



**HISZTIDINTARTALMÚ OLIGOPEPTIDEK
KOMPLEKKÉPZŐ SAJÁTSÁGAI. A PRION PROTEIN
PEPTIDFRAGMENSEI FÉMION-SZELEKTIVITÁSÁNAK
VIZSGÁLATA.**

Doktori (PhD) értekezés

Jószai Viktória

Debreceni Egyetem
Debrecen, 2008



**HISZTIDINTARTALMÚ OLIGOPEPTIDEK
KOMPLEKKÉPZŐ SAJÁTSÁGAI. A PRION PROTEIN
PEPTIDFRAGMENSEI FÉMION-SZELEKTIVITÁSÁNAK
VIZSGÁLATA.**

Doktori (PhD) értekezés

Jószai Viktória

Témavezető: Dr. Sóvágó Imre egyetemi tanár

Debreceni Egyetem

Debrecen, 2008

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem TTK Kémia Doktori Iskola Koordinációs Kémia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem TTK doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2008.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Jószai Viktória doktorjelölt 2003–2006 között a fent megnevezett Doktori Iskola Koordinációs Kémia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2008.

a témavezető aláírása

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálámat szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Sóvágó Imre egyetemi tanárnak, hogy irányításával lehetőségem nyílt részt venni abban a kutatómunkában, amit a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken végezhettem. Köszönöm neki az értékes szakmai tanácsokon és útmutatásokon túlmenően humánusságát is, amelyekkel tevékenységemet folyamatosan támogatta.

Külön szeretnék köszönetet mondani Dr. Ósz Katalinnak a munkám során nyújtott sokoldalú segítségéért, különös tekintettel a kezdeti munkálataim alatt tanúsított türelmére és segítőkészségére.

Köszönet illeti Dr. Nagy Zoltánt, Dr. Bátka Dávidot, Dr. Kállay Csillát, Dr. Nagy Eszter Mártát segítőkészségükért és közvetlenségükért, amelyekkel munkám során a szakmai támogatás mellett baráti légkört teremtettek. Továbbá köszönöm Dr. Farkas Etelkának, Dr. Várnagy Katalinnak, Dr. Buglyó Péternek a kutatásaim idején nyújtott segítségüket, amiről szükség esetén mindig biztosítottak. Köszönöm technikusainknak, Hüse Ilonának és Dr. Gönczy Árpádnénak gyakorlati segítségüket, tanácsaikat. Köszönettel tartozom a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék összes oktató és nem oktató dolgozójának, amiért kezdettől fogva barátsággal fordultak felém.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Bányai Istvánnak az NMR mérésekben nyújtott segítségéért.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak szeretetüket és támogatásukat. Férjemnek, Jószai Istvánnak egyformán vagyok hálás szakmai tanácsaiért és gyakorlati segítségéért, emellett nagyon sokat jelentett a nyugodt és kiegyensúlyozott családi háttér, amelyről mindvégig gondoskodott.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK.....	3
2.1. A vizsgált fémionok koordinációs kémiája és biológiai szerepe	3
2.2. A peptidek komplexkémiái.....	4
2.3. Hisztidintartalmú peptidek komplexkémiája	6
2.3.1. Szabad terminusú hisztidintartalmú peptidek fémkomplexei	6
2.3.1.1. Egy hisztidint tartalmazó peptidek fémkomplexei	6
<i>Réz(II)- és nikkel(II)komplexek</i>	<i>6</i>
<i>Cink(II)-, kobalt(II)- és kadmium(II)komplexek.....</i>	<i>10</i>
<i>Palládium(II)komplexek.....</i>	<i>11</i>
2.3.1.2. Több hisztidint tartalmazó peptidek fémkomplexei	13
2.3.2. Terminálisan védett hisztidintartalmú peptidek fémkomplexei.....	16
2.3.2.1. Egy hisztidint tartalmazó, terminálisan védett peptidek fémkomplexei	16
2.3.2.2. Több hisztidint tartalmazó, terminálisan védett peptidek fémkomplexei	18
<i>A szuperoxid-diszmutáz enzim és aktív centrumának modellezése</i>	<i>19</i>
2.4. A prion protein	23
2.4.1. Általános és szerkezeti jellemzés.....	23
<i>Általános jellemzés.....</i>	<i>23</i>
<i>Feltételezett funkciók.....</i>	<i>26</i>
<i>A HuPrP szerkezete és tartományai</i>	<i>27</i>
2.4.2. A prion protein tartományainak fémionkomplexei.....	29
<i>Réz(II)ion – prion kölcsönhatás</i>	<i>29</i>
<i>Egyéb fémionok – prion kölcsönhatás.....</i>	<i>32</i>
2.5. Célkitűzések	34
3. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	35
3.1. A vizsgálatok során alkalmazott vegyszerek	35
3.2. pH-potenciometria	38

3.3. Spektrofotometria.....	41
3.4. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia.....	42
3.5. ^1H NMR spektroszkópia	44
3.6. ESR spektroszkópia	44
4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	46
4.1. N-terminálisan védett többhisztidin-tartalmú peptidek réz(II)komplexei...46	
4.1.1 Két hisztidint tartalmazó tripeptidek réz(II)komplexei	47
4.1.2. Három hisztidint tartalmazó tetrapeptidek réz(II)komplexei.....	52
4.2. A prion proteint modellező peptidek kétértékű átmenetifémekkel alkotott komplexei.....	58
4.2.1. A His(111) és a His(96) rézkötőhelyeket modellező tetrapeptidek vizsgálata	60
4.2.1.1. A Cu(II) – Ac-MKHM-NH ₂ és Cu(II) – Ac-FKHV-NH ₂ rendszerek komplexképződésbeli különbségei.....	60
4.2.1.2. A Cu(II) – Ac-GTHS-NH ₂ rendszer komplexképződési folyamatai.....	70
4.2.2. A vizsgált ligandumok palládium(II)ionnal való kölcsönhatásai	76
4.2.2.1. A Pd(II) – Ac-His-NHMe rendszer komplexképződési folyamatai.....	77
4.2.2.2. A Pd(II) – Ac-FKHV-NH ₂ rendszer komplexképződési folyamatai.....	82
4.2.2.3. A Pd(II) – Ac-MKHM-NH ₂ rendszer komplexképződési folyamatai.....	86
4.2.3. A tetrapeptid-prionmodellek egyéb fémionokkal (Ni(II), Zn(II), Cd(II), Co(II), Mn(II)) való kölcsönhatása.....	88
4.2.4. Nagytagszámú prionmodellek cink(II)ionnal való kölcsönhatása.....	96
4.2.5. Nagytagszámú prionmodellek – réz(II)/cink(II) vegyes- fémiontartalmú rendszerek vizsgálata.	102
5. ÖSSZEFOGLALÁS	107
6. SUMMARY	110
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	113

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata

N _{im}	imidazolnitrogén
N ⁻	deprotonált amidnitrogén
SOD	szuperoxid-diszmutáz (enzim)
PrP	prion protein
ChPrP	csirke prion proteinje
HuPrP	emberi (humán) prion protein
His(85)Ala	a 85. pozícióban hisztidin helyett alanin található
HmS	α -hidroxil-metil-szerin
bpma	bisz(2-piridilmetil)amin
dien	dietilén-triamin
en	etilén-diamin (1,2-diamino-etán)
pic	2-pikolilamin
Ha	hisztamin
CT sáv	töltésátviteli sáv
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
Z	benzil-oxi-karbonil (védőcsoport)
Me	metil
A vagy Ala	alanin
D vagy Asp	aszparaginsav
E vagy Glu	glutaminsav
F vagy Phe	fenilalanin
G vagy Gly	glicin
H vagy His	hisztidin
K vagy Lys	lizin
M vagy Met	metionin
N vagy Asn	aszparagin
P vagy Pro	prolin
Q vagy Gln	glutamin
R vagy Arg	arginin
S vagy Ser	szerin
T vagy Thr	treonin
V vagy Val	valin
W vagy Trp	triptofán
Y vagy Tyr	tirozin
octarepeat	PHGGGWGQ (monomer)

1. BEVEZETÉS

A fehérjevázban kötött hisztidin imidazol-oldallánca az elsődleges fémmegkötőhely a fémionok számára. Számos olyan fehérjét és enzimet ismerünk, amelyben hisztidin-oldallánchoz koordinált fémiont találunk, ilyenek például a szénsav-anhidrázok, „kék”-rézproteinek, hemoglobin, de akár a szuperoxid-diszmutázok és a prion proteinek is. Ebből kifolyólag napjainkban új lendületet kaptak azon vizsgálatok, melyek hisztidintartalmú peptidek komplexképződési folyamatait vizsgálják különböző átmenetifém-ionokkal, mivel ezen komplexek lehetséges modelljei lehetnek az enzim aktív centrumának, illetve a fehérje fémmegkötőhelyének.

Munkánk fő célja a hisztidin-oldalláncbeli imidazolnitrogén, mint fémmegkötőhely mélyebb megismerésére irányult különféle hisztidintartalmú peptidekben.

Ezt egyrészt az imidazolnitrogén, mint horgonydonor tanulmányozásával szerettük volna megvalósítani többhisztidin-tartalmú peptidek rézzel való komplexképződési folyamatainak vizsgálatán keresztül. A terminális aminocsoport blokkolásával a hisztidin oldallánca jut horgony szerephez, ezért vizsgálatainkhoz terminálisan védett peptideket használtunk. Ez azért is volt fontos, mivel így a vizsgált háromhisztidines peptidek a szuperoxid-diszmutáz enzim aktív centrumának a modellezésére is alkalmasak, ugyanis az enzim rézkötőhelyében három hisztidinoldallánc kerül közel térben egymáshoz (a hídligandum szerepet betöltőn kívül). A kiválasztott két- és háromhisztidin-tartalmú peptidek rézkomplexeit mutatja be a dolgozat első része.

Néhány fémion, miután egy horgonydonorhoz koordinálódott, képes elősegíteni a peptidkötésben résztvevő amidnitrogén(ek) deprotonálódását. Ezáltal a fémion a fehérjevázhoz koordinálódik. Csak néhány olyan példa ismert, melyben a fémion nem csak a hisztidin imidazol-gyűrűjéhez koordinálódik, hanem a fehérjevázhoz is. Ezek közé tartozik a prion protein és az amiloid prekursor protein (ennek egy része az amiloid- β peptid), az albumint is ide lehet sorolni, de ez valamilyen szinten kivétel, mivel ebben nem csak az imidazolnitrogén, hanem a terminális aminonitrogén is horgony szerephez jut.

Másrészről, célunknak megfelelően, az imidazolnitrogén horgonydonor szerepét a fent említett prion protein peptidfragmenseivel terveztük tanulmányozni. A prion protein egy sejtfelületi glikoprotein, mely minden emlősben megtalálható, főként az idegsejtekben van jelen nagy koncentrációban. Napjainkban nagy figyelmet kapott ez a fehérje, mivel konformációjának megváltozása olyan

idegsorvadással járó betegséget idéz elő, mely nem csak a kutatók számára cseng ismerősen. Ez az átoltható szivacsos agyvelősorvadás (prion betegség), vagy a szarvasmarhákknál kergemarhakórként szokták még említeni. A szokásosnál nagyobb figyelem oka az, hogy a fertőzött marhahús fogyasztásának következményeként felmerült az ember fertőződésének lehetősége, mely a prion betegség emberben előforduló változatát idézi elő, a variáns Creutzfeldt-Jakob-kórt. Mindmáig ismeretlen az az ok, mely a normál fehérjéből a kóros konformációjú eredményezi. Nagy mennyiségű kutatási eredménynek a következménye, hogy mára talán elfogadott az a megállapítás, mely szerint a prion fehérje normál állapotban megköti a rézet. Az is ismeretes, hogy a kóros forma kialakulása után nem csak a réz, hanem néhány egyéb fém koncentrációja is megváltozik a sejtben. Ebből kifolyólag a prion protein peptidfragmenseinek vizsgálatai nem csak rézzel folytak, hanem egyéb kétértékű fémionokkal is.

Munkánk kezdetekor a protein octarepeat tartománya már jóval szélesebben tanulmányozott volt, mint az azon kívül esők. Ezért a ligandumok kiválasztásakor a 96. és a 111. helyzetben lévő hisztidinek környékének modellezésére fektettük a hangsúlyt. E peptidek vizsgálatainak eredményeivel foglalkozik a dolgozat második, egyben nagyobbik része is.

2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

2.1. A vizsgált fémionok koordinációs kémiája és biológiai szerepe

A réz biológiai szerepe igen jelentősnek mondható. A vas és a cink után a legnagyobb mennyiségben előforduló létfontosságú nyomelem az emberi szervezetben. Fehérjékhez való nagy affinitása miatt rézproteinekben kötve találhatjuk meg az élő szervezetben. Funkciójuk a réz szállításához (ceruloplazmin), tárolásához (metallothionein), illetve redoxi folyamatok katalíziséhez kapcsolódik (szuperoxid-diszmutázok, oxidázok, oxigenázok, elektron-transzferproteinek). Ezekben a réz főleg +2, illetve +1 oxidációs állapotban fordul elő. A réz(II)ion peptidekkel tetragonálisan torzult oktaédes térbeli szerkezetű komplexeket alkot, a torzulás a Jahn-Teller hatás következménye. A 3d-átmenetifémek körében kiugró termodinamikai stabilitással rendelkeznek komplexei, amit az Irving-Williams sor szemléltet: $Mn(II) < Fe(II) < Co(II) < Ni(II) < Cu(II) > Zn(II)$.^[1,2]

A nikkellétfontossága az ember és a gerincesek esetében kérdéses, ám fontos szerepe van számos növény és baktérium számára. A nikkeltartalmú enzimek főbb típusai az ureázok (karbamid hidrolízisét katalizálják), a hidrogenázok (a hidrogén és az oxigén vízzé való átalakulását katalizálják), emellett érdemes még megemlíteni a koenzim F_{430} -et, illetve a metil-S-koenzim-M reduktazt (a széndioxid metánná való átalakulásában vesz részt). Míg az utóbbi két esetben a nikkelt +1 oxidációs állapotban van, addig az enzimek zömében +2-es nikkelt találunk. Ez utóbbi koordinációs kémiáját tekintve oktaédes és síknégyszetes térbeli szerkezetű komplexeket alkot (ritkán tetraédes). A hatos koordinációs számú oktaédes komplexek paramágnesesek, viszont a négyes koordinációs számú síknégyszetes komplexek mindig diamágneses tulajdonságúak.

Bár koordinációs kémiai szempontból nagy hasonlóságot mutat a $Zn(II)$ -, a $Co(II)$ - és a $Cd(II)$ -ion, élettani hatásuk teljesen különböző. Komplexeik termodinamikai stabilitása igen hasonló. Sztereokémiájuk tekintetében zömében oktaédes és tetraédes komplexeket alkotnak (a kadmium esetében mérete miatt az oktaédes a preferált). A lágyabb karakterű (hard-soft elmélet) kadmium kifejezetten toxikus az emberi szervezet számára. A kobaltnak van biológiai szerepe, elsősorban a B_{12} -vitamin és a B_{12} -koenzim kerül említésre az irodalomban. Az utóbbinak a C–C kötés átalakításában van szerepe. A cink a második helyen áll (a vas után) a létfontosságú nyomelemek körében a szervezet átlagos

cinkmennyiségét tekintve. Alapvetően kétfajta szerepet tölt be, az egyik az enzimaktivátori (szénsav anhidráz, karboxipeptidáz), a másik a szerkezetalakító (cinkujjak és egyéb transzkripció faktorok, amelyek a DNS-hez kötődve aktiválják azt).

A 3d átmenetifémek között a kobalt(II) után a cink(II) és a mangán(II) képez a legtöbb tetraédes szerkezetű komplexet, ezenkívül az utóbbi ugyancsak képez oktaédes komplexeket is. Nyomelemként a mangán jelentős szerephez jut az élő szervezetben. Megtalálható a Mn-tartalmú SOD-ok, katalázok, peroxidázok aktív centrumában, légzési enzimek kofaktora, ezenkívül szerkezetalakító szerepet is betölthet (lektinek).

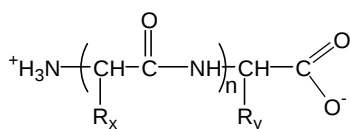
A +2 oxidációs állapotú palládium kizárólag síknégyzetes, diamágneses komplexeket alkot. Az említett fémionok körében a legnagyobb mértékben bír "soft" tulajdonságokkal. Ebből kifolyólag "kedveli" a S- és a N-donorokat, kiugróan nagy termodinamikai stabilitású komplexeket képezve. Kinetikai szempontból komplexei a két szélső határ, a labilis és az inert közötti képzelt egyenes közepe tájára tehetők, valamelyest az inert felé tolva (némiképp lassú csere). Biológiai szempontból nincs jelentősége olyan értelemben, hogy az élő szervezetben természetes körülmények között nem fordul elő, sőt mérgező. Komplexei leginkább elméleti szempontból érdekesek nagy stabilitásuk miatt, esetleges mérgezések, illetve platinakomplexek hatás-mechanizmusának feltérképezésére lehetnek alkalmasak.

