemzését egyrészt a fotométert (Hewlett Packard, HP 8453) gyártó cég által biztosított kezelő- és kiértékelő szoftverrel végeztük, másrészt itt is végeztünk számolásokat a *PSEQUAD* program segítségével. Ez utóbbi módon az egyes komplexek spektrumát külön-külön meg tudjuk adni.

A **cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia** optikailag aktív, azaz diszimmetrikus fémkomplexek (leginkább réz(II)- és nikkell(II)-peptidkomplexek) szerkezetének a felderítésében széles körben használt módszer. Mi réz(II)iont tartalmazó rendszerekben végeztünk ilyen vizsgálatokat. A kapott CD spektrumok elemzését itt is a készüléket (JASCO-810) gyártó cég által biztosított kezelő- és kiértékelő szoftverrel, másrészt *PSEQUAD* programmal végeztük.

¹H-NMR spektroszkópiás méréssel azonosítottuk valamennyi ligandum szerkezetét és ellenőriztük tisztaságukat. Emellett a ligandumok egyes, protonálódásra képes csoportjaihoz tartozó *pK*-értékeknek az azonosítására, a protonálódási mikroállandók megadására is ez a módszer volt használható. Cink(II)komplexek esetében a részecskék szerkezetének a felderítésére szintén NMR spektroszkópiát alkalmaztunk. A kapott spektrumokat a BRUKER AM360 NMR spektrométer saját szoftverjével, illetve *ID-WinNMR* nevű, Windows alatt futó program segítségével értékeltük.

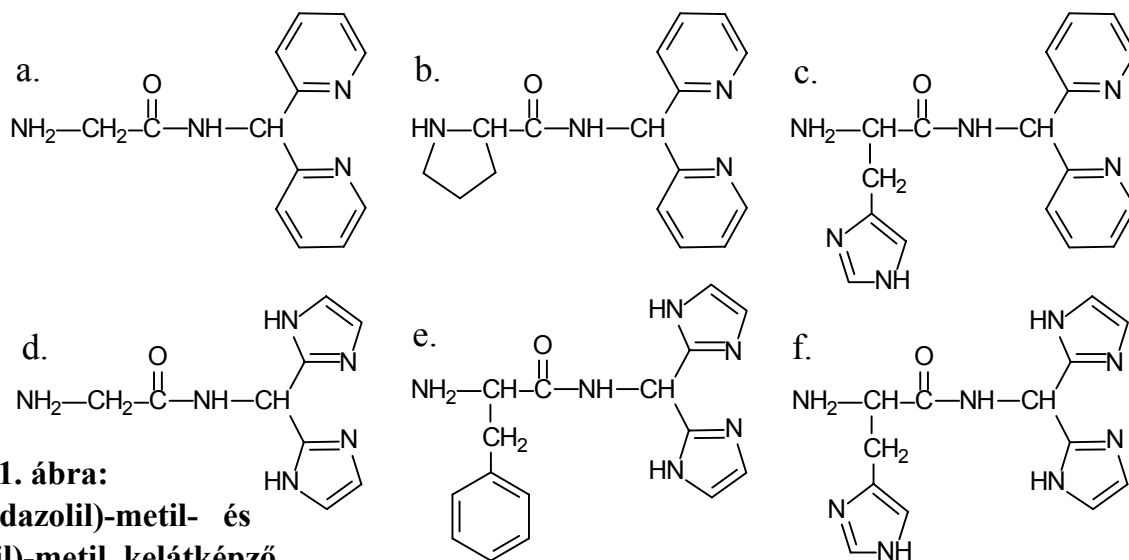
Mágneses momentum méréseket rézkomplexek esetén végeztünk az Evans-módszer (NMR spektroszkópiás mérés) segítségével. A réz(I)- és a ferromágnesesen csatolt réz(II)komplexek diamágnesesek, míg a réz(II)komplexek paramágneses viselkedésűek, így a ferromágneses (spin–spin) kölcsönhatás jelenlétére vagy hiányára lehet következtetni ezen vizsgálatok alapján.

Az **elektronspin-rezonancia (ESR) spektroszkópia** fontos vizsgálati módszer olyan molekulák és ionok tanulmányozásánál, melyek paramágneses sajátságúak, így réz(II)komplexek esetében is. Az ESR spektrumok hiperfinom szerkezete (A_{\parallel} és g_{\parallel}) a komplexek kis szerkezetbeli különbségeinek a megállapítására is alkalmas. Az ESR spektrumok párhuzamos tartományának a kiszélesedéséből, és az úgynevezett “X-band” tartományban található 7 jel megjelenéséből dimer vagy más oligomer szerkezetek jelenlétére lehet következtetni. Dimer szerkezetek estében az ESR (g_{\perp} és $D[\text{cm}^{-1}]$) alapján lehetőség van a réz–réz távolság számolására is a *Stevens egyenlet* segítségével.

Tömegspektrometriás (MALDI-TOF-MS; Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time of Flight, Mass Spectroscopy) vizsgálatok többmagvú réz(II)-komplexek vizsgálatára alkalmasak, ahol egy molekulán belül többféle kémiai környezetben lévő fémionok találhatóak, ami miatt más spektroszkópai módszerek alkalmazása bonyolulttá válik. A MALDI-TOF-MS mérések alapján megadhatjuk a komplex pontos molekulatömegét, emellett a módszerrel – a komplex fragmentálódását, hasadását vizsgálva – további szerkezeti információ is nyerhető.

