

Szakmai zárójelentés

Réz(II)-peptid komplexek és származékaik redoxi sajátosságainak vizsgálata

Témavezető: Dr. Várnagy Katalin egyetemi docens
Futamidó: 2008. szeptember 1- 2013. szeptember 30.
A pályázat összköltségvetése: 14.640.000 Ft

1. Bevezetés

A metalloenzimekben, metalloproteinekben jelenlevő, a fehérjelánchoz kötődő fémionok általában az aktív centrum kialakításában, illetve sav-bázis és redoxi folyamatok katalizálásában vesznek részt. A fémionok és a fehérjék közötti kölcsönhatások megértéséhez hozzájárulnak azoknak a rendszereknek az oldategyensúlyi vizsgálatai, amelyek különböző átmenetifémionokat és peptideket, illetve peptidszármazékokat tartalmaznak. Az átmenetifém-ionok (elsősorban réz(II)-, nikkel(II)-, cink(II)ionok) és a különböző oldalláncbéli donorcsoportokat tartalmazó peptidek közötti kölcsönhatások vizsgálata igen régóta és nagyon széleskörűen tanulmányozott terület. A Debreceni Egyetem Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában is több évtizedes hagyományai vannak ezeknek a kutatásoknak, amelyeknek egyik fő iránya annak felderítése, hogy a különböző tényezők – fémion, oldalláncbéli donorcsoportok száma, helye, a fémionkötőhely körüli aminosavszekvencia – hogyan befolyásolják a komplexképződési folyamatokat.

A réz- és vastartalmú metalloenzimek ugyanakkor nagyon gyakran redoxi folyamatokat katalizálnak, miközben a fémion oxidálódik vagy redukálódik. A réz-peptid rendszerek elektrokémiai sajátosságainak feltérképezése így információt szolgáltat a réz-protein rendszerek részvételével lezajló redoxi folyamatok jobb megértéséhez is.

2. Célkitűzések

2.1. Cu(II)-komplexek elektrokémiai vizsgálatai

Míg a réz(II)-oligopeptid rendszerek oldategyensúlyi jellemzése már széleskörűen megtörtént, addig a redoxi sajátosságaik jóval kevésbé ismertek. Így kutatási pályázatunk fő célkitűzése a réz(II)-peptid, illetve réz(II)-peptidszármazékot tartalmazó rendszerek elektrokémiai vizsgálata és redoxi szempontból való jellemzése volt. Ehhez kapcsolódó célkitűzéseinket az alábbiakban foglalhatjuk össze:

- Réz(II)-aminosav- és réz(II)-peptid rendszerek szisztematikus elektrokémiai vizsgálata annak felderítésére, hogy az aminosav oldallánca és az ebből adódó koordinációs mód változása hogyan befolyásolja a komplexek redoxi sajátosságait
- Réz(II)-bisz(imidazol-2-il)-ligandum rendszerekben képződő azon komplexek elektrokémiai vizsgálata, amelyekben kialakuló kötésmód alapján a komplexek modellezik a CuZnSOD enzim aktív centrumának fémkötő helyét
- Réz(II)-multihisztidin rendszerek elektrokémiai vizsgálata, kiegészítve azon rendszerek részletes oldategyensúlyi jellemzésével, amelyekre ez korábban nem valósult meg.

2.2. Cu(II)-komplexek SOD-aktivitás vizsgálata

A réz(II)-komplexekre meghatározott redoxi paraméterek alapján megbecsülhető, hogy a különböző koordinációs módú komplexek közül melyik esetben várható SOD-aktivitás. Így célunk volt a redoxi szempontból jellemzett komplexek közül a legígéretesebb komplexek SOD-aktivitásának a meghatározása is.

2.3. Aromás gyűrűt tartalmazó ligandumok más fémionokkal alkotott komplexeinek vizsgálata

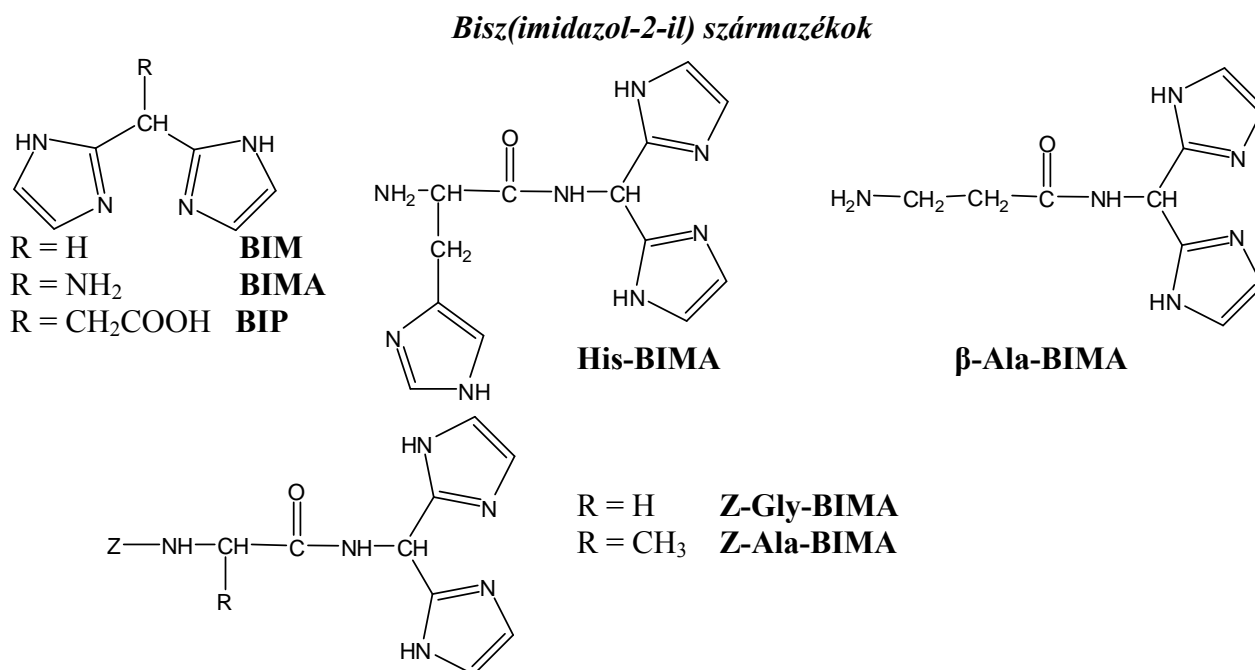
Korábbi kutatómunkánk keretében az imidazolgyűrű komplexképzési folyamatokban játszott szerepének felderítése többféle ligandumtípus – bisz(imidazol-2-il)-származékok, heteroaromás gyűrűt tartalmazó aminosav- és peptidszármazékok – réz(II) komplexeinek tanulmányozásával történt. Ezen vizsgálatok folytatásaként egy nemzetközi együttműködés keretében célunk volt a fent említett ligandum és néhány egyéb biomolekula komplexképződési folyamatainak tanulmányozása más fémionok (vanádium(IV), vas(III), vas(II)) jelenlétében, kiegészítve ezt a vas-tartalmú rendszerek elektrokémiai vizsgálatával is.

3. Vizsgálati módszerek és számítások

3.1. Ligandumok

A vizsgált ligandumok közül néhány kereskedelmi forgalomban kapható volt, egy része pedig már korábbról rendelkezésre állt. Ezek közül a bisz(imidazol-2-il) származékokat az MTA Peptidkémiai Kutatócsoportjában szintetizálták, Prof. Süli-Vargha Helga vezetésével, míg a multihisztidin peptidek egy részének szintézisére a Ioannina-i Egyetemen (Görögország) került sor. A legújabban előállított peptidek szintézise pedig a kutatócsoportunkban néhány éve működő mikrohullámú automata peptidszintetizáló készülékkel (Liberty 1) történt.