2.2. A peptidek komplexkémiai sajátosságai

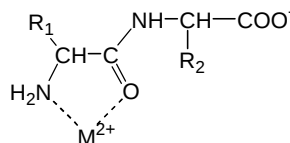
Korábbi kutatások eredményeként napjainkban már számos összefoglaló mű is rendelkezésünkre áll a peptidek és fémionok kölcsönhatását illetően.^[3-7] Az említett közlemények zöme a réz(II)-, illetve a nikkel(II)ion komplexekkel foglalkozik. Ezekből a peptidek néhány általános koordinációs kémiai sajátosságára lehet következtetni.

Egy peptidet vizsgálva, amely nemkoordinálódó oldalláncokat tartalmaz, 4 fajta funkciós csoportot találunk, amelyek fémkoordináció szempontjából fontosak lehetnek: amino-, karbonil-, amid- és karboxilátcsoport (1. ábra). Irodalmi adatok bizonyítják, hogy a karboxilátcsoport egyfogú koordinálódása következtében igen gyenge horgonycsoportnak minősül^[8] (blokkolt N-terminális rész esetén). Önmagában még ennél is gyengébb fémmegkötőhely a karboniloxigén, koordinációja a fémionhoz abban az esetben valósul meg, ha a fémion egy horgonydonor segítségével koordinálódik a ligandumhoz, és ezáltal a

karboniloxigén kelátképző helyzetbe kerül,^[9] ennek a koordinációs módnak a kialakulása jellemző az átmenetifém-komplexekre savas közegben (2. ábra).^[10] Általánosan is megállapítható, hogy a terminális aminocsoport igen jó horgony, azaz stabil kötést alkot a fémionnal és oldatban tartja azt, ennek következtében a fémion képes indukálni az amidnitrogén deprotonálódását. Az amidcsoport kis bázicitása miatt ugyanis koordinációja csak az amidnitrogén deprotonálódása után valósulhatna meg (ami a szabad ligandum esetén pH 14 fölött van). Az amidnitrogén deprotonálódását az egyszerű peptidekben csak néhány fémion képes elősegíteni, ezek a Pd(II), Pt(II), Cu(II), Ni(II) és Au(III), illetve néhány szokatlan oxidációs számmal rendelkező, ez a sor azonban bővíthet az oldalláncokban jelen lévő donorok hatására. Érdemes megemlíteni, hogy a donorcsoportok komplexkéimiai karaktere a fémion természetétől is függ.

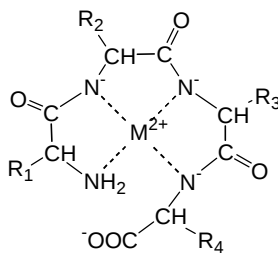


1. ábra. Egy peptid általános szerkezeti képlete



2. ábra. Savas közegben képződő $[ML]^+$ komplex szerkezete (L: egy dipeptid)

Abban az esetben, ha több amidkötés van a peptidben, a pH növelésével azok deprotonálódnak és koordinálódnak a központi fémionhoz, ezáltal stabil csatolt kelátrendszert hozva létre (3. ábra), amely meggátolja a fémion hidrolitikus folyamatainak a megindulását.



3. ábra. Egy tetrapeptid $[MLH_3]^{2-}$ komplexének szerkezete

Abban az esetben, ha koordinálódó oldallánc van a peptidben, az nagyban növeli a fémion–peptid kölcsönhatás sokszínűségét. Ilyen oldalláncbeli donortatom lehet az imidazolnitrogén (His), tiolkén (Cys), karboxiláttoxigén (Asp, Glu) és a tioéterkén (Met). Munkánk szempontjából a hisztidintartalmú peptidek játszanak meghatározó szerepet, ezért a következő alfejezetekben az e témakörhöz kapcsolódó irodalmat tekintjük át.

2.3. Hisztidintartalmú peptidek komplexkémiája

Metalloenzimekben a hisztidin aminosav meghatározó szerepet játszik a fém koordinálódása szempontjából. Sok esetben az enzimek vagy fehérjék rendellenes működésénél a fémion hatása nyilvánvaló, viszont hogy mi is történik valójában (fémion szerepe), azt egyértelműen nem lehet megmondani. Ehhez tudnak bennünket közelebb vinni az erre irányuló vizsgálatok, nevezetesen a hisztidintartalmú peptidek, illetve fémionok közötti kölcsönhatások átható tanulmányozása. A kutatások azt mutatják, hogy a komplexképződés nagyban függ néhány tényezőtől, ilyen a fémion természete, a fémion/ligandum arány, a hisztidin-oldalláncok száma és főleg a hisztidinnek a peptiden belül elfoglalt pozíciója, illetve a szabad vagy blokkolt aminocsoport. Ennek megfelelően ezen irodalom áttekintését több alfejezetre bontva tárgyaljuk.

2.3.1. Szabad terminusú hisztidintartalmú peptidek fémkomplexei

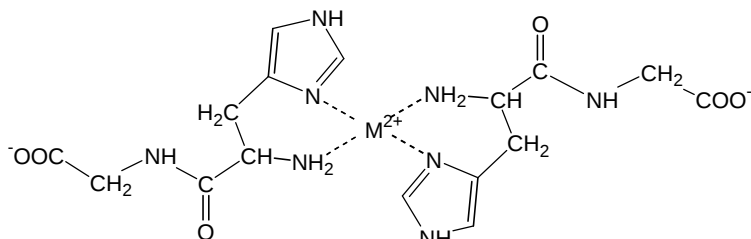
A hisztidint tartalmazó peptidek komplexeit behatóan tanulmányozták, főleg Cu(II) és Ni(II) fémionokkal, ezen kívül több összefoglaló mű is rendelkezésünkre áll.^[4,5,7,11] Ezért az irodalmi áttekintésben e fémionok kapnak nagyobb hangsúlyt.

2.3.1.1. Egy hisztidint tartalmazó peptidek fémkomplexei

Réz(II)- és nikkel(II)komplexek

Mivel a réz és a nikkel valamilyen szintű hasonlóságot mutat e témakörben, ezért érdemes e fémek komplexeit együtt tárgyalni.

Dipeptideknél az N-terminális hisztidin, illetve oligopeptideknél az 1. helyzetben található hisztidin jelenléte e két említett fém komplexekben hisztaminszerű koordinációt eredményez (4. ábra). Jelentős irodalmi háttér áll rendelkezésünkre,^[12-17] a kialakuló komplexek összetétele és szerkezete a fémion/ligandum aránytól függ.

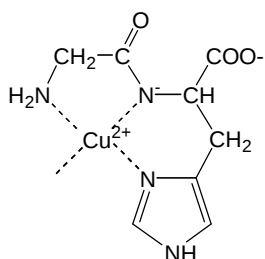


4. ábra. Az M(II) – HisGly rendszerben (1:2 arány) képződő $[ML_2]$ komplex szerkezete (hisztaminszerű koordinációval, M: Cu^{2+} , Ni^{2+})

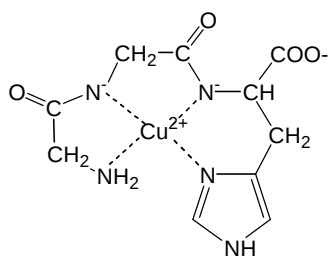
A nikkell(II)komplexek esetében ez a stabilis 6-tagú kelát képes megakadályozni az amidnitrogének deprotonálódását, fémion/ligandum aránytól függően $[NiL]$ és $[NiL_2]$ komplexek képződnek a HisGly, HisMet^[18] és HisGlyGly^[19] ligandummal. A réznél viszont ez a kelát csak hátráltatja az amidnitrogén deprotonálódását: a HisGly ligandum esetében ~1 pH egységgel feljebb tolja az oligoglicinek első deprotonált peptidnitrogénjéhez képest. 1:1 aránynál pH 6 körül $[Cu_2L_2H_2]$ összetételű dimer szerkezet alakul ki, amelyben a rézionhoz a ligandum az amino-, amid- és karboxilátcsoportokon keresztül koordinálódik. Ilyenkor a réznek marad egy szabad koordinációs helye, ide egy másik $[CuLH_1]$ egység hisztidin-oldalláncbeli imidazolnitrogénje koordinálódik. Hosszabb peptideknél szterikus okok miatt nehézkessé válik a kizárólagos dimerizáció, így monomer/dimer egyensúly alakul ki.^[20] 1:2 fémion/ligandum aránynál a nikkelhez hasonlóan a réznél is $[CuL_2]$ biszkomplex képződik (4. ábra). Ezenkívül nagyobb pH-n a következő amidnitrogén(ek) deprotonálódása is lejátszódhat, amint azt a HisSerAspGlyIleuNH₂ esetében tapasztalták. Legújabb elemzések a Cu(II) – HisXaaXaa (Xaa = Gly vagy Ala) rendszerekben CD spektrumok alapján a két ligandum közötti nemkovalens avagy szterikus kölcsönhatást mutattak ki a rézion koordinációs szférájában ($[CuL_2]$ komplexre vonatkozóan), ami magyarázza a szokatlanul nagy $\Delta\epsilon_{max}$ értéket.^[21] A Cu(II) – HisValGlyAsp rendszerben a HisGly-vel ellentétben nem képződik dimer részecske. 1:1 aránynál az $[NH_2, N_{im}, COO^-]$ kötésmódot az $[NH_2, N_{im}, N^-, COO^-]$, majd az $[NH_2, 2N^-, COO^-]$ váltják, míg ligandumfeleslegnél fiziológiás pH-n biszkomplex az uralkodó (hisztaminszerű koordinációval).^[22]

A 2. helyen hisztidint tartalmazó peptidek esetében lehetőség van (5,6)-tagú csatolt kelátrendszer kialakulására, ez az $[NH_2, N^-, N_{im}]$ típusú koordinációs móddal válik lehetségessé (5. ábra). Ezt a GlyHis^[17,23] ligandum réz(II)komplexe esetén sikerült először kimutatni. Ugyanilyen koordinációjú stabilis $[CuLH_1]$ részecskét mutattak ki számos más, 2. helyen hisztidint tartalmazó peptid esetén: AlaHis, AlaHisAla, GlyHisGly,^[24] GlyHisLys,^[25] GlyHisGly,^[26,27] GlyHa,^[28] és

AlaHa,^[29] valamint több röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat is alátámasztja a $[\text{CuLH}_1]$ komplex létezését.^[30-32] A komplexnek van még egy szabad koordinációs helye, amelyre egy másik ligandum egyfogúként képes koordinálódni az aminosav vagy imidazol-nitrogénjén keresztül. A 2. pozícióban lévő hisztidinnek is van élettani vonatkozása, mivel a GlyHisLys a humán szövetek növekedéséért felelős peptid, aktiválása a Cu(II) koordinálódásával van kapcsolatban. Az imidazol-oldalláncon kívül egyéb koordinálódó oldalláncot is tartalmazó peptidek esetében más koordinációs módok is megjelennek.^[33]



5. ábra. A Cu(II) – GlyHis rendszerben képződő $[\text{CuLH}_1]$ komplex szerkezete

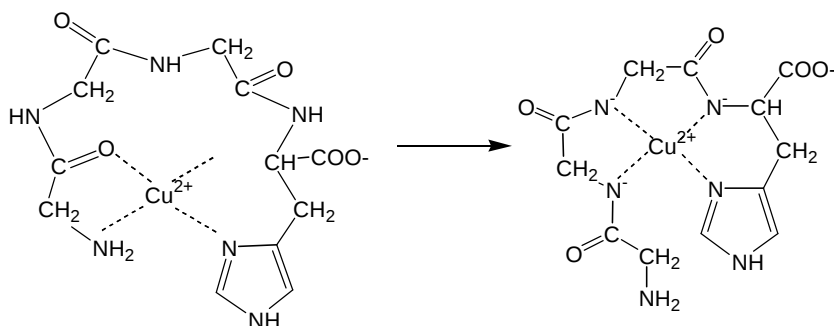


6. ábra. A Cu(II) – GlyGlyHis rendszerben képződő $[\text{CuLH}_2]$ komplex szerkezete (albumin modell)

A Ni(II)ion hasonlóan viselkedik a rézhez, azzal a különbséggel, hogy kisebb mértékben képes az amidnitrogén deprotonálódását elősegíteni, így az nagyobb pH-n megy végbe (pH 6-7, míg a réznél pH 4). 1:1 fémion/ligandum aránynál, lúgos pH-n a negyedik ekvivalens lúgfogyás sárga színű síknégyzetes komplex megjelenését eredményezi.^[23]

Azok a peptidek, amelyek harmadik helyen hisztidin aminosavat tartalmaznak, az „albumin modellek”, általános képletük XaaXaaHis , illetve XaaXaaHisXaa . Az emberi szérum albumin N-terminusán található peptidszekvencia az AspAlaHis, amely kiváló kötőhely a Cu(II)- és a Ni(II)ionok számára. Az albumin a vérplazmában a legnagyobb mennyiségben előforduló protein, feladatai közé tartozik a réz- és nikkellionok szállítása, valamint a nikkell(II)ion koordinálódása ugyanezen szekvenciához aktiválja a nikkellallergiáért felelős antigént. Ezenkívül ennek az XaaXaaHis szekvenciának még számos élettani vonatkozása van: HP2_{1-15} ^[35] (a humán protamin amino-terminális része), a SPARC peptidfragmense^[36] (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cystein), valamint képesek a DNS-lánc szekvenciáinak a felismerésére, illetve specifikus hasítására^[37]. Sok közlemény áll rendelkezésünkre az albumin amino-terminusának modellezésével kapcsolatban.^[21,38-46] Minden esetben a réznél és a nikkelnél is a nagy stabilitású $[\text{MLH}_2]$ részecskét írták le, amelyben a megvalósuló koordinációs

mód $[\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}]$ (6. ábra). Az amidnitrogének deprotonálódása kooperatív módon megy végbe, így egyidejűleg képződik a három kelátgyűrűt (5,5,6) tartalmazó csatolt kelátrendszer, ami a kiugróan nagy stabilitást biztosítja. Nikkel(II)komplexek esetében térbeli szerkezetváltást figyeltek meg (oktaéderez paramágnesesből síknégyszetes diamágneses komplex képződik), valamint a rézkomplexekhez képest nagyobb pH-n megy végbe az amidnitrogének deprotonálódása. Több kristályszerkezet-vizsgálat is alátámasztotta a 4N-es kötémódot.