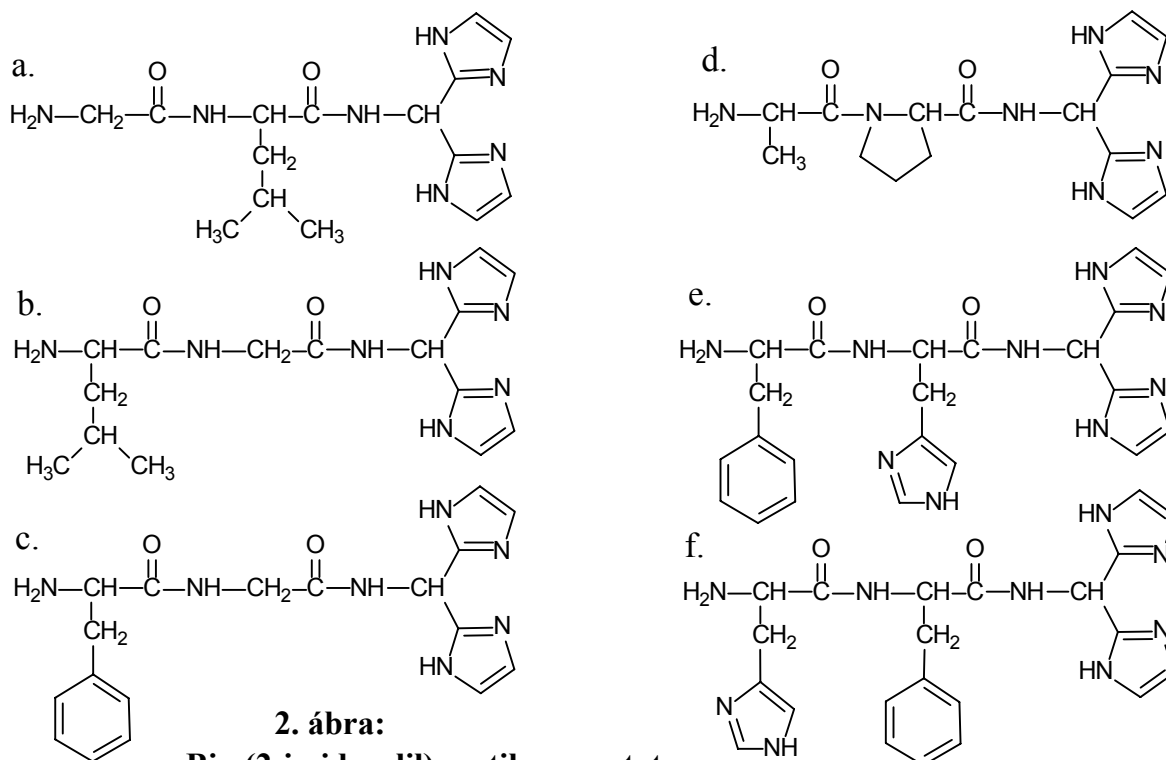
3. Vizsgált ligandumok

Valamennyi, általunk vizsgált aminosav- és peptidszármazékot az *MTA Peptidkémiai Kutatócsoportjában*, illetve az *ELTE Szerves Kémiai Tanszékén* állították elő. A ligandumok azonosítására és tisztaságának ellenőrzésére HPLC-t, NMR spektroszkópiát, VRK-t, olvadáspont-meghatározást, valamint pH-potenciometriát használtunk.



1. ábra:
Bisz(2-piridil)-metil- és bisz(2-imidazolil)-metil kelátképző csoportot tartalmazó aminosavszármazékok szerkezete:

- a.: *N*-glicil-[bisz(2-piridil)-metil-amin] (Gly-BPMA)
 b.: *N*-prolil-[bisz(2-piridil)-metil-amin] (Pro-BPMA)
 c.: *N*-hisztidil-[bisz(2-piridil)-metil-amin] (His-BPMA)
 d.: *N*-glicil-[bisz(2-imidazolil)-metil-amin] (Gly-BIMA)
 e.: *N*-fenilalanil-[bisz(2-imidazolil)-metil-amin] (Phe-BIMA)
 f.: *N*-hisztidil-[bisz(2-imidazolil)-metil-amin] (His-BIMA)



2. ábra:
Bisz(2-imidazolil)-metil-csoportot tartalmazó dipeptidszármazékok:

- a.: Glicil-leucil-[bisz(2-imidazolil)-metil-amin] (Gly-Leu-BIMA)
 b.: Leucil-glicil-[bisz(2-imidazolil)-metil-amin] (Leu-Gly-BIMA)
 c.: Fenilalanil-glicil-[bisz(2-imidazolil)-metil-amin] (Phe-Gly-BIMA)
 d.: Alanil-prolil-[bisz(2-imidazolil)-metil-amin] (Ala-Pro-BIMA)
 e.: Fenilalanil-hisztidil-[bisz(2-imidazolil)-metil-amin] (Phe-His-BIMA)
 f.: Hisztidil-fenilalanil-[bisz(2-imidazolil)-metil-amin] (His-Phe-BIMA)

4. Új tudományos eredmények

4.1. *Összesen tizenkét új bisz(2-imidazolil)-metil-, illetve bisz(2-piridil)-metil aminosav- és dipeptidszármazék (1. és 2. ábra) sav-bázis sajátságait jellemeztük pH-metriás és NMR spektroszkópiás mérések alapján.*