A vizsgált ligandumokat az alábbi séma foglalja össze:

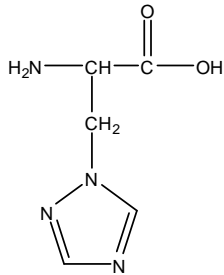


Multihisztidin peptidek

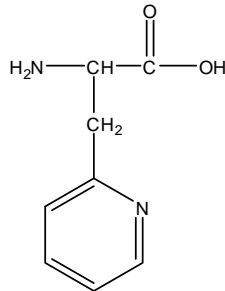
2 hisztidint tartalmazó peptidek	3 hisztidint tartalmazó peptidek	4 hisztidint tartalmazó peptidek
Ac-HGH-NHMe Ac-His-Sar-His-NH₂ (Ac-S1H2-NH₂) Ac-HGGH-NH₂ Ac-HVVH-NH₂ Ac-HAAH-NH₂	Ac-HHGH-NHMe Ac-HVHGH-NH₂ Ac-HAHPH-NH₂ Ac-HAHVH-NH₂ Ac-HVHAH-NH₂ Ac-His-Sar-His-Sar-His-	Ac-His-Sar-His-Sar-His-Sar-His-NH₂ (Ac-S3H4-NH₂)

Ac-HHVGD-NH₂ MKHMGTHS-NH₂ GTHSMKHM-NH₂ Ac-GTHSMKHM-NH₂ AHAAAHG AAHAAAHG	NH₂ (Ac-S2H3-NH₂) Ac-HGGHGH-NH₂ Ac-HAAHGH-NH₂ Ac-HAAHVH-NH₂ Ac-HGGGHH-NH₂	
--	--	--

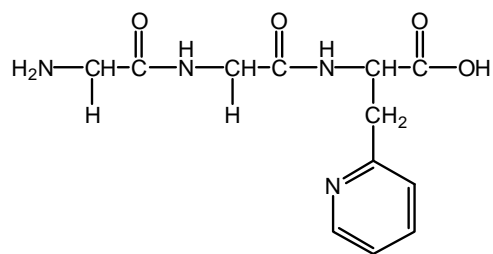
Hisztidin-analóg aminosavak és peptidek származékai



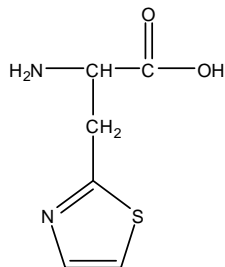
triazolil-alanin



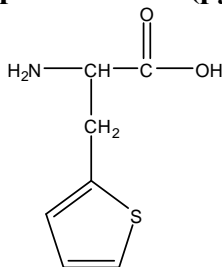
piridil-alanin (pyrAla)



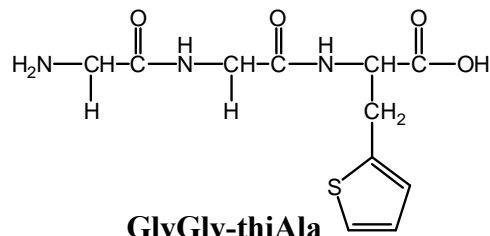
GlyGly-pyrAla



tiazolil-alanin

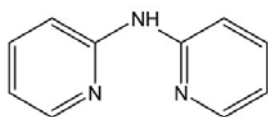


tienil-alanin (thiAla)

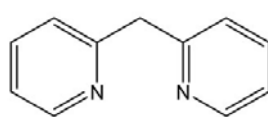


GlyGly-thiAla

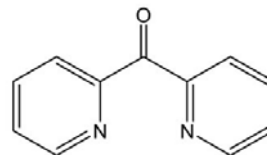
Aromás gyűrűt tartalmazó ligandumok



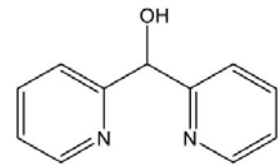
di(pyridin-2-yl)amine (DPA)



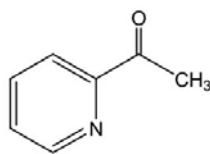
di(pyridin-2-yl)methane (DPM)



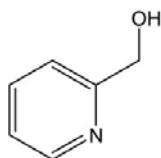
di(pyridin-2-yl) ketone (DPK)



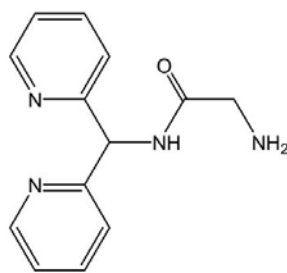
di(pyridin-2-yl)methanol (DPMO)



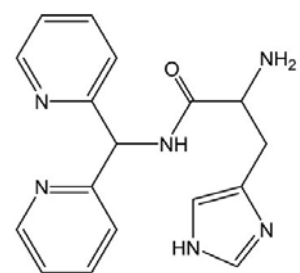
2-acetylpyridine (2-AP)



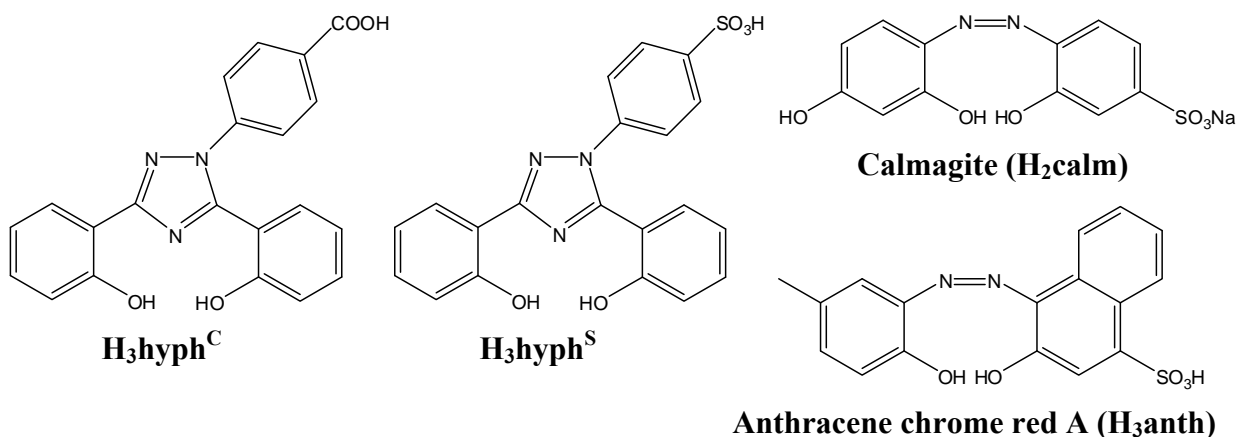
2-(hydroxymethyl)pyridine (2-HMP)



N-glycyl-di(pyridin-2-yl)methylamine (Gly-DPMA)



N-histidyl-di(pyridin-2-yl)methylamine (His-DPMA)



3.2. Vizsgálati módszerek

Az oldategyensúlyi vizsgálatok során potenciometriát, UV-Vis, CD és ESR spektroszkópiát alkalmaztunk. Az elektrokémiai paraméterek meghatározása ciklikus voltammetria alkalmazásával történt. A réz(II)-komplexek SOD aktivitását spektrofotometriás módszerrel követtük nyomon. Néhány szilárd formában kinyert komplex jellemzése Maldi-TOF és IR-spektroszkópiával történt.

3.3. DFT számítások

A VO(IV)-komplexekre alkalmazott DFT számítások eredményei azt bizonyították, hogy a DFT számítás alkalmas módszer nemcsak a VO(IV)-komplexek koordinációs geometriájának optimalizálására, hanem az ESR spektrumokban várható hiperfinom felhasadások csatolási állandóinak a kiszámítására is.

4. Eredmények és értelmezésük

Kutatócsoportunkban a réz(II) komplexek elektrokémiai vizsgálatait ezen OTKA pályázat kutatási programjának keretében indultak, így a kezdeti időszakban a ciklikus voltammetriás mérésekhez szükséges feltételek kialakítása és a megfelelő paraméterek beállítása, valamint a kis oldattérfogatban való méréshez szükséges mikrocella megépítése valósult meg.