7. ábra. A Cu(II) – GlyGlyGlyHis rendszerben képződő $[\text{CuL}]$ makrokelát (savas közegben), illetve a lúgos közegben képződő $[\text{CuLH}_3]$ komplex szerkezete

Ha a peptid a hisztidint az N-terminustól számított negyedik, vagy annál távolabbi pozícióban tartalmazza, a megjelenő koordinációs módok az alábbiak. Makrokelát szerkezetű komplexek az uralkodó részecskék a savas pH tartományban (7. ábra), e komplexekben a terminális aminocsoport és az imidazolnitrogén koordinálódik, illetve emellett még az aminocsoporttal kelátképző helyzetben lévő karboniloxigén is koordinálódhat.^[47] A makrokelát stabilitása a gyűrű méretének növekedésével csökken. A pH növelésével az amidnitrogének lépcsőzetes deprotonálódása megy végbe mind a nikkel-,^[48] mind a rézkomplexek esetében,^[47,49] ezáltal $[\text{MLH}_1]$, $[\text{MLH}_2]$ és $[\text{MLH}_3]$ összetételű komplexek képződnek. Az irodalomban ellentmondásosságot találunk az amidnitrogének deprotonálódásának irányát illetően. Nevezetesen, egyes közleményekben az aminonitrogént követő amidnitrogének a C-terminus irányába haladva deprotonálódnak, míg mások a hisztidin előtti amidnitrogén deprotonálódásáról számolnak be (N-terminus felé haladva). Az összefoglaló közlemény a kisebb peptidek (penta-, hexapeptidek) esetében a $[\text{NH}_2, 3\text{N}^-]$ koordinációs módról számol be (C-terminus felé halad a deprotonálódás), míg a nagyobb peptidmolekuláknál a $[\text{N}_{\text{im}}, 3\text{N}^-,]$ -ről.^[11]

Cink(II)-, kobalt(II)- és kadmium(II)komplexek

E három fémion biológiai jelentősége meglehetősen különbözik (*lásd 3. old.*), ám komplexeik hasonlósága miatt feltételezhető, hogy a két mérgező fémion (Co(II), Cd(II)) helyettesítheti a legkevésbé toxikus cinket. Ez a hasonlóság abban mutatkozik, hogy az egyszerű peptidekkel alkotott komplexeik kis stabilitásúak, pH 5 felett az oldatban [amino-, karbonil-] kötésmód alakul ki, azonban ha a pH eléri a fémion hidrolízisének tartományát, a fémion elhidrolizál (nem történik amidnitrogén-deprotonálódás).^[50] Kobalt esetében az [amino-, karbonil-] kötésmódon kívül pH 10 körül az amidnitrogén deprotonálódásáról is beszámolnak a kobalt(II) – GlyGly rendszerben, ám ez oxigénmentes környezetben értendő. A szerzők megemlítik, hogy a koordinálódó oldalláncot nem tartalmazó peptidekben az amidnitrogén deprotonálódását a cinkkel ellentétben a kobalt(II)ion azért tudja indukálni, mert esetében kicsivel nagyobb az energetikai nyereség a ligandumtér-stabilizáció miatt, illetve mert kisebb a hidrolízishajlama.^[5]

Ez megváltozhat, ha a ligandumok hisztinoldalláncokat tartalmaznak. A három fémion közül a legtöbb közlemény a cinkkomplexekkel foglalkozik. Az a következtetés vonható le, hogy a cinkionidukált peptidnitrogén-deprotonálódás a hisztidinek a peptidben elfoglalt pozíciójától függ. A második pozícióban lévő hisztidin van kiemelt helyzetben amid-deprotonálódás szempontjából, ugyanis ezeknél a ligandumoknál figyeltek meg cinkion által indukált amidnitrogén-deprotonálódást. Ebben az esetben az $[NH_2, N^-, N_{im}]$ koordináció valósul meg.^[13,23,51-54] Ha a hisztidinek az egyes vagy a hármas helyzetben vannak, a terminális aminonitrogén és az imidazolnitrogén koordinációjáról írnak (HisGlyGly, GlyGlyHis, HmSHmSHis-NH₂).^[55,56,44] Ezzel összhangban a Zn(II) – HisValGlyAsp rendszerben a hisztaminszerű koordináció a meghatározó (mono- és biszkomplexek képződnek). Lúgos pH-n ez a kötésmód nem tudja megakadályozni a fémion hidrolitikus folyamatainak a megindulását.^[57]

Kobalt(II) esetén az amidnitrogén deprotonálódásáról számolnak be 7,2-es pK-val (GlyHis ligandum oxigénmentes környezetben).^[5] A Co(II) – GlyGlyHa rendszerben fiziológiás pH-n az $[NH_2, N_{im}]$ kötésmódú, makrokelát szerkezetű [CoL] komplex van jelen, míg nagyobb pH-n két peptidnitrogén is koordinálódik.^[58]

Kadmium(II)ion által indukált amidnitrogén-deprotonálódást nem sikerült kimutatni sem hisztidin-oldalláncot, sem más koordinálódó oldalláncot tartalmazó peptidek komplexeiben.^[59,60]

Palládium(II)komplexek

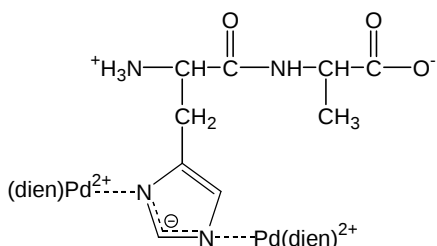
A palládium(II)ion a legalkalmasabb az analóg platina(II)komplexek modellezésére.^[61] Ezt arra alapozzák, hogy kémiai sajátságaik (soft karakterük), komplexeik sztereokémiája és összetétele nagyon hasonló, ugyanakkor a palládium(II)ion ligandumszubsztitúciós reakcióinak sebessége mintegy öt nagyságrenddel nagyobb, mint a platinaioné.^[62] Ez segít az antitumor hatású platinakészítmények hatásmechanizmusának feltérképezésében. Úgy vélik, hogy ezen platinakészítmények nem csak a rákos sejtek DNS-láncához koordinálódva állítják meg azok replikációját, hanem a normál enzimműködést is felborítják. Mivel az enzimekben a hisztidin kiemelt helyzetben van, nagy jelentősége van a hisztidintartalmú ligandumok ezirányú vizsgálatainak.

A Pd(II) peptidkomplexeivel kapcsolatos irodalmat áttekintve megállapítható, hogy a közlemények száma viszonylag nagy, ám olyan közleményekből, amelyek oldategyensúlyi vizsgálatokról is beszámolnak igencsak kevés van. Ennek az az oka, hogy ezen komplexek kiugróan nagy stabilitásúak. A Pd(II) a legnagyobb mértékben segíti elő az amidnitrogének deprotonálódását, ezért a komplexek már erősen savas pH-n kialakulnak. Ebből kifolyólag a termodinamikai paraméterek meghatározása hagyományos technikák segítségével nehezményezett. Ezen kívül a fémion hidrolízisre való hajlama is akadályozza az oldategyensúlyi vizsgálatokat. Már erősen savas oldatban (pH ~ 1) és kis fémion-koncentrációnál is képződnek hidroxokomplexek. Nagyobb pH-n (pH > 2) többmagvú részecskék képződnek, ráadásul a folyamat nem egyensúlyi.^[63-65] Egy, a közelmúltban megjelent közleményben^[66] arról számolnak be (kutatócsoportunk eredménye), hogy di-, tri- és tetrapeptidek Pd(II)komplexeinek a termodinamikai paramétereit sikerült meghatározni a szerzők által kifejlesztett indirekt (kompetíciós) módszer segítségével. A módszer lényege, hogy klordion jelenlétében a peptidligandum verseng a fémionért. Mivel a klordion viszonylag nagy stabilitású komplexeket képez a palládiummal, ezért a peptidkomplexek képződése a nagyobb pH-k felé tolódik, ahol már biztonsággal használható a pH-metria. Ráadásul a fémion hidrolízise is visszaszorul.

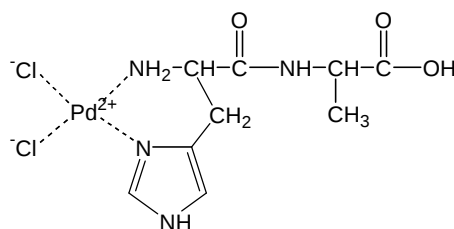
A Pd(II)ion nagymértékű hidrolízishajlama miatt az irodalomban jobbra olyan rendszerek vizsgálatával találkozunk, amelyekben a palládiumnak csak egy vagy két szabad koordinációs helye van, azaz mono-, illetve bifunkciós palládiumkomplexionokról van szó. Ilyenkor a fémion koordinációs helyeit részben blokkolják erősen koordinálódó ligandumokkal, melyeknek koordinációja a mérhető tartományban pH-független. Ilyen ligandum lehet a bpma, dien, en és

pic.^[67,68] Ezen kívül a kiindulási palládium sok esetben annak tetrakloro-palladát komplexe.

Ilyen palládium-komplexionokkal vizsgálták az alábbi hisztidintartalmú ligandumokat is: HisAla, HisGlyAla, ProGlyAlaHis, HisProGlyAlaHis.^[69] Az első két ligandum esetében a hisztidin az első helyen áll a peptidben, ezért komplexeik koordinációs módjai nagyon hasonlóak. Az egy koordinációs hellyel rendelkező $\text{Pd}(\text{dien})^{2+}$ -nel alkotott komplexeiben már pD 3 körül az imidazolnitrogéneken (N(1), N(3)) keresztüli kötésmód valósul meg, imidazolhidas szerkezetet hozva létre (8. ábra).



8. ábra. A $\text{Pd}(\text{dien})^{2+}$ – HisAla rendszerben savas közegben kialakuló imidazolhidas komplex szerkezete



9. ábra. A PdCl_4^{2-} – HisAla rendszerben kialakuló komplex szerkezete

A PdCl_4^{2-} -ion esetében az imidazolnitrogén deprotonálódása még savasabb tartományban (pD 1,5) játszódik le. Amino- és imidazolnitrogéneken keresztüli kötésmódot írnak le, mely 6-tagú kelátot eredményez (9. ábra). Egy újabb ekvivalens ligandum hozzáadása nem eredményez változást, azaz nem képződik biszkomplex. A szerzők azt feltételezik, hogy az első ligandum koordinálódása a Pd – Cl kötés megerősödését eredményezi. Lúgos tartományban a ligandum többi potenciális fémmegkötőhelyéhez (N(1)-imidazolnitrogén, amidnitrogén, karboxilátotigén) is kötődik a komplexion, ezáltal oligo- vagy polimer szerkezetű oldhatatlan részecskék képződnek. A PdCl_4^{2-} komplexeivel hasonló koordinációs mód kialakulását figyelték meg a $\text{Pd}(\text{en})^{2+}$ komplexeiben savas pH-n, miközben a kiindulási komplexion két szabad koordinációs hellyel rendelkezik az előzőhöz képest.^[70]

A ProGlyAlaHis ligandum esetén PdCl_4^{2-} -iont használtak. A szerzők arról írnak, hogy a rézzel és a nikkellel ellentétben nem tapasztalták a ligandum egyfogú koordinálódását, már igen savas pH-n (pD 1,2) makrokelát-szerkezetet azonosítottak NMR spektroszkópiás mérések segítségével. Ebben a prolin imincsoportjának, illetve az imidazolgyűrű nitrogénjének (N(1) vagy N(3)) a koordinációját írták le (koordinációs izomerek képződnek). Kicsivel nagyobb pH-n

(~ 3) a háromnitrogénes részecske az uralkodó. Az előbbi N(3) koordinációjú izomerhez képest, ebben a hisztidin amidnitrogénje is koordinálva van. A következő deprotonálódási lépcsőben már csak a karboxilátcsoport koordinálódás nélküli deprotonálódásáról számolnak be. Nagyobb pH-n (pD 5,8) polimer részecskék képződnek, és mivel az átrendeződés nagyon lassú, ezért ebben a pH-tartományban már nem használják a potenciometriát. Ez az egyetlen közlemény, amelyben egyensúlyi adatokat is közölnek hisztidintartalmú peptidekről, ami azért hasznos, mert ezek összevethetők más fémionok komplexeivel, valamint a Pd(II)komplexeinek stabilitását is összehasonlíthatjuk.^[71] Ugyanezen ligandum (ProGlyAlaHis) azonban a monofunkciós Pd(dien)²⁺-nel alkotott komplexeiben savas pH-n komplexfémion – imidazolnitrogén (N(1) vagy N(3)) kölcsönhatás valósul meg, míg semleges pH-n mindkét imidazolbeli nitrogénhez kapcsolódik egy-egy Pd(dien)²⁺ egység, imidazolhidas szerkezetet alkotva.

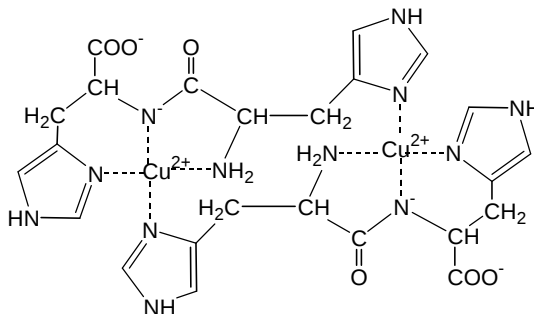
A HisProGlyAlaHis ligandum komplexeit nem a következő fejezetben tárgyaljuk, mivel a palládium esetén ez az egyetlen vizsgált többhisztidines ligandum, illetve a könnyebb összehasonlíthatóság okánál fogva, ugyanis a hisztidint tartalmazó részek szeparált, egymástól független módon viselkednek, komplexeik hasonlóak az egyhisztidines ligandumokéhoz. A HisProGlyAlaHis-béli His(5) azonos módon viselkedik a ProGlyAlaHis-béli hisztidinnel a Pd(dien)²⁺-nel alkotott rendszerben, míg az N-terminális His(1) a HisAla, HisGlyAla ligandumokhoz hasonlóan: két Pd(dien)²⁺ egység az imidazolgyűrűhöz kapcsolódik. A kéthisztidin-tartalmú ligandum komplexképződését más palládium-komplexionokkal (PdCl₄²⁻ és a bifunkciós Pd(en)²⁺) is vizsgálták. A két rendszer egyformán viselkedik. pD < 1,5-nél a palládium az amino- és imidazolnitrogéneken (His(1)) keresztül koordinálódik. Nagyobb pH-n mindemellett a His(5) oldalláncához való koordinálódás után az amidnitrogénekhez való koordinációt is feltételezik.^[72]

A Pd(II) – GlyHis rendszerben az [NH₂, N⁻, N_{im}] kötésmodot írták le, majd pH 9,6 körül pirrol-deprotonálódást követően imidazolhidas struktúrát valószínűsítettek.^[5]

2.3.1.2. Több hisztidint tartalmazó peptidek fémkomplexei

A legegyszerűbb kéthisztidines peptid a HisHis. pH 4 körül [CuLH] összetételű komplexet alkot a rézzel,^[23,73] amelyben hisztaminszerű koordináció valósul meg: [NH₂, N_{im}]. pH 5-6-ra a GlyHis-nél (5. ábra, 8. old.) is megfigyelt koordinációs mód alakul ki: a központi fémion az amino-, amid- és a második helyen álló

hisztidin imidazol-nitrogénjéhez koordinálódik. pH 7 körül $[\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_2]$ összetételű dimer szerkezetű komplex képződik (10. ábra).



10. ábra. A Cu(II) – HisHis rendszerben képződő $[(\text{CuLH}_1)_2]$ dimer részecske szerkezete

Az adott szekvenciához további aminosavakat illesztve (HisHisGlyGly^[74]) a koordinációs mód változatlan marad. A nikkel(II)ionok szintén indukálják az amidnitrogén deprotonálódását a HisHis ligandumban, ellenben a cink(II)ion nem, esetében hisztaminszerű koordinációt írtak le (a HisHis védett származékai esetében sem tapasztaltak amiddeprotonálódást).^[75,76] A HisGlyHisGly^[74,77] ligandum réz(II)komplexében fiziológiás pH-n a GlyGlyHis-nel megegyező koordinációs módot találunk, nevezetesen az „albumin modellek”-hez hasonlóan $[\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}]$ donoratomok koordinálódnak. Az említett HisHisGlyGly és HisGlyHisGly ligandumok cink(II)ionnal való komplexképződési folyamatait is vizsgálták, amelyet ^1H NMR segítségével követték nyomon. Az utóbbi ligandumnál hisztaminszerű koordinációt mutattak ki, viszont az előbbinél a hisztaminszerű koordinációt nagyobb pH-n egy másik koordinációs mód váltja fel: a Zn(II)ion az amino-, az amid- és a His(2) imidazol-nitrogénjéhez koordinálódik, míg a fennmaradó negyedik koordinációs helyet egy másik ilyen HisHisGlyGly komplexnek az imidazolnitrogénje foglalja el (His(1)).^[78] A hisztidinek pozícióit megváltoztatva a GlyHisGlyHis ligandumot kapjuk, amely eléggé bonyolult módon reagál a réz(II)ionnal.^[79] A tetragonális $[\text{CuL}]$ komplex, amelyben GlyHis-szerű $[\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}]$ koordináció van, pH 6 körül négyzetes piramisosba vált át, amikor a $[\text{CuLH}_1]$ komplex képződik a His(4) imidazol-nitrogénjének deprotonálódása és axiális koordinálódása következtében. További átrendeződés pH 7 körül történik, a következő amidnitrogén deprotonálódásakor az kiszorítja az imidazolnitrogént az ekvatoriális síkból, torzult trigonális bipiramisos szerkezetet hozva létre $([\text{NH}_2, 2\text{N}^-]_{\text{ekv}} + [2\text{N}_{\text{im}}]_{\text{ax}})$.

Az EVHHQK-NH₂ (11-16H)^[80] peptid és hosszabb analógjai (11-20H, 11-28H^[81]) az emberi amiloid- β peptid fragmensei. N-terminális részük az

„albumin modellek”-nél is megtalálható szekvenciát tartalmazza, így talán nem meglepő, hogy pH 4,5-10,5 között rézzel a tipikus koordinációs módot találjuk: $[\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}]$. Ugyanez a donoratomcsoport koordinálódik a HisValHis esetében is a Cu(II)-hez, ezt megelőzően kisebb pH-n hisztaminszerű, valamint $[\text{N}_{\text{im}}, \text{NH}_2, \text{N}_{\text{im}}]$ koordinációt írtak le, amely egy makrokelátot is tartalmaz.^[57] A HisValHis komplexképződési folyamatait cink(II)-vel is vizsgálták.^[22] Kisebb pH-n a réz(II)komplexekkel megegyező koordinációs módot találtak, míg lúgos közegben nem történik amidnitrogén-deprotonálódás, vegyes-hidroxokomplexek képződéséről számolnak be.