A pK-értékeket potenciometriás titrálással határoztuk meg, míg a különböző pK-khoz tartozó deprotonálódó/protonálódó donorcsoportokat NMR spektroszkópia, illetve hasonló szerkezetű ligandumok pK-értékeivel való összehasonlítás alapján azonosítottuk. Az általunk vizsgált ligandumokban a piridin-, imidazol- és aminocsoportok deprotonálódása megy végbe a mérhető pH-tartományban. A legnagyobb pK-érték minden esetben az aminocsoportoz tartozik ($7,2 \leq pK(\text{amino}) \leq 8,6$). A hisztidin-imidazolok pK-ja ennél kisebb ($5,4 \leq pK(\text{hisztidin}) \leq 6,3$), míg a legkisebb értékeket a bisz(2-imidazolil)-, illetve bisz(2-piridil) csoportra mértük ($2,6 \leq pK_1(\text{imidazol}) \leq 3,2$; $4,5 \leq pK_2(\text{imidazol}) \leq 5,6$; $pK_1(\text{piridin}) \leq 1,5$; $2,9 \leq pK_2(\text{piridin}) \leq 3,3$), ahol a két protonált aromás nitrogén közeli helyzete mind sztérikusan, mind elektrosztatikusan kedvezőtlen. A pK-kat emellett egy hozzájuk viszonylag közel lévő elektronküldő (alifás) csoport növeli, míg egy elektronszívó (amino-, amid-, aromás, prolin-) csoport csökkenti.

Ezen pK-értékek (főleg a hisztidin aminosavat tartalmazó származékok esetén) így már jelentősen átfedhetnek egymással, ami szükségessé tette az NMR vizsgálatokat is, ahol az egyes csoportok deprotonálódását/protonálódását egymástól függetlenül vizsgálhattuk.

4.2. *Új számolási módot alkalmaztunk a protonálódási mikroállandók NMR spektroszkópiás mérések alapján történő megadására olyan kismolekulák esetében, ahol valamennyi csoport deprotonálódása hatással van valamennyi NMR-aktív csoport jelére. Ilyen kismolekulák esetében a ligandum egyes részei nem tekinthetők külön-külön egységnek, mint a korábbi irodalmakban szereplő, nagyobb molekulák esetében az egyes ligandum-részletek.*

A protonálódási/deprotonálódási mikroállandók számolásánál egy-egy faktorial jellemeztük minden egyes protonálódásra képes csoport protonálódásának, illetve deprotonálódásának minden egyes NMR-aktív csoport kémiai eltolódására gyakorolt hatását. Egy adott, NMR-aktív csoport tényleges kémiai eltolódás értéke így a faktorok és a protonáltsági fok ismeretében számolható. Kísérletileg ezeket a kémiai eltolódásokat mérve, különböző illesztési eljárásokkal ki lehet számolni a faktorok értékét, valamint egy adott protonáltsági foknál a proton eloszlását a koordinációs helyek között, azaz az izomerizációs és protonálódási mikroállandókat.

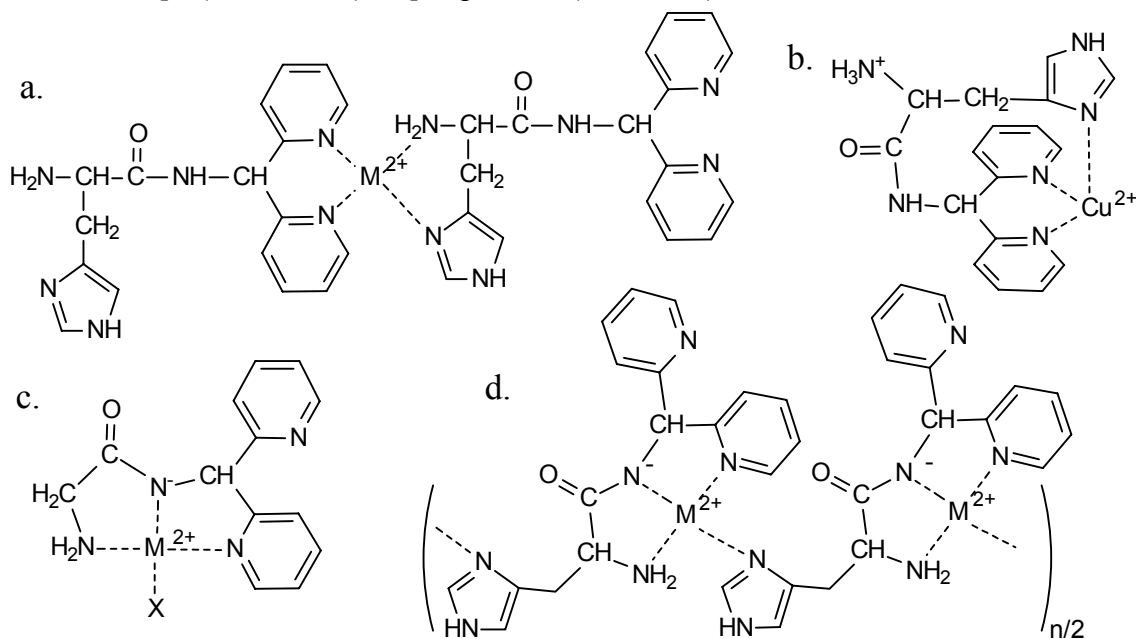
4.3. Két, bisz(2-imidazolil)-metil-aminosavszármazékokkal analóg bisz(2-piridil)-metil-származék (Gly-BPMA és His-BPMA) komplexképzését írtuk le réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionnal. Az eredmények jól egyeztek a korábban Pro-BPMA ligandummal kapott eredményekkel. Az eredmények értelmezéséhez néhány vegyesligandumú (M(II)-bisz(2-piridil)-metán-hisztamin) rendszer vizsgálatát is elvégeztük.