4.1. Réz(II)-aminosav-, -di- és tripeptid rendszerek elektrokémiai vizsgálata^{1,2,3,4}

A legegyszerűbb aminosavak Cu(II)-komplexeinek ciklikus voltammetriás vizsgálatával a CuL₂ illetve a tirozin esetén CuL₂H₂ komplexeinek redoxipotenciál értéke volt meghatározható (1. táblázat). A 0 V körüli redoxipotenciál értékek azt tükrözték, hogy az aminosav oldalláncának nincs jelentős hatása a redoxipotenciálra, a nagyobb méretű oldallánc csökkenti valamelyest a kialakuló komplex stabilitását, ami a formálpotenciál kismértékű növekedését eredményezi (Gly/Ala, Ser/Tyr). A legnagyobb hatása az imidazol oldalláncnak volt, amely mutatta, hogy stabilisabb részecske keletkezik ebben a rendszerben. A két hisztidinszármazék esetében, ahol az imidazolnitrogén a fő fémion-kötőhely, pozitív értékeket kaptunk, ami a fémcentrum könnyű redukálhatóságát tükrözi.

Ezt követően a legegyszerűbb di- és tripeptid–Cu(II) rendszerek ciklikus voltammetriás vizsgálatát végeztük el, a legegyszerűbb dipeptidektől (Gly-Gly, Gly-Ala, stb.) az oldalláncban különböző – gyengén, illetve erősen koordinálódó – donorcsoportot tartalmazó dipeptidekig (Gly-Asp, Gly-His, Ala-Asp, Ala-His stb.), illetve két tripeptidig (GlyGlyGly, GlyGlyHis) folytattuk az elektrokémiai vizsgálatokat. Ezen rendszerekben képződő (NH₂,N⁻,COO⁻), (NH₂,N⁻,CO), (NH₂,N⁻,Im(N)) koordinációjú CuLH₁ komplexek és a GlyGlyHis esetén képződő (NH₂,N⁻,N⁻,Im(N)) koordinációjú CuLH₂ komplex jellemzése volt lehetséges. A jellemző redoxi potenciál értékek a –0,200 - –0,400 V tartományba esnek (2., 3. táblázat), és megállapítható, hogy a C-terminális helyzetben levő koordinálódó donorcsoport csökkenti a kialakuló komplexek redoxipotenciál értékét a stabilitás növekedésének megfelelően.

1. táblázat: A vizsgált aminosavak és egyszerű hisztidinszármazékok Cu(II)-komplexeinek redoxipotenciál értékei normál hidrogénelektrodra vonatkoztatva

	Gly	Ala	Lys	Tyr	Ser	His	N-Ac-His	N-Ac-Hm
E° (V) (CuL ₂)	-0,072	-0,068	-0,021	-	-0,061	-0,213	0,338	0,293
E° (V) (CuL ₂ H ₂)				+0,172				

2. táblázat: A vizsgált dipeptidok Cu(II)-komplexeinek redoxipotenciál értékei normál hidrogénelektrodra vonatkoztatva

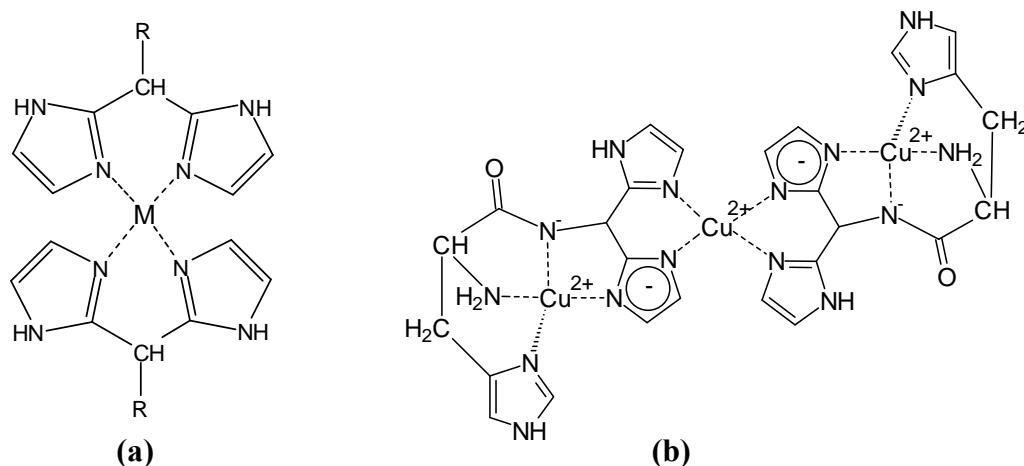
	GlyGly	GlyAla	AlaGly	AlaAla	GlyHis	AlaHis	AlaAsp	GlyAsp	GlyAsn
E° (V) (CuLH ₁)	0,007	-0,140	-0,084	-0,110	-0,054	-0,076	-0,118	-0,133	-0,097

3. táblázat: A vizsgált tripeptidok Cu(II)-komplexeinek redoxipotenciál értékei normál hidrogénelektrodra vonatkoztatva

	GlyGlyGly	GlyGlyHis
Komplex	CuLH₁	CuLH₂
E° (V)	-0,038	-0,269

4.2. Bisz(imidazolil)-csoportot tartalmazó ligandumok réz(II)-komplexeinek elektrokémiai vizsgálata⁵

A kutatócsoportunkban a különböző bisz(imidazolil)-csoportot tartalmazó aminosav- és peptidszármazékok komplexképző sajátosságainak vizsgálata több mint 15 évre nyúlik vissza. Az oldategyensúlyi és spektroszkópiai vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy ezen ligandumok fő fémionkötőhelye savas tartományban a bisz(imidazolil)-csoport, a komplexekben a ligandumok két, illetve négy imidazolnitrogénen (1.a ábra) keresztül koordinálódnak a fémionhoz. Ha a bisz(imidazolil)-csoport egy aminosavhoz vagy peptidlánchoz kapcsolódik a C-terminális részen keresztül, akkor nagyobb pH tartományban réz(II) jelenlétében (pH > 6-7) az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja révén nagy stabilitású, (NH₂,N⁻,Im(N)), illetve (NH₂,N⁻,N⁻,Im(N)) koordinációjú komplexek képződése lehetséges. Ez néhány esetben többmagvú, imidazolátohidas komplexek (1.b ábra) képződését eredményezi a fiziológiás vagy gyengén lúgos pH tartományban.



1. ábra A négy imidazol-koordinációjú (a) és a His-BIMA esetén képződő imidazolátohidas (b) komplexek szerkezetének sematikus ábrája

Ezen vizsgálatok alapján mind a bisz(imidazolil)-csoport koordinálódásával kialakuló, mind a többmagvú imidazolátotohidas réz(II)-komplexekben a koordinációs szféra hasonlóságot mutat a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumával.

A komplexek redoxi paramétereit csak a ligandumfelesleg esetén képződő bisz(imidazolil) koordinációjú komplexek esetén tudtuk meghatározni. Ezen komplexekre kapott redoxipotenciál értékek a 0 V körüli tartományba estek.