A HGHGHGHG ligandum kölcsönhatását különböző fémionokkal tanulmányozták^[82], és azt találták, hogy a réz(II) pH 5-nél mind a négy oldallácbeli imidazolnitrogénen keresztül koordinálódik. Ezt találták a nikkell(II)-nél is (síknégyzetes komplex), viszont nagyobb pH-n a réz esetében amidnitrogének deprotonálódnak, míg a nikkelnél ezt nem tapasztalták. Ezzel együtt megállapították, hogy a lineáris peptidmolekulát ezek a fémionok különböző mértékben képesek arra készíteni, hogy egy bizonyos térbeli elrendeződés alakuljon ki (az N_{im} -hez való koordinálódás által) és ez a képesség az alábbi rend szerint változik: $\text{Cu(II)} \sim \text{Ni(II)} > \text{Cd(II)} > \text{Zn(II)}$. A nikkelnél kiugró szerepet tulajdonítottak, mivel a réz nagyobb pH-n az amidnitrogénhez is koordinálódik, ami korlátozza ezt a képességét. Ezzel szemben a HRHRHEQQGHDSAKHGH^[83] és a SerHisHisLys-NH₂^[84] esetében, amelyekben 1. és 3., illetve 2. és 3. pozícióban vannak a hisztidinek, az albuminhoz hasonló koordinációs módról számolnak be, azaz itt az amidnitrogének is deprotonálódnak a Ni(II)komplexekben.

Réz(II)- és nikkell(II)komplexek képződését vizsgálták a HGGGHGHGGGHG peptiddel is.^[85] Mind a két fémion indukálja az amidnitrogén deprotonálódást. 1:1 arány esetén a ligandum N-terminális végét részesíti előnyben a fémion. A koordinációs mód a fémion/ligandum arány és a pH függvényében változik. A réz esetében 1:1 aránynál a makrokelátszerkezetet (His(1), His(5)) az $[\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}]$ koordinációs mód váltja fel, míg 2:1 aránynál a ligandum két rézion megkötésére képes. Nikkell esetében lúgos pH-n $[3\text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}]$ koordináció alakul ki, sem az N-terminális hisztidin (His(1)), sem a His(7) nem vesz részt a koordinációban, és fémionfelesleg esetén szintén két nikkelliont képes megkötni a peptidmolekula. A TLEGTKKGHLHLDY peptid rézzel való kölcsönhatását tanulmányozták UV-Vis spektrofotometriás, CD, ESR, ¹H NMR és ¹³C NMR spektroszkópiás módszerrel.^[86] Azt találták, hogy a koordináció az imidazolnitrogének kezddik, majd nagyobb pH-n az amino- és amidnitrogének is részt vesznek a

koordinációban. A szerzők egy adott összetételű részecskéhez többfajta koordinációs módot is javasolnak.

A fentiekből látszik, hogy minden esetben, amikor a fémion az amidnitrogének deprotonálódását segíti elő, előzőleg egy horgonycsoporthoz kötődik. (Kivételnek számít, hogy nemrégiben egy ciklikus szerkezetű, horgonycsoportot nem tartalmazó ligandum esetén sikerült kimutatni az amidnitrogén deprotonálódását, de csak erősen lúgos közegben.^[87]) A horgony szerepét szabad terminusokkal rendelkező peptidek esetében a példák túlnyomó többségében a terminális aminocsoport biztosítja, illetve az amino- és imidazoldonorcsoportok együttes koordinálódása, noha találunk egy-két példát az imidazol horgony szerepére is szabad N-terminus esetén. Gyakran előfordul az irodalomban, hogy enzim aktív centrumát, illetve peptid fémmegkötőhelyét szabad N-terminusú peptidszekvencia segítségével modellezzik. Az aminocsoport erős horgonydonor jellege miatt e peptidek komplexekben kialakuló koordinációs mód nem mindig azonos az enzimben találhatóival. Ezen oknál fogva a terminális csoportokat védőcsoportokkal látják el (blokkolják). Ilyenkor a metalloenzimek aktív centrumának lehetséges modelljeit kapjuk meg, mivel a hisztidin imidazoldallánca veszi át a horgonydonor szerepét, ahogy az az eredeti enzimben is oly gyakran előfordul. *Ezért munkánk során minden esetben terminálisan védett származékokat vizsgáltunk.*

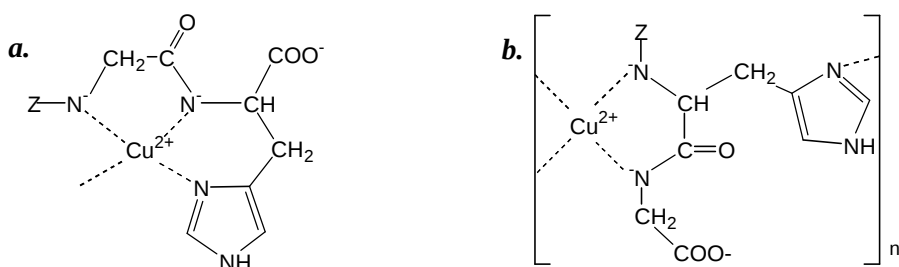
2.3.2. Terminálisan védett hisztidintartalmú peptidek fémkomplexei

2.3.2.1. Egy hisztidint tartalmazó, terminálisan védett peptidek fémkomplexei

N-terminálisan védett hisztidintartalmú peptidek réz(II)komplexeinek vizsgálatát először az Ac-GlyHis, az Ac-GlyGlyHis, az Ac-GlyGlyGlyHis és az Ac-GlyHisGly ligandum esetében végezték.^[17,38] Azt találták, hogy a koordináció az imidazolnitrogénen indul, amit nagyobb pH-n az amidnitrogének lépcsőzetes deprotonálódása követ.

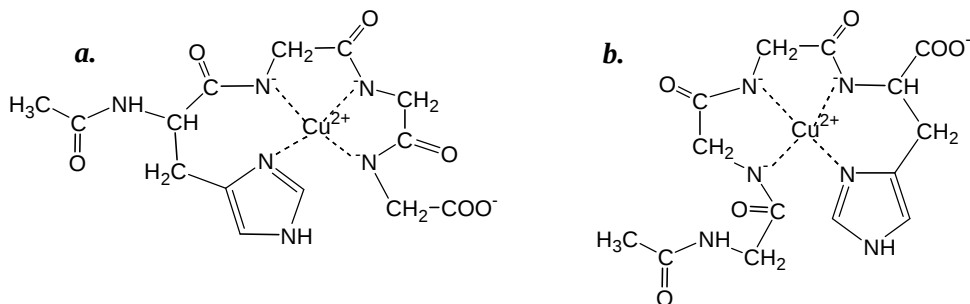
Z (benzil-oxi-karbonil) védőcsoporttal ellátott Z-His, Z-HisGly, Z-GlyHis, Z-GlyGlyHis ligandumok komplexképződését vizsgálták szintén rézzel.^[88] A komplexképződés minden esetben a ligandum egyfogú koordinálódásával kezdődik az imidazolnitrogénen, [CuL] és [CuL₂] összetételű komplexek képződnek. Egy átmeneti pH-tartományban csapadékképződésről számolnak be, amit a [CuL₂] kis oldhatóságával (termogravimetriás- és elemanalízis) magyaráznak (Z-His, Z-HisGly ligandumok [CuL₂] komplexei). A pH növelésével az amidnitrogének

deprotonálódásáról számolnak be. A $[\text{CuLH}_1]$ komplexben az $[\text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}]$ koordináció valósul meg mindegyik ligandum esetében. Amíg a Z-GlyHis, a Z-GlyGlyHis ligandumoknál amidnitrogének deprotonálódásáról van szó, addig a Z-His-nél és a Z-HisGly-nél az „amidszerű” csoport vesz részt a koordinációban. $[\text{CuLH}_2]$ összetételű komplex képződésére már csak a Z-HisGly, Z-GlyHis és Z-GlyGlyHis ligandumok esetében van lehetőség, az utóbbinál viszont az amidnitrogének kooperatív deprotonálódása miatt ez kimarad, és csak a $[\text{CuLH}_3]$ komplex képződik $[3\text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}]$ koordinációval. A két másik dipeptid ezzel szemben képez $[\text{CuLH}_2]$ sztöchiometriájú komplexeket, azonban szerkezetük jelentősen eltér a hisztidin eltérő helyzetéből adódóan (11.a.,b. ábra).



11. ábra. Az **a.** $\text{Cu(II)} - \text{Z-GlyHis-OH}$ és a **b.** $\text{Cu(II)} - \text{Z-HisGly-OH}$ rendszerben képződő $[\text{CuLH}_2]$ összetételű komplexek szerkezete

Szintén egyhisztidin-tartalmú, a hisztidint 1., 2., 3. és 4. helyzetben tartalmazó N-acetilezett peptidok (Ac-HisGlyGlyGly , Ac-GlyHisGlyGly , Ac-GlyGlyHisGly , Ac-GlyGlyGlyHis) rézkomplexeit vizsgálták pH-potenciometriás, UV-Vis, CD és ESR spektroszkópiás módszerekkel.^[89] Azt tapasztalták, hogy az első ligandum (Ac-HisGlyGlyGly) peptidnitrogénjei rendhagyó módon a C-terminus irányába haladva deprotonálódnak, míg a másik három ligandum esetében a peptideknél megszokott módon — az acetilezett N-terminus irányába. A komplexképződés savas közegben minden esetben a hisztidinbeli horgonycsoporthoz (N_{im}) való koordinálódással kezdődik, és nagyobb pH-n az amid- (ill. acetamid-) csoportok deprotonálódásával és koordinálódásával folytatódik. Ezáltal (7,5,5)-tagú (Ac-HisGlyGlyGly), (6,5)-tagú (Ac-GlyHisGlyGly) és (6,5,5)-tagú (Ac-GlyGlyHisGly , Ac-GlyGlyGlyHis) csatolt kelátok képződnek (12.a.,b ábra).



12. ábra. Védett aminoteminusú tetrapeptidek réz(II)komplexei, melyek lúgos pH-ra alkulnak ki (különböző pozícióban lévő hisztidinekkel). **a.** Cu(II) – Ac-HisGlyGlyGly rendszer; **b.** Cu(II) – Ac-GlyGlyGlyHis rendszer

A hisztidint 5. pozícióban tartalmazza az Ac-GluLeuAlaLysHisAla-NH₂ peptid (Ac-ELAKHA-NH₂, a hisztin H2B peptidfragmense), amelynek a Cu(II)-n kívül a Ni(II)komplexeit is vizsgálták.^[90] Rézkomplexeik esetében 1:2 fém/ligandum aránynál fiziológiás pH-n $\{[N_{im}, 2N]_{ekv} + [COO^-]/[N_{im}]_{ax}\}$ koordinációjú biszkomplex képződése volt a meghatározó, míg savas és lúgos közegben monokomplexeik képződtek. Lúgos pH-n a $[4N^-]$ koordináció alakul ki. A nikkelkomplexeik esetében (1:1 arány) a koordináció szintén az imidazolnitrogénen kezdődik, majd lúgos pH-n az $[N_{im}, 3N^-]$ koordinációjú sárga színű síknégyszetes térbeli szerkezetű komplex képződik.

2.3.2.2. Több hisztidint tartalmazó, terminálisan védett peptidek fémkomplexei

Azt, hogy a terminális aminocsoport blokkolása megváltoztatja a koordinációs módot, az eddigi példákból is láthattuk, de szintén jó példa erre az amilod- β peptidfragmenseinek a vizsgálata (a 14., 15. oldalon az azonos szekvenciájú *N*-terminálisan szabad peptidek vizsgálatáról már szó esett). Az Ac-11-16H (Ac-EVHHQK-NH₂),^[80] az Ac-11-20H és az Ac-11-28H^[81] esetében egyaránt az imidazolnitrogén horgony szerepéről számolnak be, pH 4-7 között a rézion mindkét imidazolnitrogénhez kötődik: $[N_{im}, N_{im}]$. A pH növelésével az egymást követő amidnitrogének deprotonálódásáról és koordinálódásáról számolnak be.

Az amiloid prekursor protein (APP) mindkét terminuson védett peptidfragmensei (147-150, 145-155 és 145-157) a HisXaaHisYaaHis részt tartalmazzák. 5 pH körül a réz(II)ion mindhárom imidazolil-oldallánchoz koordinálódik. Fiziológiás pH-n a Cu(II)ion a Leu(148) és a His(149)-hez tartozó

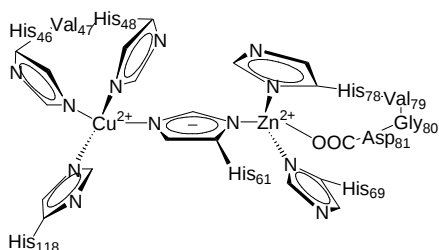
amidnitrogének deprotonálódását indukálja, ezáltal az $[N_{im}, N_{im}, N_{im}, 2N^-]$ kötésmódú komplex alakul ki, szokatlan térbeli szerkezettel.^[91,92]

Az eddigi példákban fehérjék fémmegkötőhelyét modellező peptidek vizsgálatáról volt szó. Szintén több hisztidin-oldalláncot tartalmaz a szuperoxid-diszmutáz (SOD) enzim aktív centruma. Mivel munkánk egyik része olyan többhisztidines peptidek komplexképződési folyamataival foglalkozik, amelyek SOD enzimmodelleknek is alkalmasak, ezért az ezzel a témakörrel kapcsolatos irodalmat külön tárgyaljuk a következő alfejezetben.

Ugyancsak nem tartalmaznak szabad amino-, illetve karboxilátcsoportot a ciklopeptidek. Ezen peptidek gyűrűméretének a változtatásával stabilitásnövekedést lehet elérni a rézkomplexek esetén. Az elsődleges koordinálódási helynek az imidazolil-oldalláncok bizonyultak, azonban nagyobb pH-n a peptidnitrogének (is) koordinálódnak.^[93-95]

A szuperoxid-diszmutáz enzim és aktív centrumának modellezése

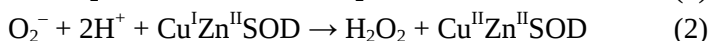
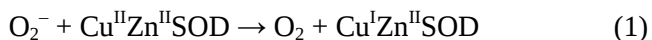
A sejtek metabolizmusa során keletkező szabad gyökök (mint a szuperoxid-gyökanion, perhidroxil- és hidroxil-gyök) nagy reakcióképességű vegyületek, melyeknek túlermelődése káros hatásokkal jár.^[96] Kirívó esetben idegrendszeri rendellenességekhez, tumorok kialakulásához, illetve más sejtkárosodás következtében fellépő betegségekhez vezet. A szuperoxid-diszmutáz (SOD), a peroxidáz és a kataláz enzim e gyökök semlegesítéséért felelős. A szuperoxid-diszmutáz enzimeknek több típusa is van: Mn-SOD (aerob sejtek), Fe-SOD^[97] (baktériumok és növények sejtjei), Cu,Zn-SOD (eukarióták sejtjei), Ni-SOD^[98] (cianobaktériumok).



13. ábra. A szuperoxid-diszmutáz enzim aktív centrumának szerkezete

A Cu,Zn-SOD enzim két egyforma alegységből épül fel, amelyeket hidrofób kölcsönhatás tart össze. Mindkét alegység tartalmaz egy aktív centrumot, amelyben egy réz(II)- és egy cink(II)ion van koordinálva (13. ábra),^[99,100] a réz négy

imidazolgyűrűhöz koordinálódik, melyekből az egyik a cinkhez is kötődik (imidazolhíd), ezenkívül a cinkhez még további két hisztidinoldallánc koordinálódik, illetve egy karboxilátcsoporthoz (aszparaginsav-oldallánc). A réz(II) körüli térbeli szerkezet négyzetes piramisos (redukció során ez torzul), míg a cink(II) körüli torzult tetraéderes. A katalitikus ciklusban csak a réznek változik az oxidációs száma (1. és 2. egyenlet), a cinknek viszont szerkezetalakító funkciót, illetve újabban a külsőszférás elektron-transzferfolyamat gyorsítását tulajdonítják.



Számos közlemény foglalkozik a Cu,Zn-SOD enzimfunkciót utánzó fémkomplexek előállításával. Ezek a modellvegyületek több csoportba is sorolhatók. Egy részük olyan komplexek csoportját alkotják, amelyekben a természetes enzimben található térbeli szerkezetet, illetve az imidazolhidat próbálják megvalósítani (ez az imidazolhíd a réztartalmú enzimek körében egyedi), azonban a koordinálódó donoratomok természete ezekben a komplexekben különbözhet az enzimben találhatóétól. Ilyenek például a makrociklusos vagy a makrobiciklusos réz(II)komplexek imidazolmolekulával a gyűrűben,^[101,102] számos réz(II)- és cink(II)iontartalmú heterodinukleáris komplex,^[103,104] ezenkívül olyan dimer szerkezetű komplexek, amelyekben nem imidazolgyűrű, hanem merev szénlánc köti össze a két fémcentrumot,^[105] illetve nitrogén-donoratomokat tartalmazó ligandumok (Schiff-bázis tulajdonságúak) réz(II)komplexei.^[106-108] Egy másik csoportba azok a modellvegyületek sorolhatók, amelyek az enzimben található peptidszekvenciát modellezzik különböző oligopeptidek által.