A Gly-BPMA és His-BPMA ligandum fő fémmegkötőhelye savas pH-tartományban a bisz(2-piridil)-metil-csoport. Az ezen koordinációval kialakuló, hattagú kelátszerkezetű komplexek stabilitása az Irving-Williams sornak megfelelően $\text{Cu(II)} > \text{Ni(II)} > \text{Zn(II)}$ sorrendben csökken. Réz(II)ionnal a síknégyzetesen torzult geometria miatt csak mono-, míg az oktaédeses nikkel(II)- és cink(II)ionnal biszkomplexek is kialakulnak ligandumfelesleg esetén.

A His-BPMA ligandumnál, ligandumfelesleg esetén megjelenik a hisztaminszerű koordináció is nikkel(II)- és cink(II)ionnal (3/a. ábra), míg réz(II)ion esetén (3/b. ábra) ezt a hisztidinnek a már savas oldatban kialakuló axiális koordinációja megakadályozza.

3. ábra: Bisz(2-piridil)-metil-származékok koordinációs kémiája:

- a.: bisz(2-piridil)-metil- és hisztaminszerű koordináció (M = Ni, Zn)
- b.: axiális hisztidin-koordináció a $[\text{Cu}(\text{His-BPMA})\text{H}]^{3+}$ komplexben
- c.: dipeptidszerű koordináció (M = Cu, Ni, Zn)
- d.: hisztidinidas $[\text{M}(\text{His-BPMA})\text{H}_{-1}]_n^{n+}$ polimer (M = Cu, Ni)



Nagyobb pH-n mindhárom fémion képes elősegíteni az amidnitrogén deprotonálódását és dipeptidszerű [N(amino), N(amid), N(piridin)]-koordináció alakul ki (3/c. ábra), mely nikkel(II) és cink(II)ion esetén biszkomplekként telíteni is képes a fémion koordinációs szféráját. A Gly-BPMA és His-BPMA ligandum nemkoordinálódó piridilcsoportja nem képes egy másik fémhez egyfogú ligandumként koordinálódva dimer szerkezetet kialakítani, azonban a hisztidin-oldallánc hídligandumként már elég erősnek bizonyult a

réz(II)– és nikkell(II)–His-BPMA rendszerben, 1:1 fémion/ligandum aránynál polimer szerkezet létrehozására (3/d. ábra).

Lúgos pH esetén vegyes hidroxokomplexek alakulnak ki (3/c. ábra, X = OH⁻), melyek megbontják a polimer szerkezetet is. Ezek a szerkezetek szintén ismertek az átmenetifém-peptid komplexek között.

4.4. A korábban Gly-BIMA-val mért adatokat kiegészítettük a nikkell(II)–Gly-BIMA rendszer, valamint a Phe-BIMA és His-BIMA réz(II)-, nikkell(II)- és cink(II)komplexeinek a vizsgálatával. A kapott eredmények értelmezéséhez a bisz(2-piridil)-metil-származékoknál kapott eredményeket is felhasználtuk, valamint itt is vizsgáltunk vegyesligandumú rendszereket (M(II)–bisz(2-imidazolil)-metán–hisztamin).

A vizsgálatok, illetve a három ligandum viselkedésének az összehasonlítása azt mutatta, hogy egy nagy térkitöltésű fenilalanil oldalláncnak nincs jelentős szerepe a ligandum komplexkémiai viselkedésére; ezzel szemben a hisztidincsoport alapvetően megváltoztatja azt.

A Gly-BIMA, Phe-BIMA és His-BIMA ligandum fő fémmegkötőhelye savas pH-tartományban a bisz(2-piridil)-metil-származékokhoz hasonlóan a két aromás gyűrű, mely hattagú kelátot képezve koordinálódik. A komplexek stabilitása itt is az Irving-Williams sornak megfelelően változik. A bisz(2-imidazolil)-metil-csoport erősebb fémmegkötő tulajdonságú mint a bisz(2-piridil)-metil-csoport, így itt mindhárom vizsgált átmenetifém-ionnal kialakulnak biszkomplexek is. Kettőnél több ligandum egyazon fémionhoz való koordinálódását azonban itt sem sikerült kimutatni.

A His-BIMA ligandum esetén emellett hisztaminszerű koordináció is kialakul savas pH-n. A kétféle koordinációs mód együttes jelenléte lehetővé teszi fémfelesleg esetén kétmagvú komplex, 1:1 fémion/ligandum aránynál pedig szimmetrikus vagy aszimmetrikus ligandumhidas dimerek kialakulását (4/a–b. ábra).

Nagyobb pH-n itt már nehezebben alakul ki a dipeptidszerű ([N(amino), N(amid), N(imidazol)]-) koordináció – főleg ligandumfelesleg esetén – a nagy stabilitású bisz(ligandum)-komplexek jelenléte miatt.

Dimer szerkezetek mind a Gly-BIMA, mind a His-BIMA ligandummal kialakulnak semleges pH-n. A hídcsoport mindkét esetben a bisz(2-imidazolil)-metil-rész szabad imidazolcsoportja (4/c. ábra), és nem a hisztidin-imidazol.