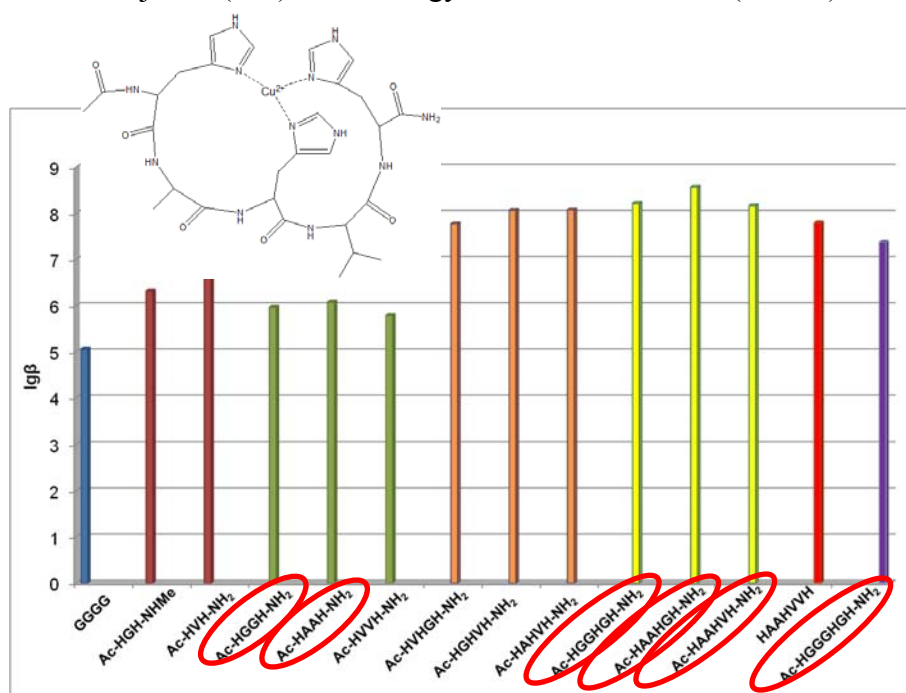
4. táblázat: A vizsgált tripeptidek Cu(II)-komplexeinek redoxipotenciál értékei normál hidrogénelektrodra vonatkoztatva

	BIM	BIMA	BIP	Z-Gly-BIMA	Z-Ala-BIMA	Gly-BIMA	β -Ala-BIMA	His-BIMA
E° (V) (CuL ₂ H ₂)						+0,008	-0,051	+0,038
E° (V) (CuL ₂ H)							-0,037	
E° (V) (CuL ₂)	-0,075	-0,091	-0,118	+0,055	-0,037	-0,056		-0,002

4.3. Multihisztidin peptidek réz(II)-komplexeinek vizsgálata

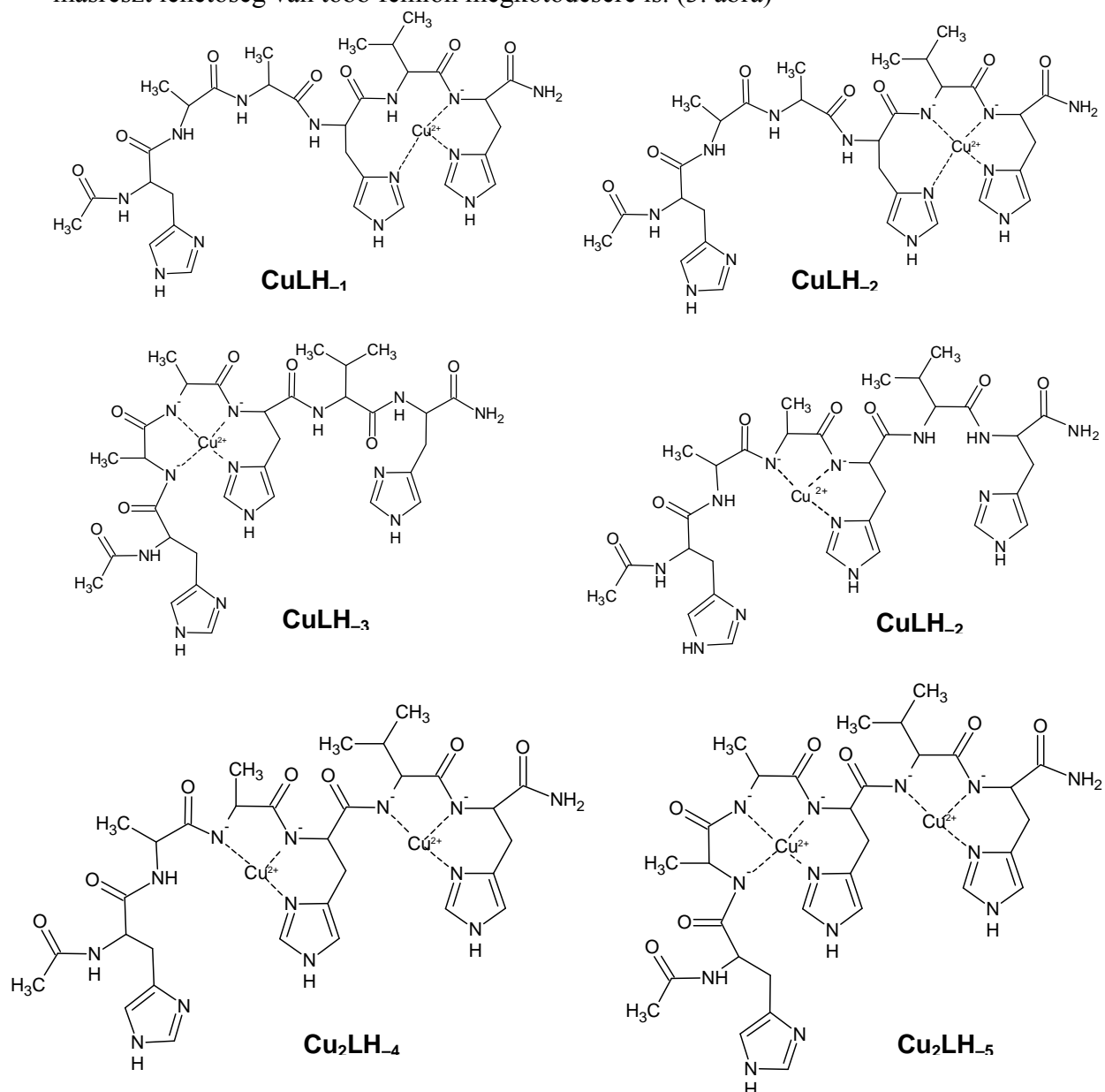
4.3.1. Oldategyensúlyi vizsgálatok^{6,7,8,9,10,11}

Az elmúlt években a kutatócsoportunkban a pályázati időszakot megelőzően és a pályázat időszakában is számos, különböző számban és helyen hisztidint tartalmazó terminálisan védett vagy szabad terminális csoportot tartalmazó peptid szintézisére és réz(II)-komplexeinek oldategyensúlyi és szerkezeti jellemzésére került sor. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a hisztidinek számának növelése a molekulában a csak imidazol koordinációjú CuL komplexek stabilitását növeli, és képződése jelentős mértékben a fiziológiás tartomány felé tolódik. Azt is megállapítottuk, hogy a legkedvezőbb az imidazol koordinációjú, makrokelátot tartalmazó komplexek képződése azon ligandumok esetén, amelyek szekvenciája Ac-(HX)_nH-NH₂ vagy Ac-HXXXHYH-NH₂ (2. ábra).



2. ábra A védett hisztidintartalmú peptidek CuL komplexének stabilitása ($lg\beta$) (a piros ovális vonalak a jelen pályázat keretében vizsgált ligandumokat jelzik)

Ezen koordinációs mód azonban nagyobb pH-n nem akadályozza meg a peptidcsoport amidnitrogénjeinek deprotonálódását és koordinálódását. Az imidazolcsoportok lúgos tartományban horgonycsoportként elősegítik ezeket a folyamatokat, és általánosan megállapítható, hogy $(\text{Im}(\text{N}), \text{N}^-, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N})) / (\text{N}^-, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N}))$ koordinációjú MLH_2 vagy $(\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N}))$ koordinációjú MLH_3 komplexek képződnek. A több oldalláncbéli donorcsoport jelenléte azonban egyrészt izomer szerkezetű egymagvú komplexek képződéséhez vezet, másrészt lehetőség van több fémion megkötődésére is. (3. ábra)



3. ábra Az amidnitrogén deprotonálódásával képződő egymagvú és kétmagvú komplexek lehetséges szerkezeteinek sematikus rajza (L = Ac-HAAHVH-NH₂)

A multihisztidin peptidok esetén általában annyi fémion megkötődésére van lehetőség, ahány imidazolcsoport van jelen. Ezt különösen jól szemléltetik azon peptidoknak a komplexképzési folyamatai, amelyekben a hisztidin távol helyezkedik el, így a molekulában teljesen szeparált fémionkötőhelyek vannak. Így terminális aminos csoportot tartalmazó AHAAGH, AAHAAGH, GTHSMKHM-NH₂, MKHMGTHS-NH₂ peptidok esetén az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N}))$, illetve az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N}))$ koordinációs mód mellett az $(\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{Im}(\text{N}))$ donorcsoportokon keresztül kötődik a második fémion, Cu_2LH_4 , illetve Cu_2LH_5

komplexeket alkotva, míg a védett Ac-GTHSMKHM-NH₂ peptid esetén a két fémion (N⁻,N⁻,N⁻,NH₂) koordinációval kötődik Cu₂LH₆ komplex képződésével.