Az enzim aktív centrumában található réz- és cinkkötőhelyek komplexeiről már szó esett a szabad terminusú peptidek kapcsán (15. oldal). Az aminoterminus több ízben is említett erős horgonydonor jellege miatt, részt vesz a koordinációban, miközben a valós enzim aktív centrumában nincs koordinált aminocsoport. A közelmúltban ezzel a témával kapcsolatosan megjelent közlemények már védett származékok komplexkémiájával foglalkoznak.

Az egyik ilyen az Ac-HisGlyHisGly – Cu(II) rendszerrel kapcsolatos közlemény.^[109] Az aminocsoport blokkolásával a hisztidin oldallánca veszi át a horgonydonor szerepét, így a koordináció az imidazolnitrogénen indul. A [CuL] komplexben a két imidazolnitrogénhez, illetve a C-terminus karboxilátcsoporthoz kötődik a fémion, miközben egy makrokelát-szerkezet jön létre. SOD aktivitás mérésére ez a makrokelát-szerkezetű részecske lehetne potenciális alany, mivel a réz koordinációs szférájában még van szabad hely, ám fiziológiás pH-ra

koncentrációja jóformán a nullára csökken. Érdekes megemlíteni, hogy a ligandum nemvédett analógja esetén ezen a pH-n már rég telített a koordinációs szféra. Ez előrehaladást jelent a modellezés terén, mivel a védett analóg esetén valamivel nagyobb pH felé tolódott a szabad koordinációs helyeket is tartalmazó komplex képződése. SOD enzimaktivitás méréseket végeztek mindkét ligandum esetében 7,4-es pH-n. Azt találták, hogy a védett származék rézkomplexe nagyobb aktivitással bír, amit két okkal magyaráztak. Az egyik, hogy az adott pH-n uralkodó részecske stabilitása jóval kisebb a védett ligandum esetén, ami a réz(II)ion könnyebb felszabadulásához vezet. A másik, hogy a nemvédett peptid komplexében a rézhez amidnitrogének, míg a védett esetén egy karboxilátcsoporthoz is koordinálódik, ami nagyobb szabadságot ad a rézionnak. Visszatérve az Ac-HisGlyHisGly – Cu(II) rendszer komplexeihez és a megvalósuló kötőmódhoz, a pH növelésével az amidnitrogének lépcsőzetes deprotonálódása megy végbe. A $[\text{CuLH}_1]$, $[\text{CuLH}_2]$ és a $[\text{CuLH}_3]$ komplexek képződnek, az elsőben a $[2\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-]_{\text{ekv}}$, a másodikban az $\{[\text{N}_{\text{im}}, 2\text{N}^-, \text{COO}^-]_{\text{ekv}} + [\text{N}_{\text{im}}]_{\text{ax}}\}$ kötőmód, míg a harmadikban az $\{[\text{N}_{\text{im}}, 3\text{N}^-]_{\text{ekv}} + [\text{N}_{\text{im}}]_{\text{ax}}\}$ kötőmód alakul ki. A szerzők úgy vélik, hogy a His(1) imidazolnitrogénje vesz részt a síkban való koordinációban és a His(3)-mé az axiálisban.

Egy másik közlemény az enzim aktív centrumának tényleges peptidfragmenseivel foglalkozik. A kutatócsoportunkban vizsgált Ac-HisValHis-NH₂ és Ac-HisValGlyAsp-NH₂ peptidek Cu(II)-, illetve Zn(II)komplexeiről van szó.^[110] A második ligandum csak egyhisztidin-tartalmú, ezért tárgyalását az *Egy hisztidint tartalmazó, terminálisan védett peptidek fémkomplexei c.* alfejezetben is megtehetjük volna, azonban SOD modell is, ezért ebben a részben foglalkozunk vele. A rézkötőhely (Ac-HisValHis-NH₂) komplexképződése ebben az esetben is az imidazolnitrogének koordinálódásával indul, makrokelát szerkezet alakul ki, ez a természetes enzimben is megvalósuló kötőmód. Fiziológias pH-ra ebben az esetben is telített már a központi fémion koordinációs szférája: a következő részecske már a $[\text{CuLH}_2]$, ami azt jelenti, hogy az amidnitrogének kooperatív módon deprotonálódnak. Egy újabb amidnitrogén (acetamidcsoporthoz tartozó) deprotonálódása következtében az $[\text{N}_{\text{im}}, 3\text{N}^-]$ kötőmód alakul ki. Ugyanezen ligandum Zn(II)-vel történő vizsgálatából kiderült, hogy pH 5 alatt nincs ligandum-fém kölcsönhatás. E pH felett viszont csapadékképződést tapasztaltak minden vizsgált aránynál, a szerzők ligandumhidas polinukleáris komplexképződést javasolnak ($[\text{Zn}_n\text{L}_n]^{2n+}$), amelyben a két hisztidinoldallánc két különböző cink(II)ionhoz kötődik. Nagyobb pH-n sem oldódott vissza a csapadék, ami azt mutatja, hogy az amidnitrogének nem

deprotonálódnak. Az enzim cinkkötőhelyét modellező Ac-HisValGlyAsp-NH₂ – Zn(II) rendszerben savas közegben nem tapasztaltak csapadékképződést, azonban semleges, illetve enyhén lúgos oldatban a fémion hidrolizált. A [ZnL] komplexben az imidazolnitrogénen kívül az aszparaginsav karboxilátcsoportja is részt vesz a koordinációban, míg a [ZnLH₁] valószínűleg egy vegyes-hidroxokomplex, melynek képződése csapadékkiválással jár. Ez egyezésben volt a várakozásokkal, mivel amiddeprotonálódást a szabad láncvégi aminocsoporttal rendelkező analóg cinkkomplexeiben sem találtak.^[57] A védett származék esetén savas pH-n képződő [ZnL] komplexben az enzim cinkkötőhelyére is jellemző [N_{im}, COO⁻] koordinációs mód alakul ki, ám ebben az esetben is fiziológiás pH-n már más részecske képződik. A közleményben az enzim cinkkötőhelyének réz(II)komplexeit is vizsgálták. Az Ac-HisValGlyAsp-NH₂ – Cu(II) rendszerben enyhén savas oldatban képződő [CuL] komplexben az imidazolnitrogén az elsődleges fémmegkötőhely. Mindemellett az aszpartil-oldallánc β-karboxilátcsoportja is koordinálódik, ezáltal egy 17-tagú makrokelát alakul ki. pH 6 és 10 között valamennyi vizsgált fémion/ligandum aránynál csapadékképződést tapasztaltak. A makrokelát nem tudja megakadályozni a fémion hidrolízisét, és rosszul oldódó vegyes-hidroxokomplexek képződnek. A csapadékkiválást megelőzően az oldatban [N_{im}, N⁻] kötésmódú komplex, visszaoldódás után a [CuLH₃] komplex van jelen (a spektrális paraméterek alapján kétféle kötésmódot is javasolnak: [3N⁻, COO⁻] vagy [N_{im}, 2N⁻, OH⁻]). Egy újabb amidnitrogén-deprotonálódást követően négynitrogénes komplex képződik. Mint az előző közleményben, ebben is beszámolnak a peptidfragmensek SOD aktivitás méréseiről mind a védett, mind a szabad terminusú rézkötőhely esetén. Az Ac-HisValHis-NH₂ réz(II)komplexe nagyobb aktivitást mutat, mint nemvédett analógja.

Az eddigiekben leírtakból látszik, hogy a hisztidintartalmú peptidekkel kapcsolatos irodalom viszonylag terjedelmes, ám azt is láthatjuk, hogy a közlemények zöme a mindkét terminusán szabad peptidek komplexeivel foglalkozik. Az N-terminálisan védett peptidek komplexeit tárgyaló közlemények száma igencsak szerény, ezen belül is a kéthisztidines peptidekkel kapcsolatos közleményekből még kevesebb van. *A háromhisztidines védett származékok komplexképződési folyamatairól hiányosak voltak ismereteink a Ph.D. munkám kezdetekor (munkánkkal párhuzamosan jelentek meg a fent említett háromhisztidintartalmú ligandumok vizsgálatainak eredményei). Ezért munkánk egyik célja a hisztidin horgony szerepének a vizsgálata volt, blokkolt N-terminusú többhisztidines peptidek réz(II)komplexeiben. A SOD enzim aktív centrumának rézkötőhelyében három hisztidinoldallánc kerül közel egymáshoz térben (az imidazolhídon kívül),*

ezért a vizsgált háromhisztidines peptidek az enzim aktív centrumának a modellezésére is alkalmasak lehetnek. Ezen kívül két hisztidint tartalmazó peptidek vizsgálatára is sor került, melyeket összehasonlításképpen vizsgáltunk, mivel ezek a ligandumok glicintartalmúak a korábban vizsgált valintartalmúhoz képest.

A jelen fejezet védett hisztidintartalmú peptidek fémkomplexeivel foglalkozott. Több olyan közlemény is van, amely ennek a kritériumnak megfelel, ám ezeket a prion protein peptidfragmensei kapcsán közölték le. Mivel a jelen dolgozat nagy része a prion protein peptidfragmenseinek a különböző fémekkel alkotott komplexeivel foglalkozik, ezért az ezzel a témakörrel kapcsolatos irodalom áttekintését külön fejezetben tárgyaljuk.

2.4. A prion protein

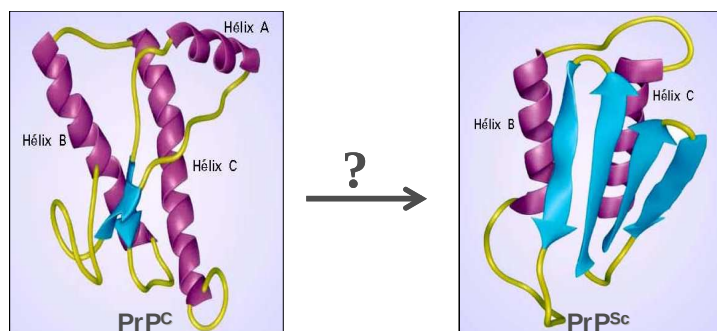
2.4.1. Általános és szerkezeti jellemzés

Általános jellemzés

A prion protein egy sejtfelületi glikoprotein, amely minden emlőssejtben megtalálható, de különösen az idegsejtek (ezen belül is az agykéreg hippokampusz területén) és az immunrendszer sejtjei felületén létezik. A közelmúltban nagy érdeklődés övezte és napjainkban is övezi ezt a fehérjét a nagy nyilvánosságot kapott fertőző szivacsos agyvelősrövidítés kapcsán.

Az 1997. évi élettani és orvosi Nobel-díjat Stanley B. Prusiner, a San Francisco-i Kaliforniai Egyetem professzora kapta a fertőző szivacsos agyvelősrövidítéssel – vagy ismertebb nevén prionbetegséggel – kapcsolatos kutatásaiért és alapvető felismeréseiért. Elmélete középpontjában az a meghökkentő és sokáig kétkedéssel fogadott feltételezés áll, hogy e halálos kimenetelű betegség hátterében nem kórokozót, hanem egy megváltozott térbeli szerkezetű fehérjét (prionfehérjét) kell keresnünk.^[111] Tudvalévő, hogy a fehérjék funkcióját túlnyomórészt a térbeli szerkezetük határozza meg. A fentiekből kiderült, hogy a prion protein mindannyiunk szervezetében megtalálható, és általában semmiféle bajt nem okoz, ám térbeli szerkezetének megváltozása idegrendszert károsító (neurodegeneratív) betegségek kialakulásához vezet. A megváltozott konformációjú prion protein a szervezetben képes sokszorozódni, ez az egyetlen olyan példa fertőző ágensre, amely DNS, ill. RNS híján is képes ön maga sokszorozására (ellentétben a megszokott kórokozókkal: baktériumok, vírusok, gombák, amelyek örökítő információt hordoznak). A kutatók

meghökkenését tükrözi a fehérje elnevezése: **prion** (**protein only**, ami annyit jelent: csak fehérje, amely mégis fertőző betegséget okoz). Az irodalomban a normál térbeli szerkezettel rendelkező fehérjét PrP^{C} (prion protein cellular), míg a kóros konformációját PrP^{Sc} -vel (prion protein scrapie) jelölik. Tehát a két fehérje csak térbeli szerkezetében tér el egymástól (14. ábra), polipeptidláncuk azonos marad.^[112] Ez a lánc 253 aminosavból áll, a PrP^{C} α -hélixben gazdag szerkezet, oldható, proteázok bontják, míg a PrP^{Sc} β -redőben gazdag, oldhatatlan fehérje, hővel szemben ellenálló, proteázok nem bontják. Ez utóbbi okozza az elhalt idegsejtek felhalmozódását a prion betegségek során. Az idegsejt életének a végén a fehérjék a sejtbe kerülnek vissza, hogy a fehérjebontó enzimek, nevezetesen a proteázok, lebontsák azokat, ám a megváltozott konformáció miatt ezen prionfehérjék proteázrezisztensek, így felhalmozódnak az idegsejtekben, illetve a sejtközi térben, ezek az aggregátumok képzik az úgynevezett amiloid plakkokat. Azt feltételezik, a proteinaggregáció áll a kór hátterében, mivel normális esetben ez nem fordul elő (különbféle mechanizmusok léteznek az aggregáció gátlására).^[113] Másrészt egyre többen vélik úgy, hogy az oxidatív stressz az oka az idegkárosodásnak, erről bővebben a PrP funkciója kapcsán lesz szó.^[114,115]



14. ábra. A normál (PrP^{C}) és kóros (PrP^{Sc}) konformációjú prion protein

A kóros forma a szervezetbe kerülve templát hatással rákényszeríti a normál konformációjú fehérjére saját térbeli szerkezetét,^[116] így két negatív tényezőt hordoz: (i) önmagában is káros, mivel proteázrezisztens, (ii) "fertőzi" a normál prion proteineket. Úgy vélik, több kóros konformáció is létezik, amelyek mindegyike egy-egy neurodegeneratív betegség kialakulásáért felelős. Ezek a prion betegségek csoportját alkotják. Ezek közül a legismertebbek a szarvasmarhákát sújtó szivacsos agyvelősorvadás, más néven kergemarhakór (bovine spongiform encephalopathy (BSE), ill. mad cow disease), a juhokat érintő surlókór (scrapie, innét a kóros konformációt jelölő Sc index) és az emberre veszélyes Creutzfeldt–

Jakob-betegség (Creutzfeldt-Jakob disease (CJD)). Az utóbbinak több fajtája van: örökletes, fertőző és a szórványosan előforduló sporadikus fajta. Az elsőt a PrP^C génjének a mutációjáról, a második esetben a patológiás szerkezetű prionfehérje egészséges szervezetbe történő véletlen bejutásáról (rosszul sterilizált mélyelektrodok, elhalálozott fertőzött hipofízisből kivont gonadotropin és humán növekedési hormon beadása, stb.), míg a sporadikus formánál a PrP^C → PrP^{Sc} spontán átalakulásáról, esetleg szomatikus mutációról van szó. Mindezek kevésbé voltak ismertek, míg meg nem jelent a Creutzfeldt-Jakob-betegség új változata, a variáns Creutzfeldt-Jakob-betegség (variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD)).^[117] Az új kór azáltal vonta magára sokak figyelmét, hogy felmerült a lehetősége annak, hogy szarvasmarhák prionfehérjei az emberbe kerülve kiváltják ezt a kórt. Azt feltételezik, hogy a juhok körében főként Angliában pusztító surlókór terjedhetett át a marhákra. Ez úgy történhetett, hogy mind a juhok, mind a marhák ugyanazon takarmányliszttel voltak etetve (elhalt társaik maradványaiból készült, főleg hús és csontliszt). A PrP^{Sc} hőellenálló-képességének köszönhetően túlélte a lisztkészítési folyamatot, és a táplálékba kerülve járványt okozott. Szintén fertőzött marhák húsának fogyasztása okozhatta az emberben az új prionbetegséget. A hosszú lappangási idő az oka, hogy az állat külső jelek alapján nem látszik betegnek, így eshetett meg a fertőzött marhahús emberek általi fogyasztása. 2002 októberéig a világon összesen 138 vCJD esetet regisztráltak, az esetek többségét (128) Nagy-Britanniából, ahol az 1980-as évek elejétől a szarvasmarhák között BSE-járvány pusztított. 2005 decemberében már 183 esetet regisztráltak világszerte.^[118] Az egyik jellemző tünet a betegek agyában lerakódott amiloid plakkok, melyeknek formája eltér a többi CJD esetén tapasztaltaktól.