Lúgos pH-n a Gly-BIMA és Phe-BIMA ligandumoknál vegyes hidroxokomplex alakul ki. A Gly-BIMA esetén ötös koordinációval polimer szerkezet képződik, míg a Phe-BIMA esetében az aromás gyűrűk stacking kölcsönhatása megakadályozza a polimerizációt (4/d. ábra). Ezen szerkezetekkel szemben a réz(II)–His-BIMA rendszer esetén a semleges pH-n képződő dimerben (4/c. ábra) a hisztidin-csoport (–R) axiális koordinációja megakadályozza a hidrolízist lúgos tartományban is, így itt végbemegy a dimer

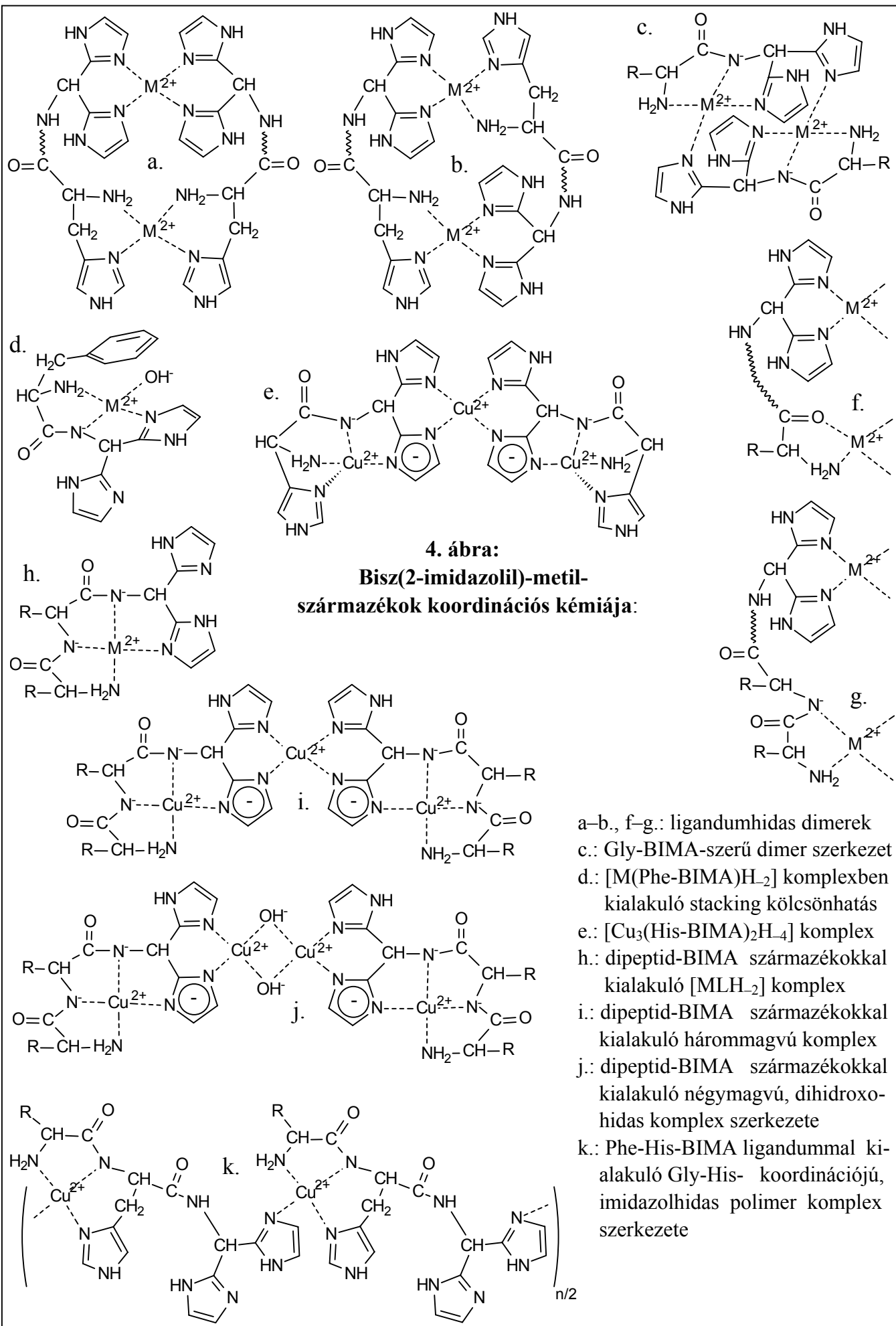
imidazolcsoportján a pirrol-típusú N(1)H nitrogének deprotonálódása. Ez a folyamat 8,5-es pK-értékkel jellemezhető.

His-BIMA esetében 3:2 réz(II)/ligandum arányú komplexet is sikerült kimutatni, melyben szintén deprotonálódott a ligandumok egy-egy pirrol-típusú nitrogénje, és egy négy aromás nitrogén által koordinált réz(II)ion hídként köt össze két ligandumot (4/e. ábra). Ez a szerkezet már 5,5-ös, azaz fiziológiás pH-n kialakul.

4.5. Négy, nemkoordinálódó oldalláncú bisz(2-imidazolil)-metil-amin dipeptidszármazék (Gly-Leu-BIMA, Leu-Gly-BIMA, Phe-Gly-BIMA és Ala-Pro-BIMA) komplexképzését jellemeztük réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionnal.

- A vizsgálatok azt mutatták, hogy egy nemkoordinálódó aromás (fenilalanil) vagy alifás (leucil, alanil) oldalláncnak semmiféle hatása nincs a kialakuló komplexek szerkezetére, csak a stabilitási állandók értékét befolyásolják kis mértékben.