Ezek a kötőmódok ugyancsak jellemzőek azon rendszerekben megjelenő komplexeknél, ahol réz(II)- és nikkel(II)ion is jelen van. Az eredmények azt mutatták, hogy a vegyes fémionokat tartalmazó többmagvú komplexek képződése jellemző. A réz(II)- (és nikkel(II)-)ionok ugyanakkor eltérő affinitással kötődnek a molekulához, amelyet alapvetően a kötőhely közvetlen közelében levő aminosav-szekvencia határoz meg. A CD spektroszkópia alkalmas módszernek bizonyult annak megállapítására, hogy ha a rendszerben csak réz(II)ion van jelen, illetve, ha réz(II) és nikkel(II) együttesen, akkor milyen arányban kötődnek a fémionok a különböző aminosav-szekvenciájú kötőhelyeken. A terminális aminocsoportot tartalmazó peptidok esetén az N-terminális rész a réz(II) számára, míg a közbelső hisztidin a nikkel(II) számára jelent kötőhelyet. A védett Ac-GTHSMKHM-NH₂ peptid esetén pedig az MKHM szekvencia a réz(II) által, a GTHS szekvencia pedig a nikkel(II) által preferált kötőhely. A DFT számítások is alátámasztották ezt a kötési preferenciát.

4.3.2. Elektrokémiai vizsgálatok^{9,12}

Jól ismert, hogy a natív enzimben a Cu(II)-ion csak oldalláncbéli imidazolnitrogén donoratomokhoz koordinálódik. Így a terminálisan védett multihisztidin tri-, tetra-, penta- és heptapeptidok esetén a megnövekedett stabilitású, csak az imidazolnitrogének kötődésével kialakuló CuL és CuL₂ komplexek elektrokémiai vizsgálatát végeztük el az elmúlt időszakban.

A különböző számú hisztidint tartalmazó peptidok szisztematikus vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a vizes oldatban keletkező imidazol koordinációjú CuL₂ és/vagy CuL komplexek redoxi potenciálja az adott feltételek mellett meghatározható. A folyamat során egyelektronos kvázi-reverzibilis redoxi reakció játszódik le és a normál hidrogénelektrodra vonatkoztatott redoxpotenciál értékek a 200-400 mV tartományba esnek (5. táblázat).

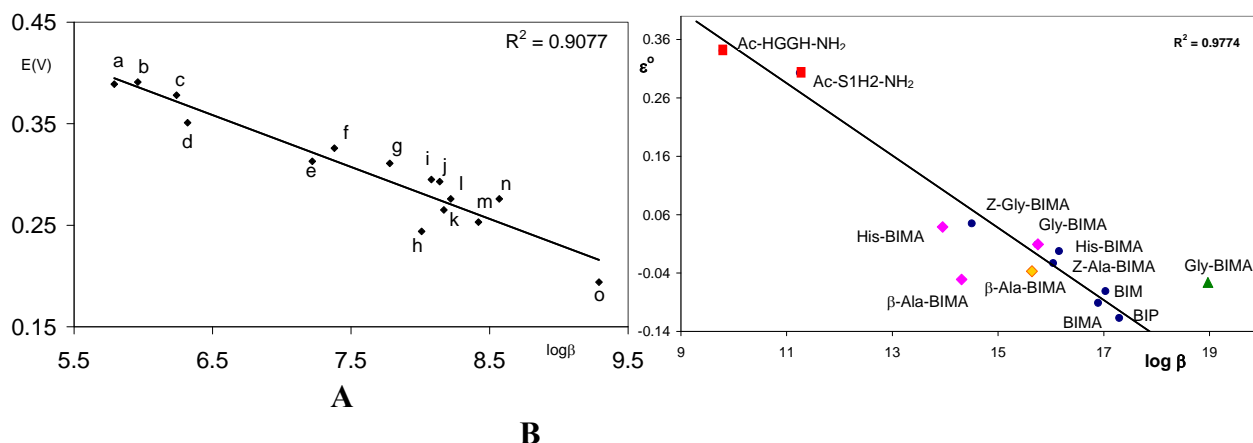
5. táblázat A védett hisztidintartalmú peptidok CuL és CuL₂ komplexeire jellemző elektrokémiai paraméterek a normál hidrogénelektrodra vonatkoztatva

Ligandum	CuL		CuL ₂	
	Koordinációs mód	<i>E</i> ⁰ (V) (vs. NHE)	Koordinációs mód	<i>E</i> ⁰ (vs. NHE)
Ac-HVVH-NH ₂	2 × Im(N)	+0,389	2 × (Im(N),Im(N))	+0,339
Ac-HGGH-NH ₂	2 × Im(N)	+0,390	2 × (Im(N),Im(N))	+0,341
Ac-HAAH-NH ₂	2 × Im(N)	+0,397	2 × (Im(N),Im(N))	+0,323
Ac-HHVGDNH ₂	2 × Im(N)	+0,346		
Ac-HGH-NHMe	2 × Im(N)	+0,351	2 × (Im(N),Im(N))	+0,287
Ac-S1H2-NH ₂			2 × (Im(N),Im(N))	+0,303
Ac-HHGH-NHMe	3 × Im(N)	+0,313		
Ac-HVHGH-NH ₂	3 × Im(N)	+0,311		
Ac-HAHPH-NH ₂	3 × Im(N)	+0,244		
Ac-HAHVH-NH ₂	3 × Im(N)	+0,295		
Ac-S2H3-NH ₂	3 × Im(N)	+0,293		
Ac-HVHAH-NH ₂	3 × Im(N)	+0,253		
Ac-HGGHGH-NH ₂	3 × Im(N)	+0,276		
Ac-HAAHGH-NH ₂	3 × Im(N)	+0,276		
Ac-HAAHVH-NH ₂	3 × Im(N)	+0,265		
Ac-HGGGHGH-NH ₂	3 × Im(N)	+0,326		
Ac-S3H4-NH ₂	4 × Im(N)	+0,194		

Valamennyi esetben a hidrogénelektrodra vonatkoztatott redoxipotenciál értéke belesik a szuperoxid-gyökion redukciójára és oxidációjára vonatkozó redoxipotenciál értékek által meghatározott tartományba. Ebből arra következtettünk, hogy a vizsgált, csak imidazol nitrogének által koordinált réz(II) komplexek valóban alkalmas funkcionális modellkomplexek lehetnek.

4.4. Az imidazol-koordinációjú komplexek redoxi tulajdonságainak tendenciái^{5,12}

Kimutatható, hogy a komplexek stabilitása és a meghatározott redoxipotenciál értékek egymással arányosak, minél nagyobb a keletkező komplex stabilitása, annál kisebb a meghatározott redoxipotenciál érték.



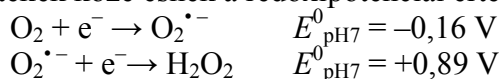
4. ábra (A) A védett hisztidintartalmú peptidek CuL komplexeinek [Ac-HVVH-NH₂ (a); Ac-HGGH-NH₂ (b); Ac-HHVGD-NH₂ (c); Ac-HGH-NHMe (d); Ac-HHGH-NHMe (e); Ac-HGGGHGH-NH₂ (f); Ac-HVHGH-NH₂ (g); Ac-HAHVH-NH₂ (h); Ac-HVHAH-NH₂ (i); Ac-S2H3-NH₂ (j); Ac-HAAHVH-NH₂ (k); HGGHGH-NH₂ (l); Ac-HAHPH-NH₂ (m); HAAHGH-NH₂ (n); Ac-S3H4-NH₂ (o)] és **(B)** a vizsgált ligandumok bisz-komplexeinek redoxipotenciál értéke a stabilitási állandó logaritmusában függvényében

[◆ CuH₂L₂, ◆ CuHL₂, ■, ●, ▲ CuL₂]

A meghatározott értékek a peptidek réz(II)-komplexei esetén a pozitív tartományba esnek, míg a bisz(imidazol-2-il) származékokra ~0 körüli értékek vonatkoznak. A hisztidintartalmú peptidek CuL komplexei esetén a koordinálódott imidazol-N donoratombok számának növekedésével az értékek kismértékű csökkenését tapasztaljuk. Ez összhangban van azzal, hogy a stabilitás növekedése a réz(II) redukálhatóságát csökkenti. Ez a tendencia jól kifejezésre jut, ha a komplexek stabilitásának a függvényében ábrázoljuk a redoxipotenciál értékeket (4.A. ábra).