Azt, hogy pontosan hogyan is történik az átalakulás a 14. ábrán látható baloldali szerkezetből a jobboldali szerkezetbe, és melyek a kiváltó okok, még mindig csak találgatják. A kutatók egy csoportja úgy véli, fémionokkal való kölcsönhatás eredménye a konformációváltás, mások autokatalitikus átalakulásról beszélnek. Érdeemes viszont megemlíteni, hogy mindmáig pontosan nem tisztázott a PrP^C eredeti funkciója, ám abban mindenki egyetért, hogy ennek tisztázása közelebb vihetne minket számos kérdés megválaszolásához. Több elmélet is létezik az egészséges szervezetben betöltő funkcióját illetően. Az ehhez a témakörhöz kapcsolódó irodalom nagyon szerteágazó, és egyáltalán nem ritka, hogy ellentmondásos adatokat találunk.

Feltételezett funkciók

A közlemények egy csoportja a PrP memóriafolyamatokban (még hozzá a hosszútávú memóriában) való részvételét valószínűsíti. A kiindulópont a fehérje elhelyezkedése volt (a szinaptikus membrán felülete), ebből adódóan ingerület-átalakító funkciót társítottak hozzá, ám az inger természete és funkciója bizonytalan.^[119] Egyes vélemények szerint a PrP-nek az a tulajdonsága, hogy a réz és a reaktív gyökök redoxaktivitását megváltoztatni képes, lehetővé teszi redox szenzorként való működését. Azaz a proteinen keresztül kapcsolatba hozzák a rézkoncentrációt az idegsejtek kalcium általi ingerület-átvitelével, azonban a mechanizmus tisztázatlan maradt.^[120]

Egy újabb tulajdonsága a PrP-nek, hogy képes több más proteinhez hozzákapcsolódni, "tapadni", ezt az adhéziós tulajdonságot a laminin receptor esetében tanulmányozták, ám itt is felmerülnek megválaszolatlan kérdések.^[119]

Más kutatócsoportok a prion protein rézhez való nagy affinitása miatt, ami mára eléggé megalapozott (az ezzel a témával foglalkozó közlemények száma 150 fölé tehető), a PrP-ről mint rézszállító, illetve réztároló enzimről beszélnek. Ebben az esetben azt feltételezik, hogy az extracelluláris (sejtközi) térben a PrP megkötö a fölös rezet, és endocitózis során bejuttatja azt a sejtbe.^[119-122] Viszont érdemes megemlíteni, hogy erre a feladatra más enzimek is szakosodtak, ami azt sejteti, hogy nem ez a PrP fő, illetve egyetlen feladata. Az újabb feltevések azt mutatják, hogy a PrP közreműködésével végbemenő rézszállítás nagyobb mértékben nem is a neuronokban, hanem az asztrocitákban zajlik, amelyeknek nagyobb a tárolási kapacitásuk is.^[119] Ennek kapcsán létezik egy olyan elmélet is, amely szerint a PrP a Cu,Zn-SOD enzim számára tárolja a rezet.^[123]

Szintén rézion kötődését feltételezi az az elmélet, amelyben a PrP normál funkciója: szinaptikus SOD enzim. Azt találták, hogy a PrP, amelyben kötött réz van, SOD aktivitást mutat (antioxidáns),^[119,124] azaz katalizálja a szuperoxidgyök átalakulását. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy szerepe van az oxidatív stressz elleni védekezésben. Az oxidatív stressz fogalmát úgy határozták meg, mint azon biokémiai egyensúlyi folyamatok felborulása, amelyek reaktív oxigéntartalmú gyökök képződéséhez vezetnek, azaz a sejt antioxidatív védekező rendszerének a sérülése, melynek következménye, hogy a reaktív gyökök károsítják a sejtet. Érdemes megemlíteni, hogy a PrP^{Sc} konformációjú protein elveszíti SOD aktivitását. A fentiekben arról volt szó, hogy a PrP az oxidatív stressz elleni védekezésben vesz részt. Érdemes megemlíteni ebben a viszonylatban, hogy igen sok közlemény foglalkozik a neurodegeneratív betegségek (ide tartozik a prion betegség is) és az oxidatív stressz kapcsolatával, melyekben azt feltételezik, hogy a

fémion (kóros) kötődése a megfelelő proteinhez fémionkatalizált oxidációt okoz.^[125] Egyes feltevések szerint ez magát a proteint károsítja, melynek következménye annak aggregálódása (plakkok képződése).^[126] Mások az oxidatív stressz okozta károkról beszélnek: a proteinhez koordinált fémion a Fenton reakcióban vesz részt (3. egyenlet),



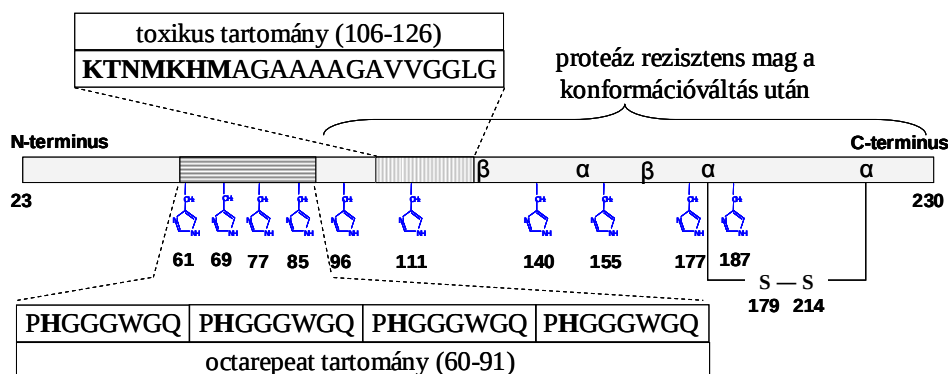
melynek végterméke a nagy reaktivitású hidroxilgyök. Ez olyan károkat okoz a sejtben, hogy annak metabolizmusa végül összeomlik, az idegsejt elpusztul.^[127] Az idegrendszeri megbetegedések és a fémionok kapcsolatát alátámasztandó, a szövetek réz/cink aránya kimagaslóan nagy volt neurodegeneráció esetén, illetve az idős kor előrehaladtával.^[128] Prion betegséggel fertőzött egerek agyából kivont prion proteinből kimutatták, hogy csökkent a benne kötött réz mennyisége, és ennek megfelelően csökkent az antioxidáns aktivitás (30-60 nappal a fertőzés után). Ezzel ellentmondásos az az eredmény, hogy rézkelátorral (penicillamin) való kezelés során az egerek prionbetegségének inkubációs ideje meghosszabbodott.^[129] Ellentétben a fenti kísérlettel hörcsögöket rézzel kezeltek, még mielőtt beoltották volna azokat a betegséggel, és azt találták, hogy sokkal ellenállóbbak lettek a betegséggel szemben. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy egyes esetekben a réz kötődése normál módon zajlik (ez a konformáció ellenállóbbá teszi a fehérjét), míg máskor a rendellenes kötődés megy végbe, ilyenkor a réz redoxpotenciálja meggyorsítja az aggregációt.^[119] Egyes szerzők úgy értelmezik a PrP és azok peptidfragmenseinek a Cu(II)-vel való kölcsönhatását, hogy az N-terminális rendezetlen részhez való kötődése védő hatású, és toxikus a C-terminális tartományhoz való kapcsolódás esetén.^[130]

Nemrégiben egy újabb feltételezést írtak le, miszerint a PrP a sejthalál elleni védekezésben vesz részt, noha ebben az esetben is, mint sok másokban, a mechanizmus vitatott. A szerzők azt javasolják, hogy a Cu(II) kötődése a PrP N-terminális részéhez egyfajta jeltovábbítás a PI 3-kináz számára, amely a sejt túlélésében játszik kulcsfontosságú szerepet. Ezt arra alapozzák, hogy az egerek idegsejtjeivel végzett kísérletekből kiderül: a PrP és a PI 3-kináz szint összefügg.^[131]

A HuPrP szerkezete és tartományai

A PrP szerkezete a 14. ábra (24. old.) baloldali felén látható. A protein térbeli szerkezetét tekintve két részre osztják azt. A globuláris C-terminális rész a 125-ös aminosavtól a 228-ig terjedő tartományt foglalja magába, míg az N-terminális részt

rendezetlen szerkezetű, flexibilis farokrészként említik az irodalomban, kb. 100 aminosavat takar. A PrP^C három α -hélixet (144-154, 173-194, 200-228) és két β -redőt (128-131, 161-164) tartalmaz, az utóbbi két hélixet diszulfidhíd köti össze (15. ábra). Az aminosav-szekvenciát tekintve szintén megkülönböztetnek néhány tartományt. Az egyik ilyen az úgy nevezett octarepeat tartomány (60-91), amely négyszer ismétlődő oktapeptidből áll: (PHGGGWGQ)₄.^[119] Egy másik tartománya a proteinnek a toxikus avagy neurotoxikus tartomány: 106-126 (KTNMKHMAAGAAAGAVVGGLG) (15. ábra). Neve onnan ered, hogy e tartománynak hasonló toxicitása van, mint a PrP^{Sc}-nek, megöli az idegsejteket. Ez a tartomány a PrP-nek azon része, amelyet a proteázok lehasítanak normál sejtműködés folyamán, ám a PrP^C $\rightarrow$ PrP^{Sc} átalakulás után proteázrezisztensé válik. A neurotoxikus tartomány két részre osztható. Az egyik a fémmegkötőhely (106-112, vagy legalább 109-112), a másik egy hidrofób rész (113-126), amely szükséges, ám nem elégséges feltétele a neurotoxicitásnak, illetve a szálak szerkezet kialakulásának. Ezt a tartományt azért is nevezik toxikusnak, mert abban az esetben, ha az aggregáció itt megindul, a szerkezetátalakulás a C-terminus irányába végighalad a proteinben,^[130] így a proteázrezisztens tartomány jóval nagyobb lesz (90-231), ilyenkor β -redőben gazdag struktúra képződik, melyet a proteázok nem ismernek fel (15. ábra).



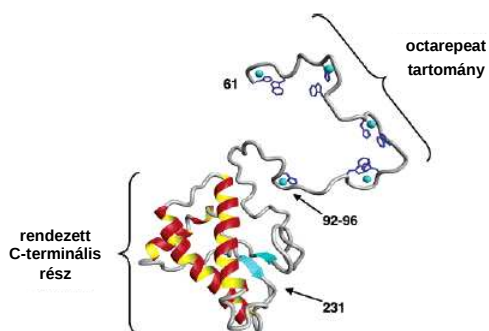
15. ábra. Az emberi prion protein felépítése és tartományai

Ugyanezen ábra szemlélteti, hogy a PrP-ben a tíz hisztidin imidazolil-oldalláncai potenciális horgonydonorok lehetnek a fémionok számára, ám a protein szerkezete következtében a fémmegkötő-képességgel kapcsolatos kép jóval árnyaltabb. A következő alfejezetben a PrP és tartományainak a fémmegkötő-képességéről lesz szó.

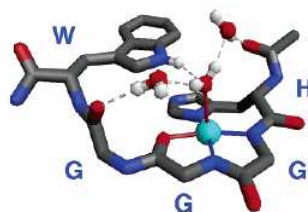
2.4.2. A prion protein tartományainak fémionkomplexei

Réz(II)ion – prion kölcsönhatás

Az első mérések, melyek a PrP fémhez való affinitását vizsgálták, a protein peptidfragmenseire irányultak, ezen belül is az octarepeat tartományra. Mára a többi tartományt is széleskörűen vizsgálják, sőt a rossz oldhatóság ellenére a teljes PrP rézmegkötő-képességéről is jelennek meg közlemények. A teljes protein rézmegkötő-képessége kapcsán az elvégzett vizsgálatok azt mutatják, hogy a protein legalább öt ekvivalensnyi réziont képes megkötni. Mára talán mindenki által elfogadott, hogy ezekből négyet az octarepeat tartomány köt (16. ábra), ellenben az ötödik rézion koordinációjának helyét illetően nagy az ellentmondás. Egy hatodik rézion koordinációjáról is beszámolnak, ám egyesek szerint ez csak nagy rézionfelesleg mellett valósul meg,^[132] mások szerint csak abban az esetben alakul ki a hatodik koordinációs hely, ha az octarepeat tartományt eltávolítják.^[133] E kísérletek zömében a protein fémmegkötését in vitro vizsgálták. In vivo kísérlet eredménye az az adat, amely számszerűsíti a PrP^C-hez kötött rézionokat: az egéragyból kivont mintában egy protein molekula átlagban három darab réziont köt meg.^[133]



16. ábra. Az octarepeat tartomány fémmegkötése (négy rézion), illetve az ötödik réz kötődését feltételező több modell egyike



17. ábra. A Cu(II) – HGGGW rendszerben fiziológiás pH-n képződő komplex egykristályának szerkezete

Az octarepeat tartománnyal kapcsolatos közlemények igen nagy számban jelentek meg, mivel a kezdetben megjelenő közlemények adatai nem voltak egységesek. Kezdetben az imidazolgyűrű hídként való koordinációját feltételezték,^[134] később axiális koordinációt tulajdonítottak neki az amidnitrogének síkban való koordinációja mellett.^[135] A részletes NMR,^[136] illetve röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálati eredmények^[137] eloszlatták az

ellentmondásokat. Az octarepeat monomer réz(II)komplexében [N_{im} , $2N^-$, $O_{karbonil}$] kötés mód valósul meg fiziológias pH-n (17. ábra). Mind az egykristály eredmények, mind az oldatban történő vizsgálatok eredményei alátámasztják az axiálisan koordinált vízmolekula és a triptofán oldalláncbeli indolcsoport közötti hidrogénkötést. Lúgosabb pH-n a karboniloxigén helyére egy újabb deprotonálódott amidnitrogén koordinálódik. A HGGG fémkötőhelyben egy szokatlan szerkezetű (7,5,5)-tagú csatolt kelát képződik (12.a. ábra, 18. old.), amely kisebb stabilitású, mint azt általában a réz-peptidkomplexeknél (hisztidintartalmú peptidekkel) megszoktuk. A kisebb stabilitású 7-tagú kelátgyűrű képződésének oka abban keresendő, hogy a PHGGGWGQ sorban a hisztidin előtti prolin (amidnitrogénjének nincs disszociálható hidrogénje) meggátolja azt, hogy a lépcsőzetes amiddeprotonálódás a megszokott aminoterminus irányába induljon meg, így az a másik irányba indul, és ez héttagú kelátgyűrűt eredményez (12.a. ábra, 18. old.). További vizsgálatok azt mutatták, hogy kooperatív hatás következtében a négy egymás melletti octarepeat egység jóval nagyobb affinitással rendelkezik a rézionok felé, mint a négy egység egyenként. Nevezetesen, az első rézion koordinálódásában három vagy négy imidazolgyűrű vesz részt,^[138] és az első réz kötődése megkönnyíti a többi rézion koordinálódását. A koncentrációeloszlásokból kiderül, hogy a réz octarepeat-hez való kötődése nagy mértékben pH-függő: a pH 7,5-ről 6,5-re történő változása az említett komplex koncentrációját 50%-kal csökkenti le. Ez adott alapot annak a feltevésnek, mely szerint a PrP az endocitózis során szállítja a rezet a sejtközi térből a sejt belsejébe, mivel ezek pH-i jelentősen különböznek.^[137] Abban az esetben, ha nem jut mindegyik octarepeat monomerre egy-egy rézion, egyéb koordinációs módokat is leírtak.^[139] A feltűnően sok glicinnek is fontos szerepe van, egyrészt nagyfokú rugalmasságot biztosít az N-terminális végnek, másrészt finoman hangolja azt a tulajdonságát a peptidnek, hogy a réz kötődése a pH függvénye legyen. Ezt az eredményt úgy kapták, hogy a három glicin aminosavat alaninokra vagy lizinekre cserélték, és azt találták, hogy sem a koordinációs mód, sem a sztöchiometria, sem a térbeli szerkezet nem változik, ám a képződő komplex stabilitása igen.^[140]

Nagy érdeklődés övezi a csirke prion proteinjének a kutatásait, hiszen azt találták, hogy a házi szárnyasok ellenállóak a surlókór prionjaival szemben. Az ember octarepeat tartományától különbözik a csirkéé, ugyanis az utóbbinál az ismétlődő rész egy hexapeptid: HisAsnProGlyTyrPro (ChPrP(53-58): HNPGYP; ChPrP(54-59): PHNPGY). Ebben az esetben még nagyobb hatása van a prolin egységeknek, hisz nem csak a koordináció irányát változtatják meg (a C-terminus irányába halad), hanem a szénterminális irányban lévő második prolin kizárja a két

egymást követő amidnitrogén deprotonálódásának lehetőségét. Így a monomer egység rézkomplexében [N_{im} , N^- , $O^-_{fenoláttoxigén}$] kötémódot találtak, viszont a monomer egységek számától és a fém/ligandum aránytól függően további kötémódokat is leírtak.^[141-143] A csirke hexarepeat-ben is megfigyelték a kooperatív hatást, ám az állandók összehasonlításából kiderült, hogy a humán octarepeat effektívebb rézmegkötő, mint a csirke hexarepeat. *A csirke prion proteinjének az irodalma javarészt a hexarepeat tartománnyal foglalkozik, más tartományairól csak elvétve találunk adatokat, és mivel az általunk vizsgált humán prion-tetrapeptid (HuPrP neurotoxikus tartományának a fémmegkötőrésze) és a csirke-prionban megtalálható megfelelő szekvencia eltér, ezért érdekes volt összevetni a fémmegkötő-képességüket.*