Savas pH-tartományban az aminosavszármazékokkal azonos bisz(2-imidazolil)-metil-koordinációt figyeltünk meg. Azonban itt már a ligandum aminovége elég távol van a bisz(2-imidazolil)-metil-résztől ahhoz, hogy az aminovég ezzel párhuzamos, aminosavszerű [N(amino), O(karbonil)]-koordinációjával szimmetrikus és aszimmetrikus dimerek alakuljanak ki (4/f. ábra). Nagyobb pH-n, 1:1 fémion/ligandum aránynál továbbra is a dimerek jelenléte jellemző, ezekben azonban a koordinációs mód a bisz(2-imidazolil)-metil-koordináció mellett [N(amino), N(amid)]-koordináció (4/g. ábra). Ezzel el is indul az amidnitrogének deprotonálódása és koordinálódása, mely tovább folytatódik, és 8-10-es pH-n már a monomer szerkezetű, tripeptidszerű ([N(amino), N(amid), N(amid), N(imidazol)]-) koordináció az uralkodó mind 1:1 fémion/ligandum arány, mind ligandumfelesleg esetén (4/h. ábra). Ezt a stabilis, négynitrogénes szerkezetet nem képes megbontani a hidrolízis sem, így 11-es pH felett végbemegy a koordinált imidazol pirrol-típusú nitrogénjének deprotonálódása – ezen arányoknál még fémion-koordináció nélkül. A pirrolnitrogén deprotonálódás azonban – hasonlóan a réz(II)–His-BIMA rendszerhez – lehetőséget teremt ligandumonként több fémion megkötésére is. A vizsgálatok szerint 3:2 és 4:2 fémion/ligandum arányú komplexek alakulnak ki: a 3:2 aránynál képződő szerkezetben két fémion tripeptidszerű koordinációval koordinálódik, míg a harmadik fémion bisz(2-imidazolil)-metil- négynitrogénes koordinációval köt össze két tripeptid-egységet (4/i. ábra). Ezen komplex – a His-BIMA ligandum hárommagvú komplexéhez hasonlóan (4/e. ábra) – már fiziológiás pH-n kialakul. 2:1 fémion/ligandum aránynál még kisebb pH-n (pH = 6) megtörténik a pirrol-deprotonálódás, majd 8-as pH-n egy dihidroxohidas tetramer képződik (4/j. ábra).



- A peptidláncban lévő prolin aminosavnak már nagyobb a szerepe a komplexképzésre. A vizsgálatok azt mutatták, hogy Ala-Pro-BIMA-val – a korábbi ligandumokkal ellentétben – nem megy végbe a peptidnitrogének deprotonálódása és koordinálódása. Bisz(2-imidazolil)-metil-koordinációt, valamint semleges pH-n a ligandum amino-karbonil végének a koordinálódását mutattuk ki. Mivel a deprotonálódás itt csak a bisz(2-imidazolil)-metil-csoport felől mehetne végbe (az aminovég felőli peptidcsoporton a prolin aminosav miatt nincs NH-proton) és ez nem történik meg, ez újabb igazolása annak hogy a többi ligandum esetében a deprotonálódás az aminovéghez közelebbi amidcsoporton kezdődött. Mivel Ala-Pro-BIMA esetén nincs peptid-deprotonálódás, nem alakul ki a stabilis négynitrogénes koordináció sem, így nagyobb pH-n hidroxid csapadék válik le.

4.6. Tanulmányoztuk a peptidláncban lévő hisztidin aminosav szerepét a komplexképződésre dipeptid-BIMA származékok (His-Phe-BIMA és Phe-His-BIMA) esetén.

A peptidszekvenciában lévő hisztidincsoport egy újabb, erős fémmegkötő csoport. A kialakuló komplexek szerkezete függ a hisztidin peptidláncban elfoglalt helyzetétől.

- Az N-terminális hisztidint tartalmazó His-Phe-BIMA koordinálódó csoportjai ugyanazok mint a His-BIMA liganduméi, így részben hasonló szerkezetű komplexek alakulnak ki. Ezen rendszerben is kimutattuk savas pH-n a bisz(2-imidazolil)-metil- és hisztaminszerű koordinációt. Ezen két koordinációval 1:1 fémion/ligandum aránynál ebben a rendszerben is kialakul a **4/a–b.** ábrán bemutatott ligandumhidas dimer. Szintén kialakul a ligandum amino-végének aminosavszerű ([N(amino), O(karbonil)]-), valamint [N(amino), N(amid)]-koordinációjával képződő két ligandumhidas szerkezet (**4/f–g.** ábra).

Lúgos pH-n azonban az N-terminális hisztidin-oldallánc nem képes megállítani a ligandum aminovég felőli lépcsőzetes deprotonálódását és koordinálódását réz(II)ion jelenlétében. A kialakuló komplex szerkezete megegyezik a nemkoordinálódó oldalláncot tartalmazó dipeptid-BIMA származékok esetében kapott négynitrogénes szerkezettel (**4/h.** ábra), azonban itt – a viszonylag stabilis hisztaminszerű koordináció miatt – ez csak nagyobb pH-n alakul ki. Olyannyira, hogy ligandumfelesleg esetében ez a deprotonálódás már átfed a hidrolízissel, így itt nem is alakulnak ki a három- és négymagvú, deprotonált pirrol-típusú nitrogént tartalmazó réz(II)komplexek.

- A Phe-His-BIMA ligandumban a hisztamincsoport helyett egy Gly-His (vagy Phe-His)-szerű csoport található, mely – a korábbi, peptidekkel végzett vizsgálatok alapján – még erősebb koordinálódó csoport. Ez a ligandumrész azonban csak semleges és gyengén lúgos pH-tartományban képes részt venni a komplexképzésben, savas pH-n nem befolyásolja a bisz(2-imidazolil)-metil-, savas/semleges pH-n a ligandumhidas (**4/f–g.** ábra) koordinációt. Nagyobb pH-n azonban kiszorítja azokat, és Gly-His-szerű koordinációval polimer szerkezet alakul ki (**4/k.** ábra), mely csapadék formájában kiválik a vizes oldatból.

Amennyiben víz helyett víz/aceton elegyet alkalmazunk oldószerként (melyben a kisebb hidroxidion-koncentráció miatt háttérbe szorul a hidrolízis), itt is kimutattuk lúgos pH esetén a négynitrogénes, tripeptidszerű koordinációt (4/h. ábra).