Általánosan megfigyelhető az a tendencia is, hogy mindkét ligandum típus esetén a bisz-komplexek stabilitási állandója logaritmusának értékével egyenes arányban csökken a redoxipotenciál értéke. Eltérést a protonált komplexek esetén tapasztalunk, ami a komplexek töltésbeli különbségével értelmezhető. Ugyanakkor a Gly-BIMA CuL₂ komplexére jellemző érték kívül esik ettől a tendenciától, amit egyértelműen az eltérő kötés mód magyaráz, mivel ebben a komplexben nem bisz(imidazol-2-il)-szerű koordináció valósul meg, a komplex összetétele valójában Cu(H₁L)L formában adható meg.

Összegezve az eredményeket, arra következtethetünk, hogy az imidazol-N koordinációjú komplexek a meghatározott elektrokémiai paraméterek alapján alkalmasak lehetnek a CuZnSOD enzim modellezésére, mivel valamennyi vizsgált esetben az alábbi egyenletekben szereplő értékek közé esnek a redoxipotenciál értékek.



Ugyanakkor a komplexek redukálhatóságát jelentősen befolyásolja a komplex szerkezetének merevsége, illetve flexibilitása, így a nagyobb redoxipotenciállal jellemezhető peptid-komplexek ígéretesebbek az enzim modellezése szempontjából, mint a merev szerkezetű bisz(imidazol-2-il) komplexek, amelyekre jellemző redoxipotenciál érték az adott potenciáltartomány alsó határához esik közel. A biztos választ ezekre a feltételezésekre a komplexek SOD aktivitás vizsgálatai adták meg.

4.5. A réz(II)-oligopeptid és réz(II)-bisz(imidazol-2-il)-ligandum komplexek SOD aktivitásának vizsgálata^{5,9,13}

A pH-potenciometriás és elektrokémiai eredmények alapján a bisz(imidazol-2-il) koordinációjú bisz-komplexek, illetve imidazolátohidat tartalmazó hárommagvú komplexek, valamint a védett multihisztidin peptidok CuL komplexeinek SOD aktivitását tanulmányoztuk az irodalomban már leírt indirekt fotometriás módszerrel (6. táblázat).

6. táblázat A különböző Cu(II)-komplexekre meghatározott IC₅₀ és relatív aktivitás értékek

pH = 6,8	IC ₅₀ [μ M]	Relatív aktivitás (%)	Komplex	Koordinációs mód
CuZnSOD	0,0028	100	–	–
Cu(II)-(HPO ₄)	0,30	0,92	–	–
Cu(II)-Ac-HGGH-NH ₂	0,27	1,04	[CuL] ²⁺	2 × Im(N)
Cu(II)-Ac-HVVH-NH ₂	0,20	1,40	[CuL] ²⁺	2 × Im(N)
Cu(II)-Ac-S1H2-NH ₂	0,21	1,33	[CuL] ²⁺ ; [CuLH ₁] ⁺	2 × Im(N); 2 × Im(N), N ⁻
Cu(II)-Ac-HHGH-NH ₂	0,17	1,65	[CuL] ²⁺ ; [CuLH ₁] ⁺	3 × Im(N); 2 × Im(N), N ⁻
Cu(II)-Ac-HAHPH-NH ₂	0,12	2,33	[CuL] ²⁺ ; [CuLH ₁] ⁺	3 × Im(N); Im(N), N ⁻
Cu(II)-Ac-S2H3-NH ₂	0,24	1,17	[CuL] ²⁺ ; [CuLH ₁] ⁺	3 × N(Im); 3 × Im(N), OH ⁻
Cu(II)-Ac-S3H4-NH ₂	0,11	2,55	[CuL] ²⁺	4 × Im(N)
Cu(II)- β -Ala-BIMA	0,12	2,39	[Cu ₂ H] ²⁺ ; [Cu ₂ H ₂] ⁴⁺	4 × Im(N)
Cu(II)-Gly-BIMA	0,27	1,04	[Cu ₂ L ₂ H ₂] ²⁺ ; [CuL ₂] ²⁺	2 × Im(N), N ⁻ , NH ₂ ; 3 × Im(N), N ⁻ , NH ₂
pH = 7,4				
CuZnSOD	0,0044	100	–	–
Cu(II)-(HPO ₄)	0,34	1,30	–	–
Cu(II)-Ac-HGGH-NH ₂	0,38	1,16	[CuLH ₂]; ([CuLH ₃] ⁻)	2 × N(Im), 2 × N ⁻ ; N(Im), 3 × N ⁻
Cu(II)-Ac-HVVH-NH ₂	0,63	0,70	[CuL] ²⁺	2 × N(Im)
Cu(II)-Ac-S2H3-NH ₂	0,15	2,93	[CuLH ₁] ⁺ ; ([CuL] ²⁺)	3 × N(Im), N ⁻ ; 3 × N(Im)
Cu(II)-Ac-S3H4-NH₂	0,046	9,56	[CuL]²⁺	4 × N(Im)
Cu(II)-Ac-HAAHGH-NH₂	0,048	9,16	[CuLH₁]⁺	N(Im), N⁻, N(Im)
Cu(II)-Gly-BIMA	4,2	0,10	[CuLH] ³⁺ ; [Cu ₂ L ₂ H ₂] ²⁺	2 × Im(N); 2 Im(N), N ⁻ , NH ₂
Cu(II)-His-BIMA (1:10)	0,64	0,69	[Cu ₂ L ₂ H ₂] ²⁺ ; [CuL ₂] ²⁺ ; [CuL ₂ H ₁] ⁺	2 × Im(N), N ⁻ , NH ₂
Cu(II)-His-BIMA (3:2)	0,070	6,27	[Cu₃L₂H₄]²⁺	4 × N(Im) + imidazoláto-híd

Megállapítottuk, hogy a réz(II)ionnal való komplexképződés növeli az aktivitást a szabad $\text{Cu}(\text{HPO}_4)$ aktivitásához képest. Ez az aktivitás nem kisebb mértékű, mint amit az irodalomban már más imidazol koordinációjú réz(II)komplexek esetén közöltek. Azt is megállapítottuk, hogy a fémionhoz kötődő hisztidin imidazol nitrogének számának növekedésével az aktivitás növekedik, így a legnagyobb – az irodalmi értékekhez képest is nagyobb – aktivitást a négy hisztidint tartalmazó peptid esetén kaptunk.

A bisz(imidazolil) koordinációjú és imidazoláto-hidas komplexek SOD aktivitás vizsgálata ugyanakkor azt mutatta, hogy a $\text{Cu}(\text{II})$ -peptid komplexekkel összevetve a kisebb redoxi potenciál értékkel jellemezhető imidazol koordinációjú komplexek kisebb SOD aktivitást mutatnak. Ugyanakkor jelentős mértékű SOD aktivitás figyelhető meg az imidazolátohidas komplexek esetén.