Az octarepeat-en kívüli tartomány mindinkább nagyobb hangsúlyt kap, hiszen ez a rész válik proteázrezisztensé (15. ábra, 28. old.), sőt a közlemények egy része felveti annak a lehetőségét, hogy a réz koordinálódása eredményeként fellépő konformációváltozás, amely β -redőszerű struktúrát eredményez, beindítja az amiloidogenezist.^[144,145] Míg egyes szerzők az octarepeat részt követő His(96) kiemelt szerepéről számolnak be^[132] (16. ábra, 29. old.), addig mások a His(111) fémmegkötő-képességét vizsgálták a toxikus tartomány kapcsán.^[145-148] Az utóbbi esetében a közlemények egy része szabad aminoterminusú ligandumokkal modellezi a fémmegkötőhelyet, ami nem igazán jó modell az aminocsoport erős horgony szerepe miatt. A védett származékok rézkomplexeiben fiziológias pH-ra általában imidazolnitrogén, illetve két deprotonálódott amidnitrogén koordinációjáról számolnak be, míg a szabad aminoterminusú modellek komplexeiben amino-, amid-, amid-, imidazolnitrogén kötődési mód jelenik meg. Az adott tartományban két metionin is van, melyek oldallánci koordinálódását szintén vita övezi. *Az általunk vizsgált tetrapeptidekkel ezt az ellenmondást is szerettük volna eloszlatni (részletesebb leírás az 58. oldalon).* Egy másik vizsgálat szerint a PrPHis(96)Ala (a 96. pozícióban lévő hisztidint alaninra cserélik) esetében nincs eltérés az eredeti protein fémmegkötő-képességétől, azonban a PrPHis(111)Ala vizsgálata azt mutatta, hogy a mutáns PrP elveszíti az ötödik rézkoordinálódási helyét, hasonlóan ahhoz, amikor mind a His(96)Ala, mind a His(111)Ala cserét egyidejűleg valósítják meg. Ezek az eredmények a His(111) preferenciájára utalnak.^[133] Viszont olyan közleményt is találunk, amelyben mindkét hisztidinoldallánc egyidejű koordinációját valószínűsítik egyetlen rézionhoz.^[144] A legújabb eredmények szerint a His(96) és a His(111) egymástól függetlenül kötik a rezt, ám pH-tól és fém/ligandum aránytól függően ez megváltozhat, kis pH-n és rézion-koncentrációnál a két hisztidinoldallánc egyetlen

rézionhoz való koordinációjáról írnak.^[149] A közlemények egy csoportja azt állítja, hogy az octarepeat tartomány nagyobb affinitással rendelkezik a rézionok felé,^[133] mint az azon kívülesők, ám találunk olyan eredményt is, amely kompetíciós módszerrel támasztja alá az ellenkezőjét. Az eljárás során azt mutatták be, hogy a PrP(91-115) képes a négyszer ismétlődő oktapeptidtől elvonni a rézet.^[144] Ezen tartományok vizsgálataihoz tartozik, noha nem rézkoordinációval függ össze, hogy a neurotoxikus tartomány β -redős szerkezete következtében liposzómafúziót idéz elő, amely sejtmembrán-destabilizáló hatású, és ez kapcsolatba hozható a neurotoxicitással.^[150] Szintén octarepeat-en kívüli a His(187)-est körülvevő tartomány. A PrP(178-193) esetében rézionindukált lipidperoxidációt, illetve citotoxicitást mutattak ki az idegsejtekkel szemben, valamint az analóg PrP(180-193) tartomány bizonyíthatóan amilodszerű szerkezetet képez. Visszatérve az ötödik rézion koordinálódási helyét kutató irodalomhoz és az ellentmondásosságot tovább fokozva, a fent említett közlemények gyakorlatilag kizárták a His(187) szerepét, ám újabban egyre több közlemény jelenik meg az említett tartomány rézkomplexeinek vizsgálati eredményeivel,^[151,152] és a termodinamikai adatok azt mutatják, hogy ezek a modellek erősebben kötik a rézet, mint a toxikus peptid, vagy az octarepeat monomer. A réz(II)ion körüli koordinációs mód pH 6-7,5 körül hasonlóan a többihez [N_{im} , $2N^-$].

Egyéb fémionok – prion kölcsönhatás

Noha egyre nagyobb figyelmet kapnak az egyéb fémek a prion kóros konformációjának kialakulásával kapcsolatban, érdemes leszögezni, hogy a fémek által kiváltott konformációváltozások egyik esetben sem voltak azonosak a PrP^{Sc} szerkezetével, és ez a rézre is érvényes. Azaz a PrP^C fémionindukált biokémiai elváltozásai olyan struktúrák létrejöttét okozzák, melyek közvetlenül nem eredményezik a PrP^{Sc} kialakulását, hanem mint kofaktorok segíthetik elő annak kialakulását. A PrP^{Sc} kialakulásának molekuláris mechanizmusa mindmáig nincs tisztázva.^[153]

Sok esetben vizsgálták a protein kölcsönhatását több fémionnal is (a legtöbbjükben a réz is beletartozott a fémionok körébe), újra és újra alátámasztva azt a megállapítást, miszerint a prion protein a legnagyobb affinitással a rézion felé rendelkezik.^[154] Ezen túlmenően a Mn(II), a Zn(II) és a Ni(II)ionoknál mutattak ki kapcsolatot a proteinnel, noha a fémionok köre bővebb volt, Fe(II), Co(II), Ca(II), Mg(II)-t is magába foglalva. A nikkelnél azt találták, hogy nem kötődik az octarepeat tartományhoz, viszont jól modellezi a rézion kötődését a His(96) és a

His(111) régióihoz.^[155] A mangán és a cink esetében jóval gyengébb kölcsönhatásról számolnak be, és az utóbbi kötődése bizonyult a leggyengébbnek. A prionbetegséggel fertőzött agyszövetek fémkoncentrációja megváltozik: a Cu(II)ioné csökken, míg a Mn(II)- és a Zn(II)ioné nő (a cink esetében kisebb mértékben). Ez a tendencia mutatkozott a prion protein fémionbetöltöttsége kapcsán is. A PrP^{Sc} izoforma elveszítette a kötött rezet, viszont mangán- és cinkionokat találtak helyette.^[156,157] Ezzel összhangban van az, hogy drasztikusan lecsökken az antioxidáns aktivitása, hisz ezt a réz kötődésével hozták összefüggésbe. Egyrésről ez a csökkent antioxidációs képesség, másrésről az oxidatív stressz, (hasnolán a réznél leírtakhoz) a kóros forma megjelenéséhez vezethet.^[157,158] A mangánnal kapcsolatban a közlemények arról számolnak be, hogy kötődése olyan szerkezetet hoz létre, amely proteínáz K rezisztens,^[157,159] szálas szerkezetű,^[160] és aggregálódik.^[157,161,162] Ez az aggregáció reverzibilis, mivel EDTA segítségével visszafordítható, és úgy tűnik, intermolekuláris szinten zajlik a kapcsolódás, azaz nincs köze a réz által kedvelt hisztidin-környéki koordinációhoz. Viszont érdekesség, hogy ezt az aggregálódási folyamatot a réz meggátolhatja^[162] vagy inhibálhatja.^[161] Ellenben egy másik közlemény beszámol a Mn(II)ion és a neurotoxikus tartomány intramolekuláris kölcsönhatásáról, melyben azt feltételezik, hogy a mangán karbonil- és karboxiloxigénekén keresztül koordinálódik a ligandumhoz, illetve egy vízmolekula közvetítésével hidrogénkötéssel kapcsolódik a His(111) oldalláncához.^[163] A fent felsorolt fémionok közül csak a mangán volt képes helyettesíteni a rezet a proteínben.^[162] A fémionindukált proteázrezisztens molekula ellenállóképessége a proteázokkal szemben nem jelenti annak infektivitását is egyben, és ez ugyanúgy vonatkozik a rézre is.^[153]

A már említett fémionoktól külön említem a palládiumot. A Pd(II) – octarepeat monomer rendszer koordinációját vizsgálták a Cu(II)koordinációjának összehasonlítása miatt. Azt találták, hogy az különbözik a réz(II)ionétól. A kötőmód a következő volt: [N_{im}, 2N⁻, H₂O], nem találtak triptofán koordinációjára utaló jelet. Azt is megállapították, hogy a Pd(II) nem használható a réz koordinációjának feltérképezésére.^[164]

2.5. Célkitűzések

Az irodalmi részt áttekintve mind a többhisztidin-tartalmú peptidek, mind a prion peptidfragmenseinek a komplexképződési folyamataival kapcsolatban ellentmondásos adatokkal találkozunk, illetve azok hiányosságával is. Ennek megfelelően megfogalmazhatók célkitűzéseink, melyek két részre bonthatók.

1. Egyrészt célul tűztük ki a hisztidinoldallánc szerepének pontos megismerését terminálisan védett peptidekben. E témakörben az egyhisztidin-tartalmú peptidek jól tanulmányozottak, ám a több hisztidint tartalmazó peptidek esetén munkánk kezdetekor ismereteink hiányosak voltak. Vizsgálatainkhoz az N-terminálisan védett három hisztidint tartalmazó Ac-HisHisGlyHis-OH és Ac-HisHisGlyHis-NHMe ligandumot, illetve összehasonlításuképpen a kéthisztidin-tartalmú Ac-HisGlyHis-OH és az Ac-HisGlyHis-NHMe ligandumot választottuk. E peptidek réz(II)ionnal alkotott komplexeit tanulmányoztuk. A SOD enzim aktív centrumának rézkötőhelyében (az imidazolhídon kívül) három hisztidinoldallánc kerül közel egymáshoz térben, ezért a vizsgált háromhisztidines peptidek az enzim aktív centrumának a modellezésére is alkalmasak lehetnek.

2. Másrészt az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a prion protein octarepeat tartománya széleskörűen tanulmányozott, míg az azon kívül eső tartományok vizsgálati eredményei hiányosak, illetve a meglévő eredmények ellentmondásosak. Ezért célul tűztük ki az oktarepeat-en kívüli hisztidinek (His(96), és His(111)) fémmegkötő-képességének a vizsgálatát. Ehhez az egyes hisztidinek körüli aminosav-szekvenciát utánzó tetrapeptid modelleket, illetve mindkét hisztidint tartalmazó peptidet használtuk ligandumként, ezenkívül a His(85)-t is tartalmazó 31-tagú nagymodell és annak mutáns (His helyett Ala) változatainak vizsgálatára is sor került. A fémionok körét tekintve:

a) A réz(II)ionnal való kölcsönhatásnál az irodalmi adatok ellentmondásainak kiszűrését, és az egyéb donorcsoportok (Met és Lys) hatásának pontosítását szerettük volna megvalósítani.

b) Az egyéb fémionok körében olyan fémionokat választottunk, melyek:

- létfontosságúak, és valóban jelen lehetnek az agyban is: Zn(II), Mn(II),
- potenciális vizsgálati modellek a Cu(II) és a Zn(II) prionhoz való kötődésének az értelmezéséhez: Ni(II), Co(II),
- toxikusak: Cd(II), Pd(II), ez utóbbi esetében mindemellett nagy a peptidekhez való affinitása is.

3. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

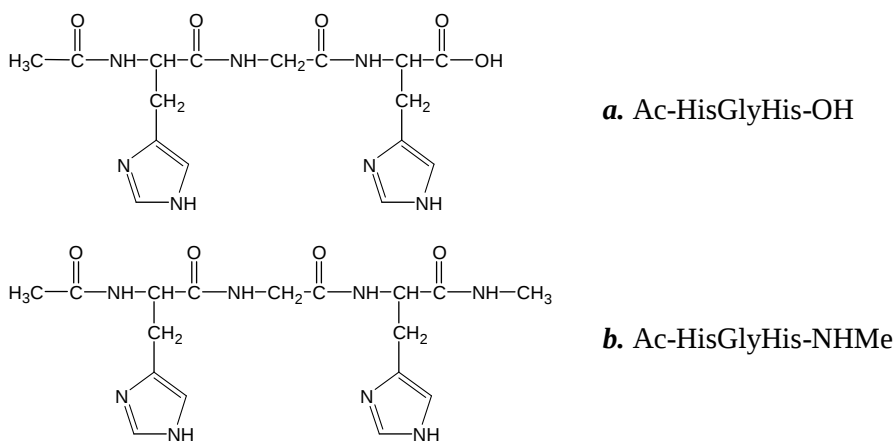
3.1. A vizsgálatok során alkalmazott vegyszerek

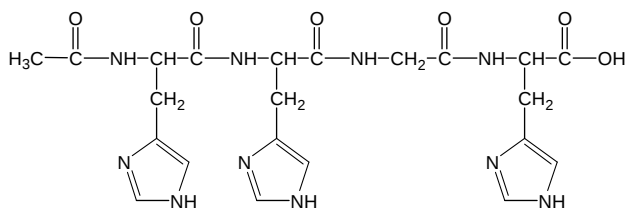
A fémtörzsoldatok a.l.t. minőségű $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (Reanal) vegyszerekből kétszer desztillált vízben, valamint a ZnO ismert mennyiségű sósavban, a $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ salétromsavban való feloldással készül. A savakra a fémionok hidrolízisének visszaszorítása miatt volt szükség. A fémtörzsoldatok pontos koncentrációjának meghatározása gravimetriásan történt kinolin-8-oláttal, oxinát formájában. A palládium esetében a vegyszer tisztasága atomabszorpciós spektroszkópia segítségével volt ellenőrizve. A kálium-hidrogén-ftalátot és a káliumhidroxidot szintén a Reanal cégtől, a tömény salétromsav, illetve sósav oldatokat a Spektrum 3D Kft-től szereztük be.

A ligandumok egy részét (Ac-His-NHMe, Ac-HGH-NHMe, Ac-HGH-OH, Ac-HHGH-NHMe, Ac-HHGH-OH, Ac-Ha, Z-HisGly-OH, 1-metil-1H-imidazol, 4-metil-1H-imidazol) a Bachem, illetve a Sigma-Aldrich finomvegyszer forgalmazóktól vásároltuk, másik részüket az olaszországi Cataniai egyetemen szintetizálták. Az utóbbiaknál a szilárd fázisú peptidszintézis módszerét alkalmazták, ehhez Pioneer TM peptidszintetizáló berendezést használtak. A tisztítást preparatív fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) oldották meg.

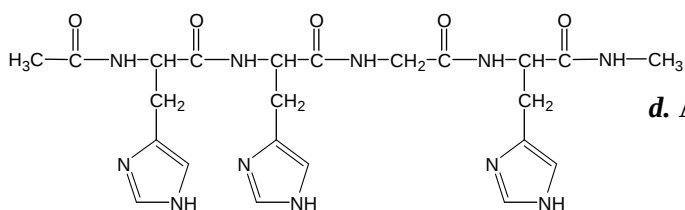
A munkánk során vizsgált ligandumok szerkezeti képletei a 18. ábrán vannak feltüntetve.