Fémionfelesleg esetében a ligandum mindkét vége koordinálódik; bisz(2-imidazolil)-metil- és Gly-His-szerű koordinációval 2:1 és 3:2 sztöchiometriájú komplexek alakulnak ki. Ez utóbbiban – hasonlóan a korábban bemutatott hárommagvú komplexekhez – egy réz(II)ion két ligandum négy aromás imidazolnitrogénjéhez kapcsolódva köti össze a két ligandumot. Ezen szerkezet kevésbé stabilis, mint a hisztidint nem tartalmazó dipeptid-BIMA származékokkal, valamint a His-BIMA-val kialakuló 3:2 komplex, mert itt két réz(II)ion koordinációs szférája telítetlen; így nagyobb pH-n fémhidrolízis indul meg.

5. Az eredmények várható gyakorlati alkalmazása

A különféle oligopeptid-származékokkal képzett fémkomplexek vizsgálata elősegíti a fémionok és proteinek közötti kölcsönhatás megértését. Ezen oligopeptidekben a legfontosabb kötőhelyek az aromás imidazol-oldalláncok, azok N(1) és N(3) nitrogénjei, mindhárom általunk is vizsgált fémion esetében. A szuperoxid-diszmutázokban lévő ligandumhidas szerkezetet szintén az imidazolgyűrű két nitrogénje alakítja ki.

Ezek az általunk is tanulmányozott kismolekulák alkalmasak lehetnek a metalloproteinek aktív centrumának a modellezésére, illetve – ezen molekulák fémionhoz való speciális, igen erős kötődését kihasználva – metalloenzimek szelektív gátlására is. Az általunk vizsgált modellekben a bisz(2-imidazolil)-metil-csoport biztosítja az erős fémmegkötő-képességét a ligandumnak, míg a hozzákapcsolt peptidlánc az enzim szubsztrátját modellezheti. Ez alapján, a peptidlánc változtatásával különböző, peptidek hidrolízisét végző enzimek modelljét és inhibitorát állíthatjuk elő.

A szabad terminális aminocsoport egy újabb potenciális fémmegkötő csoport az általunk vizsgált származékokban. Ezen csoportnak a jelenléte különböző ligandum- és imidazolhidas szerkezetek kialakulását teszi lehetővé, melyek jó modelljei egyéb többmagvú fémkomplexeknek is.

Ezen molekulák vizsgálatánál talán a legérdekesebb eredmény az volt, hogy már igen alacsony pH-n, fiziológiás körülmények között lejátszódott egyes rendszerekben a pirrol-típusú nitrogén deprotonálódása és koordinálódása. Ilyen imidazoláto-hidas szerkezeteket az irodalomban csak viszonylag nagy pH-n találtak korábban, szemben azokkal az enzimekkel, melyekben ez a szerkezet már fiziológiás pH-n kialakul. Az általunk kimutatott, stabil dimer–tetramer imidazoláto-hidas szerkezetek lehetséges szerkezeti és funkcionális modelljei az ezen szerkezetet tartalmazó metalloenzimeknek, pl. a különböző szuperoxid-diszmutázoknak.

6. Tudományos közlemények

6.1. Az értekezés témájához kapcsolódó publikációk

Közlemények:

5. Imre Sóvágó, Katalin Ósz, Katalin Várnagy
Copper(II) complexes of amino acids and peptides containing chelating bis(2-imidazolyl) residues
Bioinorganic Chemistry and Applications, (közlésre elfogadva).
4. Katalin Ósz, Katalin Várnagy, Helga Süli-Vargha, Daniele Sanna, Giovanni Micera, Imre Sóvágó
Transition metal complexes of bis(imidazol-2-yl) derivatives of dipeptides
J. Chem. Soc., Dalton Trans., 2003, 2009-2016.
3. Katalin Ósz, Katalin Várnagy, Helga Süli-Vargha, Daniele Sanna, Giovanni Micera, Imre Sóvágó
Copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of amino acids containing bis(imidazol-2-yl)methyl residues
Inorg. Chim. Acta, 2002, **339**, 373-382.
2. Imre Sóvágó, Katalin Várnagy, Katalin Ósz
Metal complexes of peptides containing monodentate or chelating imidazole nitrogen donors: Factors influencing the coordination of amide groups and imidazole side chains
Comments on Inorg. Chem., 2002, **23 (2)**, 149-178.
1. Katalin Ósz, Katalin Várnagy, Imre Sóvágó, Lídia Lennert, Helga Süli-Vargha, Daniele Sanna, Giovanni Micera
Equilibrium and structural studies on transition metal complexes of amino acid derivatives containing bis(pyridin-2-yl)methyl residue
New J. Chem., 2001, **25 (5)**, 700-706.