4.6. Aromás gyűrűt tartalmazó ligandumok VO(IV)-, Fe(II)- és Fe(III)-komplexeinek oldategyensúlyi és elektrokémiai vizsgálata

Az eddig összefoglalt eredmények is egyértelműen tükrözik, hogy az aromás nitrogént tartalmazó molekulák koordinációs sajátosságai réz(II)ion jelenlétében jelentős mértékben függenek a donorcsoport helyétől és számától. Ugyanakkor kérdésként merül fel ezeknek a ligandumoknak a fémionszelektivitása is, amelyről részletesebb információkat a különböző ligandumok más fémion jelenlétében tapasztalt komplexképző és elektrokémiai sajátosságai adhatnak. Az elmúlt időszakban így különböző aromás N donorcsoportot tartalmazó ligandum, hidroxikarbonsav és egyéb aromás gyűrűt tartalmazó ligandum VO(IV), Fe(II), Fe(III) komplexének oldategyensúlyi és elektrokémiai vizsgálatát végeztük el, együttműködésben a Sassari Egyetem (Olaszország) kutatócsoportjával (Giovanni Micera, Eugenio Garribba).

4.6.1. Egy vagy két aromás gyűrűt tartalmazó ligandumok VO(IV)-komplexei^{14,15}

A vanádium biokémiai szerepe napjainkig sem tisztázott, annyi bizonyos, hogy míg egyes alacsonyabb rendű fajok számára nélkülözhetetlen, addig a magasabb rendű élő szervezetek esetén már kis mennyiség is mérgező lehet. Figyelemre méltó azonban az igazolt inzulinutánzó hatása, vagyis ezek a vegyületek nemcsak csökkentik a magas vércukorszintet, hanem egyéb kísérő tünetek enyhítésére is alkalmasa. Emiatt az alacsonyabb oxidációs állapotú – és ezáltal kevésbé mérgező – vanádium vegyületek az érdeklődés középpontjába kerültek.

Bár az oxovanádium(IV) a hard (kemény) fémionok közé tartozik, így korábban elsősorban oxigéndonor ligandumokkal képezett komplexeit vizsgálták, kérdéses, hogy a szerkezetben nagy mennyiségben jelenlevő és a fémionmegkötésben kiugró szerepet játszó aromás nitrogén donoratommokkal kialakul-e és ha igen, milyen jellegű kölcsönhatás. Ennek megfelelően több egy, illetve kelátképző helyzetben két aromás gyűrűt tartalmazó egyszerű ligandum (2-acetil-piridin, 2-hidroximetil-piridin, 4(5)-hidroximidazol, bisz(pirid-2-il)-metán, bisz(pirid-2-il)keton, bisz(pirid-2-il)amin és bisz(imidazol-2-il)metán) oxovanádium(IV) komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálatát végeztük el.

Egy aromás gyűrűt tartalmazó ligandumok

Az egy aromás gyűrűt tartalmazó ligandumok (2-acetil-piridin, 2-hidroximetil-piridin, 4(5)-hidroximidazol) minden esetben a nitrogén donoratomon keresztül koordinálódnak a fémionhoz, mono- és bisz-komplexeket képezve. Ezek a komplexek kis stabilitásúak és csak savas tartományban vannak jelen, a pH emelésével a fémion hidrolízise figyelhető meg.

Két aromás gyűrűt tartalmazó ligandumok

A vizsgált, bisz(pirid-2-il) és bisz(imidazol-2-il) csoportot tartalmazó ligandumok (bisz(pirid-2-il)metán, bisz(pirid-2-il)metanol, bisz(pirid-2-il)amin, bisz(pirid-2-il)keton, bisz(imidazol-2-il)metán) savas tartományban a két aromás nitrogén donoratomon keresztül koordinálódnak a fémionhoz, mono- és bisz-komplexek képződése közben. A bisz(pirid-2-

il)metán esetén kialakuló dimer szerkezeteket hidroxó-hidas asszociátumok kialakulásával írhatjuk le. A bisz(imidazol-2-il)metán rendszerben az ESR vizsgálatok alapján cisz- és transz-izomerek képződése is kimutatható volt. A bisz(pirid-2-il)keton és bisz(pirid-2-il)metanol rendszerekben (N,O⁻) koordináció valósul meg, ezáltal stabilis [VOL]²⁺, [VOLH₁]⁺ és [VOL₂H₂] komplexek keletkeznek, amelyek jelenléte visszaszorítja a fémion hidrolízisét.

4.6.2. Hisztidin analóg aminosavak és hisztidin analóg aminosavat tartalmazó tripeptid származékok VO(IV)-komplexei¹⁶

A fenti vizsgálatok folytatásaként a hisztidinnel szerkezetileg analóg, de imidazol gyűrű helyett egyéb aromás gyűrűt tartalmazó aminosavak és ezek tripeptidszármazékának oxovanádium(IV) komplexeit tanulmányoztuk. Az eredmények alapján, összevetve a korábbi – réz(II), nikkel(II), cink(II) ionokkal kapott – eredményekkel, általánosan megállapítottuk, hogy a hisztidin analóg aminosavak fő fémionmegkötő helye az amino és karboxilátcsoport, és mono- és biszkomplexek képződnek valamennyi vizsgált fémion esetén. A kialakuló komplexek stabilitását kisebb-nagyobb mértékben befolyásolja az aromás gyűrű gyenge, axiális kötődése, ez a hatás a piridingyűrű jelenléte esetén a legnagyobb. A tripeptidszármazékok koordinációs kémiai viselkedésében már jelentősebb különbséget figyeltünk meg a korábban vizsgált fémionokhoz képest: míg a réz(II) és a nikkel(II) jelenlétében – más tripeptidekhez hasonlóan – az amidnitrogének deprotonálódása és koordinálódása játszódik le, addig az oxovanádium(IV)-ion elsősorban a láncvégi karboxilátcsoporthoz kötődik, de a piridingyűrű koordinációja ebben az esetben is kimutható. Általánosan megállapítottuk:

– mind az aminosavak, mind a tripeptidszármazékok esetén a képződő komplexek stabilitása a **Cu(II) > Ni(II) > Zn(II) > VO(IV)** sorrendben csökken

– a heteroaromás gyűrű jelenléte az aminosavakban és tripeptidszármazékaiban befolyásolhatja az aminosav-, illetve peptidszerű koordinációt és ez a hatás a **piridil > triazolil ~ tiazolil > tienil** gyűrű sorrendben csökken.

4.6.3. Oxigén- vagy [O,N]-donorcsoportokat tartalmazó ligandumok VO(IV)-komplexei^{17,18,19}

Néhány hidroxikarbonsav vizsgálata alapján megállapítható, hogy a ligandumok elsősorban (karboxilát, hidroxil) csoportokon keresztül kötődnek a fémionhoz, stabilizálva néhány ligandum esetén az enol formát. A potenciometria eredményei összhangban vannak az ESR spektroszkópiai paraméterekkel és az elméleti számításokkal.

A két aromás-OH csoportot és N-donoratomot tartalmazó ligandumok (H₃hyph^C, H₃hyph^S, Calmagite, Anthracene chrome red) esetén az (O⁻,N,O⁻) koordinációjú VO(IV) komplexek képződése jellemző. Az aromás nitrogént tartalmazó ligandumok (H₃hyph^C, H₃hyph^S) esetén vizes oldatban biszkomplexek képződése, míg szilárd halmazállapotban non-oxido komplexek képződése mutatható ki. A két azo-nitrogént tartalmazó ligandum esetén a képződő komplexek stabilitási állandói főként fotometriásan voltak meghatározhatók, enyhén lúgos tartományban a non-oxido komplexek képződése is feltételezhető. Ezt a szilárd komplexek vizsgálata és a DFT számítások is alátámasztották.