Konferenciaanyagok:

15. Imre Sóvágó, Katalin Ósz, Katalin Várnagy, Helga Süli-Vargha, Daniele Sanna, Giovanni Micera
Copper(II) complexes of amino acids and dipeptides containing chelating bis(imidazol-2-yl) side chains (poszter)
6th European Conference on Bioinorganic Chemistry (EUROBIC-6), 2002. július 29-augusztus 3, Lund/Koppenhága, Svédország/Dánia.
14. Katalin Várnagy, Katalin Ósz, Csilla Kállay, Imre Sóvágó, Helga Süli-Vargha, Daniele Sanna, Giovanni Micera
The effect of coordinating donor group on the complexation of bis(imidazolyl) derivatives (poszter)
XXXVth International Conference on Coordination Chemistry, ICC35, 2002. július 21-26, Heidelberg, Németország.
13. Katalin Ósz, Katalin Várnagy, Imre Sóvágó, Helga Süli-Vargha, Giovanni Micera, Daniele Sanna
Copper(II) complexes of dipeptides containing chelating imidazole-N donors (poszter)
XXXVth International Conference on Coordination Chemistry, ICC35, 2002. július 21-26, Heidelberg, Németország.
12. Várnagy Katalin, Ósz Katalin, Kállay Csilla, Sóvágó Imre, Süli-Vargha Helga
Oldalláncbeli donorcsoportok hatása a bis(imidazolil) származékok komplexképző sajátságaira (előadás)
XXXVII. Komplexkémiái Kollokvium, 2002. május 29-31, Mátraháza.
11. Katalin Ósz, Katalin Várnagy, Imre Sóvágó, Helga Süli-Vargha, Giovanni Micera, Daniele Sanna
Transition metal complexes of peptides containing chelating imidazole-N donors
J. Inorg. Biochem., 2001, **86**, 367 (konferencia abstract).
10. Katalin Ósz, Katalin Várnagy, Imre Sóvágó, Helga Süli-Vargha, Giovanni Micera, Daniele Sanna
Transition metal complexes of peptides containing imidazole-N donors (poszter)
10th International Conference on Bioinorganic Chemistry, 2001. augusztus 26-31, Firenze, Olaszország.

9. Ősz Katalin, Várnagy Katalin, Sóvágó Imre, Süli-Vargha Helga
Oldalláncban kelátképző donorcsoportot tartalmazó aminosav- és peptidszármazékok átmenetifém komplexei (előadás)
XXXVI. Komplexkémiái Kollokvium, 2001. május 23-25, Pécs.
8. Katalin Várnagy, Katalin Ősz, Imre Sóvágó, Helga Süli-Vargha
The effect of C-terminal bidentate group on the complexation of oligopeptides (előadás)
The international conference: Metals in Enviromental Medicine, 2000. október 19-21, Wrocław, Lengyelország.
7. Katalin Várnagy, Julianna Szabó, Katalin Ősz, Imre Sóvágó, Helga Süli-Vargha, Giovanni Micera, Daniele Sanna
The effect of C-terminal imidazole ring on the complexation of oligopeptides containing histidyl or bis(imidazolyl) groups (poszter)
5th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2000. július 17-20, Toulouse, Franciaország.
6. Lennert Lídia, Ősz Katalin, Várnagy Katalin, Süli-Vargha Helga
Kelátképző ligandumot tartalmazó aminosavszármazékok előállítása és átmenetifém-komplexeik vizsgálata (előadás)
Peptidkémiái Munkabizottsági Ülés, 1999. december, Balatonszemes.
5. Ősz Katalin, Várnagy Katalin
Oldalláncban kelátképző donorcsoportot tartalmazó aminosavszármazékok átmenetifém-komplexeinek egyensúlyi vizsgálata (előadás)
XXII. Kémiai Előadói Napok, Szerves, Gyógyszer és Biokémiai Szimpózium, 1999. november 1-3, Szeged.
4. Katalin Ősz, Katalin Várnagy, Lídia Lennert, Imre Sóvágó, Helga Süli-Vargha, Daniele Sanna, Giovanni Micera
Zinc(II) and copper(II) complexes of amino acid derivatives containing bidentate donor group in the side chain (poszter)
V. Symposium on Inorganic Biochemistry towards Molecular Mechanisms of Metal Toxicity, 1999. szeptember 23-27, Wrocław, Lengyelország.
3. Ősz Katalin, Várnagy Katalin, Süli-Vargha Helga, Lennert Lídia
Kelátképző ligandumot tartalmazó aminosavszármazékok előállítása és átmenetifém-komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata (előadás)
XXXIV. Komplexkémiái Kollokvium, 1999. május 19-21, Tata.

2. Lennert Lída (ELTE), Ősz Katalin (KLTE)
Bisz(2-piridil) csoportot tartalmazó aminosavszármazékok előállítása és átmenetifém-komplexeinek egyensúlyi vizsgálata (előadás és TDK dolgozat)
XXIV. OTDK, Kémiai és Vegyipari Szekció, Koordinációs Kémia Alszekció, 1999. április 7-9, Veszprém.
1. Katalin Várnagy, Imre Sóvágó, Helga Süli-Vargha, Katalin Ősz, Lída Lennert
The effect of bis(imidazol-2-yl) and bis(pyridin-2-yl) groups on complex formation process of amino acids and peptides (poszter)
XXXIII. International Conference on Coordination Chemistry, 1998. augusztus 30 – szeptember 4, Firenze, Olaszország.

6.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó publikációk

Közlemények:

1. Katalin Ősz, Beáta Bóka, Katalin Várnagy, Imre Sóvágó, Tibor Kurtán, Sándor Antus
The application of circular dichroism spectroscopy for the determination of metal ion speciation and coordination modes of peptide complexes
Polyhedron 2002, 21 (21), 2149-2159.

Konferencia- és előadásanyagok:

2. Ősz Katalin, Bóka Beáta, Várnagy Katalin, Sóvágó Imre, Kurtán Tibor, Antus Sándor
Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia és alkalmazása komplex vegyületek vizsgálatában (előadás)
XXXVII. Komplexkémiai Kollokvium, 2002. május 29-31, Mátraháza.
1. Ősz Katalin, Sóvágó Imre
Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia és alkalmazása komplex vegyületek vizsgálatában (műszerbemutató tanszéki előadás)
Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének tanszéki szemináriuma, 2001. november 22, Debrecen.