4.6.4 Aromás gyűrűt tartalmazó ligandumok Fe(II)- és Fe(III)-komplexei

Bisz(imidazol-2-il)-származékok vas(II)- és vas(III)-komplexeinek oldategyensúlyi és elektrokémiai vizsgálata²⁰

Bár a vas(II)-, vas(III)-ionok esetén kisebb affinitás figyelhető meg a különböző környezetben levő N-donoratomokhoz, a biológiai rendszerekben számos redoxi folyamat katalizálásában résztvevő enzimekben a vas(II)-, vas(III)-imidazol kötődés fontos szerepet játszik. Így a réz(II)-bisz(imidazolil)-ligandum rendszerek vizsgálatával párhuzamosan a vas(II)- és vas(III)-bisz(imidazolil)-ligandum rendszerek oldategyensúlyi és elektrokémiai vizsgálatát végeztük el. A legegyszerűbb bisz(imidazolil) származékok mellett a hisztidin aminosavat tartalmazó vegyület vas(II)- és vas(III)-komplexeit vizsgáltuk. Az oldategyensúlyi

vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy ez a koordinációs környezet nem kedvez a komplexképződésnek. Bár a vas(III)-komplexek stabilitása nagyobbak adódott, a hidrolízist nem akadályozta meg a komplexképződés. A kialakuló komplexek stabilitásának növekedése azonban megfigyelhető, ha a molekula oxigén-donorcsoportot (pl. karboxilát-csoportot) is tartalmaz. Az elektrokémiai vizsgálatok az oldategyensúlyi vizsgálatok eredményeit olyan tekintetben alátámasztották, hogy a redoxi paraméterek alapján meghatározott stabilitási állandók egyezést mutatnak a potenciometria eredményeivel.

[O,N]-donorcsoportokat tartalmazó ligandumok vas(II)- és vas(III)-komplexeinek oldategyensúlyi és elektrokémiai vizsgálata²¹

A két aromás-OH csoportot és N-donoratomot tartalmazó ligandumok (H₃hyph^S, Calmagite, Anthracene chrome red) nemcsak a vanádium(IV) számára jelentenek stabilis kötőhelyet. A H₃hyph^C vas-kelátorként gyógyszer formájában is alkalmazzák (Exjade, Novartis). Így a másik három ligandum is potenciális vas-kelátor, amelyeknek vas(II)- és vas(III) komplexeit oldatban és szilárd fázisban is jellemeztük, és egy esetben a redoxi paramétereit is meghatároztuk.

A vas(III)ionnal rendkívül nagy stabilitású mono- és bisz-komplexek képződnek (O⁻, N, O⁻) koordinációval. A nagy stabilitás miatt a stabilitási állandókat fotometriásan határoztuk meg. A bisz-komplexek képződését a szilárd formában előállított komplexek IR- és tömegspektroszkópiás vizsgálata is alátámasztotta. A komplexekre meghatározott pFe érték hasonló a már vas-kelátorként alkalmazott vegyületekre, illetve a transferrinre jellemző pFe értékhez (7. táblázat) (deferiprone: pFe = 20,67, transferrin: pFe = 23,6)

7. táblázat A vizsgált ligandumok vas(III)-komplexeire jellemző pFe érték (pH = 7,4, c(L) = 1,00·10⁻⁵ mol/dm³, c(Fe(III)) = 1,00·10⁻⁶ mol/dm³)

	H ₃ hyph ^S	H ₂ calm	H ₃ anth
pFe	22,62	23,21	24,00

A vas(II)ionok jelenlétében kisebb stabilitású komplexek képződnek, az (O⁻, N, O⁻) koordinációjú komplexek keletkezése csak erősen lúgos tartományban volt kimutatható.

A gyógyászatban használt vas-megkötők esetén nagyon fontos a redoxipotenciál ismerete is, mivel a vas-tartalmú komplexek szerepet játszhatnak az oxidatív stressz kialakulásában. A vas(III)-H₃hyph^S rendszerben képződő FeL komplexre -0,176 V és FeL₂ komplexre -0,601 V redoxipotenciál jellemző, ez utóbbi érték alapján a fiziológias pH-n uralkodó komplex nem katalizálja az oxidatív stressz kialakulását.

5. Személyi feltételek, publikációk

A pályázatban tervezett kutatómunka megvalósításában eredetileg 3 szenior kutató vett részt (Várnagy Katalin egyetemi docens, témavezető, Sóvágó Imre egyetemi tanár és a Kállay Csilla tudományos munkatárs), és nagy részt vállalt a munkából Timári Sarolta PhD hallgató. Terveztük egy belépő PhD hallgató (Kiss Dóra) aktív részvételét is, azonban ő mégsem kezdett PhD tanulmányokat. Emellett Kállay Csilla 2012 tavaszától szülési szabadságon van. Így – bár a pályázat célkitűzéseit, úgy gondolom – megvalósítottuk, az utóbbi időszakban született eredmények közleményben való összefoglalása még nem történt meg (két közlemény van előkészületben).

A kutatások eredményeit **8** közleményben foglaltuk össze (össz impakt faktor: **26,348**), és az elmúlt időszakban egy **könyvfejezetünk** jelent meg egy nemzetközi könyvsorozatban. Az eredményekből hazai konferencián 5 előadást, nemzetközi konferencián 6 előadást tartottunk és 14 posztert mutattuk be. A pályázati időszak alatt egy **PhD értekezés** (Timári Sarolta: *Peptidek és származékaik átmenetifém komplexeinek koordinációs és redoxi sajátosságai*, Debreceni Egyetem, 2012) sikeres védésére és egy **MTA doktori**

értekezés benyújtására (Várnagy Katalin: *Az imidazolgyűrű szerepe a fémionmegkötésben: oldalláncban több donorcsoportot tartalmazó peptidok és származékaik átmenetifém komplexeinek egyensúlyi és redoxi sajátosságai*, MTA, 2013) került sor, ez utóbbi már az elbírálás szakaszában van. Emellett számos fiatal kapcsolódott be a munkába, tudományos diákköri, diploma- és szakdolgozati, illetve PhD munka keretében. A fenti területekhez kapcsolódóan a pályázat vezetőjének, illetve résztvevőinek témavezetésével 6 tudományos diákköri dolgozat (egy I. és két III. helyezés az Országos Tudományos Diákköri Konferencián), 9 diplomamunka és 12 szakdolgozat készült.

Hivatkozások

- ¹ Balogh Gábor Zsolt: Diplomamunka, Debrecen, 2009
- ² Sirokai Beáta: Szakdolgozat, Debrecen, 2010
- ³ Cerea Riccardo: Szakdolgozat, Debrecen, 2010
- ⁴ Cerea Riccardo: Diplomamunka, Debrecen, 2012
- ⁵ G. Csire, J. Demjén, S. Timári, K. Várnagy, Polyhedron, 61, 202-212, 2013
- ⁶ Asztalos József Attila: Szakdolgozat, Debrecen, 2012
- ⁷ Kiss Mariann: TDK dolgozat, Debrecen, 2011
- ⁸ Király Judit: Diplomamunka, Debrecen, 2012
- ⁹ Csire Gizella: Diplomamunka, Debrecen, 2012
- ¹⁰ Á. Grenács, A. Kaluha, C. Kállay, V. Józai, D. Sanna, I. Sóvágó, J. Inorg. Biochem., 128, 17-25, 2013
- ¹¹ I. Turi, D. Sanna, E. Garribba, G. Pappalardo, I. Sóvágó, Polyhedron, 62, 7-17, 2013
- ¹² S. Timári, R. Cerea, K. Várnagy, J. Inorg. Biochem., 105, 1009-1017, 2011
- ¹³ Timári Sarolta, PhD értekezés, Debrecen, 2012
- ¹⁴ L. Pisano, D. Kiss, K. Várnagy, D. Sanna, G. Micera, E. Garribba, Eur. J. Inorg. Chem., 2362-2374, 2009
- ¹⁵ Kiss Dóra: TDK dolgozat, Debrecen, 2009
- ¹⁶ Kiss Dóra: Diplomamunka, Debrecen, 2010
- ¹⁷ D. Sanna, K. Várnagy, S. Timári, G. Micera, E. Garribba, Inorg. Chem., 50, 10328-10341, 2011
- ¹⁸ L. Pisano, K. Várnagy, S. Timári, K. Hegetschweiler, G. Micera, E. Garribba, Inorg. Chem., 52, 5260-5272, 2013
- ¹⁹ D. Sanna, K. Várnagy, N. Lihi, G. Micera, E. Garribba, Inorg. Chem., 52, 8202-8213, 2013
- ²⁰ Lihi Norbert: Szakdolgozat, Debrecen, 2012
- ²¹ Lihi Norbert: TDK dolgozat, Debrecen, 2012