18. ábra. A vizsgált ligandumok szerkezeti képletei:

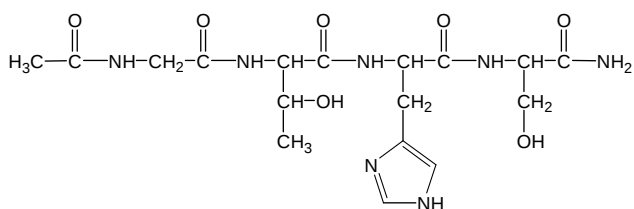




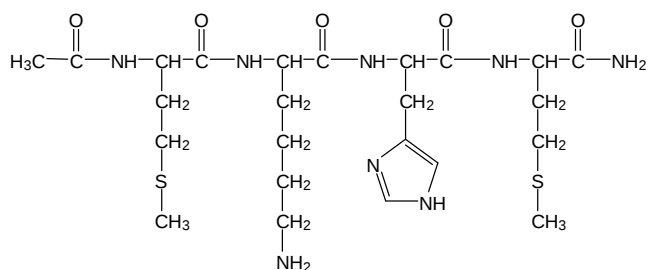
c. Ac-HisHisGlyHis-OH



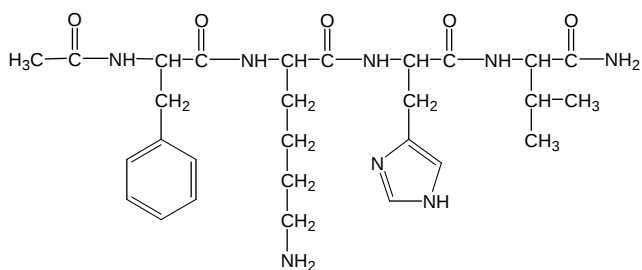
d. Ac-HisHisGlyHis-NHMe



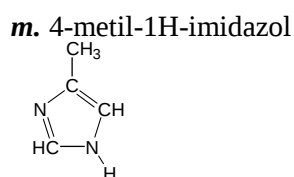
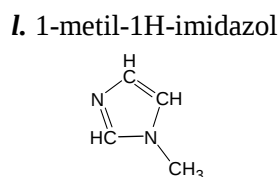
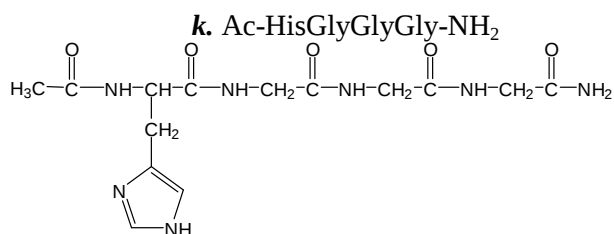
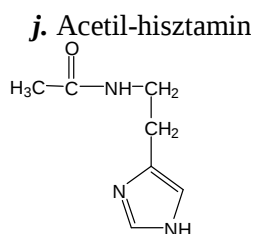
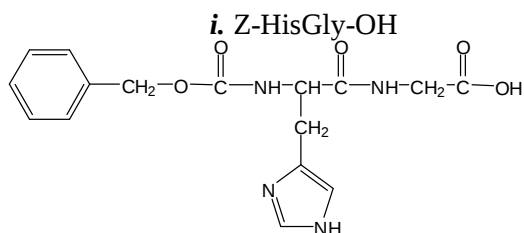
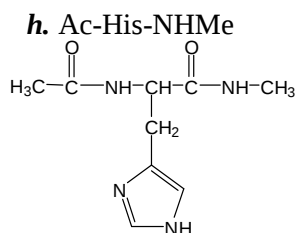
e. Ac-GlyThrHisSer-NH₂



f. Ac-MetLysHisMet-NH₂

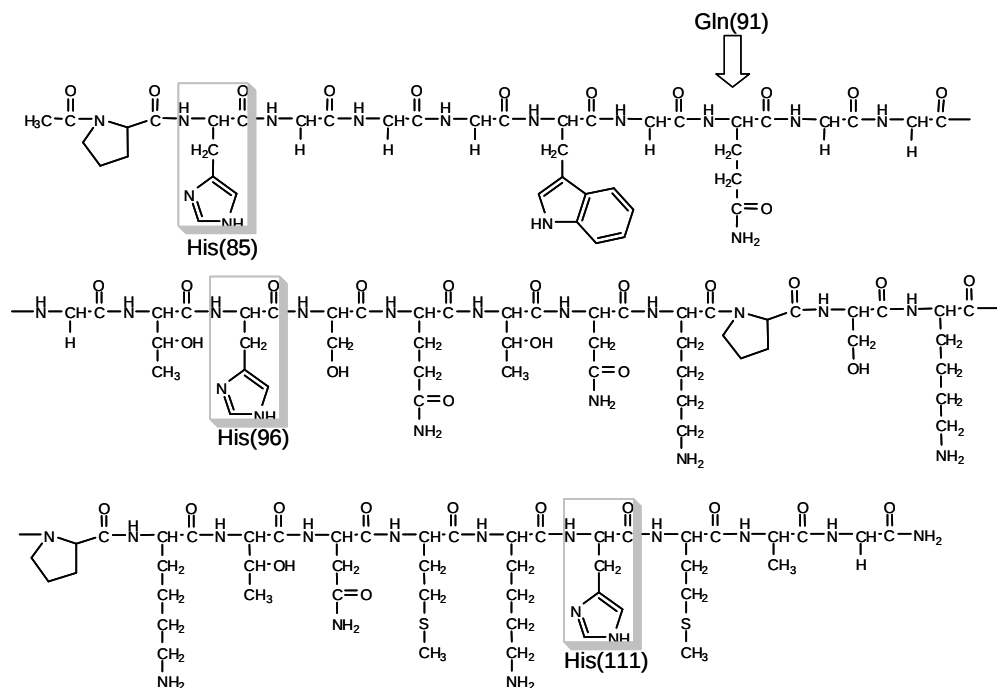


g. Ac-PheLysHisVal-NH₂



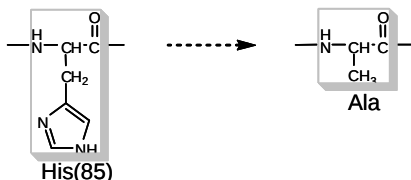
n. HuPrP(Ac84-114NH₂):

Ac-PHGGGWGQGGGTHSQTNKPSKPKTNMKHMAG-NH₂



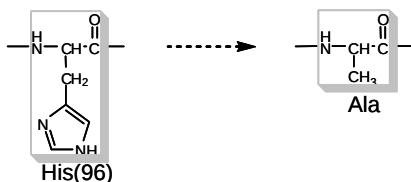
o. HuPrP(Ac84-114NH₂)His(85)Ala:

Ac-PAGGGWGQGGGT^{HSQTNKPSKPKTNMKHMAG}-NH₂



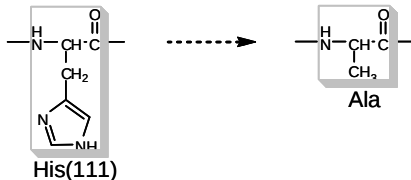
p. HuPrP(Ac84-114NH₂)His(96)Ala:

Ac-PHGGGWGQGGGT^{ASQTNKPSKPKTNMKHMAG}-NH₂



q. HuPrP(Ac84-114NH₂)His(111)Ala:

Ac-PHGGGWGQGGGT^{HSQTNKPSKPKTNMKAMAG}-NH₂



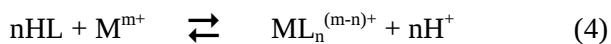
r. HuPrP(Ac91-114NH₂):

Ac-QGGGTHSQTNKPSKPKTNMKHMAG-NH₂

a HuPrP(Ac84-114NH₂) ábrájával a Gln(91), azaz a Q(91)-től számítva azonos

3.2. pH-potenciometria

A ligandumok protonálódási állandóit és a komplexek stabilitási állandóit pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg. A pH-potenciometria az oldatban végzett komplexképződési folyamatok egyensúlyi vizsgálatának egyik legáltalánosabban alkalmazott módszere. Alkalmazhatóságának feltétele, hogy a komplexképződés az oldat pH-jának megváltozásával járjon. A komplexképződési reakciót, melynek során a fémion verseng a hidrogénionnal a kötőhelyért, az alábbi egyenlettel írhatjuk le:



A titrálások során a fémiont és a ligandumot tartalmazó oldathoz kis részletekben ismert koncentrációjú KOH oldatot adagoltunk, majd az egyensúly beálltát követően olvastuk le a pH-t. Az ily módon kapott térfogat – pH adatpárok rögzítésével kaptuk a titrálási görbét. A görbék kiértékelésével a



egyensúlyi folyamatban képződő komplexek stabilitási szorzatát határozhatjuk meg, melynek értéke:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_pL_qH_r]}{[M]^p[L]^q[H]^r} \quad (6)$$

A kiértékelést a PSEQUAD számítógépes program segítségével végeztük.^[165] A térfogat – pH adatpárok mellett bemenő adatként meg kell adnunk a komponensek (M, L, H), valamint az asszociátumok (a ligandum különböző protonáltsági fokú részecskéi, a különböző $M_pL_qH_r$ fémkomplexek, illetve hidroxokomplexek) számát, azok összetételét az M, L és H komponensekre nézve (p, q, r), és az asszociátumok ismert protonálódási állandóit vagy stabilitási szorzatait. Az ismeretlenek esetében közelítő értékekre van szükség. Ezenkívül meg kell még adnunk a komponensek kiindulási teljes koncentrációit, a titráló oldat koncentrációját, a vízionszorzatot és az Irving^[166] korrekciós tényezőt. A keresett stabilitási szorzatok értékeit a kiindulási komponensekre felírható anyagmérleg-egyenletek megoldásai adják,

$$c_M = [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{pqr} [M]_i^p [A]_i^q [H]_i^r \quad (7)$$

$$c_A = [A] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{pqr} [M]_i^p [A]_i^q [H]_i^r \quad (8)$$

$$c_H = [H] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{pqr} [M]_i^p [A]_i^q [H]_i^r \quad (9)$$

ahol n a rendszerben levő asszociátumok száma, p, q és r pedig a sztöchiometriai együtthatók. A kiindulási adatok alapján a program Newton-Raphson iterációval közelíti az ismeretlen stabilitási állandók értékét mindaddig, amíg az ismert koncentrációjú titrálóoldatra megadható $\Sigma(V_{\text{mért}} - V_{\text{számított}})^2$ összefüggés értéke minimumot nem ér el. A számítási sorozat végén megkapjuk a keresett állandók finomított értékeit és azok hibáit (az adatok megadásakor az utolsó tizedesjegy hibáját zárójelben fogjuk feltüntetni), melyek alapján a program a titrálási görbe minden egyes pontjában kiszámítja az egyes részecskék egyensúlyi

koncentrációját, valamint a hozzájuk tartozó standard deviáció értékét. A közelítés jóságát a $|V_{\text{mért}} - V_{\text{számított}}|$ átlagértéke fogja megadni, amit illesztési paraméternek nevezünk. Végül a program egy általunk kiválasztott komponensre vonatkozóan (általában a fémion) a pH függvényében kirajzolja a részecskék koncentrációeloszlási görbét. Ezt különállóan a SED program Windows alatt futó változata segítségével, a MEDUSA-val is megszerkeszthetjük a kiindulási koncentrációk, valamint az asszociátumok stabilitási szorzatainak ismeretében.

Valamennyi, általunk vizsgált rendszert vizes oldatban tanulmányoztuk. A ligandum-törzsoldatokat szilárd vegyszerek bemérésével készítettük. A ligandum tisztaságát és protonálódási állandóit szintén potenciometriás mérésekkel határoztuk meg, a ligandumokat $0,001\text{--}0,004\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ koncentrációban tartalmazó oldatok titrlásával. A kiértékeléshez a SUPERQUAD nevű számítógépes szoftvert használtuk.

Méréseink során minden esetben pontosan ismert ($\sim 0,2\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) koncentrációjú karbonátmentes KOH titrlóoldatot használtunk, melynek pontos koncentrációját a $0,0500\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ -es kálium-hidrogén-ftalát (a.l.t. Reanal) oldat titrlásával határoztunk meg. A minták elkészítésekor használt sósav- és salétromsav-oldat ($\sim 0,2\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) koncentrációját a már ismert koncentrációjú lúgoldattal mértük. Mindhárom koncentráció meghatározását a titrlási görbék Gran-féle linearizálásával végeztük.^[167]

A vizsgálatokat $25,0\pm 0,1^\circ\text{C}$ hőmérsékleten végeztük, melyet ultratermosztát segítségével állítottunk be. A minták keverését mágneses keverőtest segítségével, míg a szén-dioxid távoltartását katalitikusan tisztított argongáz minta felé való vezetésével valósítottuk meg, miközben a titrlóedényünk fedve volt. A minták ionerősségét KCl vagy KNO_3 (fémiontól függően) oldat segítségével $0,2\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ -re állítottuk be (ez megegyezik a lúgoldat koncentrációjával, ami biztosítja az állandó ionerősséget a titrlások során).

A mérőrendszert kétpontos kalibrációval kalibráltuk: $0,0500\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ kálium-hidrogén-ftalát oldatra ($t=25,0^\circ\text{C}$, $\text{pH}=4,005\text{--}4,008$) és a vízionszorzat értékére ($t=25,0^\circ\text{C}$, $I=0,2\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl/ KNO_3 , $\text{pK}_w=13,756/13,772$). A műszer által kijelzett pH-értékekből az Irving^[166] korrekciós tényező levonásával számítottuk a hidrogénion-koncentrációt. A minták térfogata 3 és 5 cm^3 között változott, és koncentrációjuk a ligandumra nézve $0,001$ és $0,004\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ közötti tartományba estek a rendelkezésünkre álló ligandum mennyiségétől függően. A komplexképződési reakciók tanulmányozásához $2:1$, $1:1$, $1:2$ és $1:4$ fém/ligandum arányt állítottunk be.

A titrálásokat számítógép vezérelte Radiométer ABU 91 automata buretta segítségével, a kisebb térfogatú minták esetében MOL-AcS mikroburetta és MOLSPIN pH-mérő segítségével végeztük, melyekhez Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektrodot használtunk.

3.3. Spektrofotometria

A vizsgált rendszerek közül a Cu(II)- és a Ni(II)-tartalmúakat tanulmányoztuk UV-Vis spektrofotometriás módszerrel. A spektrumokat 250–1100 nm hullámhossz-tartományban vettük fel. A mérésekhez használt fotométerek típusai: Hewlett Packard HP 8453 egysugaras diódasoros, valamint Perkin Elmer Lambda 25 kétsugaras. Minden esetben 1,000 cm úthosszú küvettát használtunk, miközben a mintákban a ligandum koncentrációja a 0,001–0,004 mol·dm⁻³ közötti tartományba esett. A felvett spektrumok elemzését egyrészt a gyártó cég által biztosított szoftverrel végeztük, másrészt végeztünk számolásokat a PSEQUAD^[165] programmal is, amely által az egyes komplexek egyedi spektrumát tudtuk megadni.

A réz(II)komplexekre jellemző tetragonálisan torzult oktaéderes térben az energiaszintek négyfelé hasadnak, és az ezek közötti háromféle d-d átmenetnek ($d_{xz}(d_{yz}) \rightarrow d_{x^2-y^2}$; $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$; $d_z^2 \rightarrow d_{x^2-y^2}$) kellene megjelennie az abszorpciós spektrumokban, ám igen gyakori összeolvadásuk következtében egyetlen sávot látunk. Intenzitása nagymértékben függ a rézhez koordinálódó donatoratomok számától és minőségétől, illetve a pontos térbeli szerkezettől is. Azt figyelték meg, hogy nagymértékű hatása csak az ekvatoriális síkban koordinált donatoratomoknak van, a nitrogén-, illetve kisebb mértékben az oxigéndonorok a rövidebb hullámhosszak tartományába tolják el az abszorpciós maximumot, ezenkívül azt is megfigyelték, hogy a donatoratomok koordinálódásához rendelhető hatás additív. Sok ízben próbálkoztak olyan kvantitatív összefüggések megadásával, melyek segítségével kiszámíthatjuk a várható abszorpciós maximumot, ezekben a különböző donatoratomokhoz rendelhető hozzájárulási tényezőket (x_i)^[5] határoztak meg viszonylag sok spektrum alapján.

$$\lambda_{\max} = \frac{1000}{\sum_{i=1}^n x_i} \quad [\text{nm}], \quad (10)$$

ahol n – a $\lambda_{\max}$ értékére hatással lévő (hozzájárulási tényezővel rendelkezők) donatoratomok száma.

Érdemes megemlíteni, hogy ezen összefüggés figyelmen kívül hagyja a ligandumban jelen lévő szubsztituenseket, melyek nem vesznek részt a koordinációban, illetve a kelátgyűrű méretét, amely szintén hatással van a $\lambda_{\max}$ értékére. Ezenkívül nem használható az összefüggés axiális koordináció megléténél, ugyanis az vörös eltolódást (nagyobb hullámhosszak felé) eredményez.

A nikkel(II)komplexekben a leggyakoribb koordinációs szám 4 és 6. Az utóbbi, oktaéderes komplexekhez három viszonylag kis intenzitású ($\epsilon_{\max} < 30 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) d-d átmenet tartozik, melyek a következő hullámhossz-tartományban jelennek meg: 1430-770 nm, 910-500 nm, 520-370 nm. A 4-es koordinációs számú, síknégyszetes térbeli szerkezetű komplexek spektrumában nagyobb intenzitású ($\epsilon_{\max} \sim 50\text{-}500 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) sávok találhatók 400-550 nm és 430 nm (töltésátviteli) hullámhosszaknál. E síknégyszetes komplexek diamágneses sajátosságúak, és könnyen alakulnak ki más térbeli szerkezetű komplexekből.

Metionintartalmú ligandumok esetén a tioéterkén koordinációját töltésátviteli sáv megjelenése jelzi mindkét fém esetében. A torzult oktaéderes réz(II)komplexeknél a 290-360 nm hullámhossz-tartományban jelentkezik a $S \rightarrow \text{Cu CT}$ sáv, míg oktaéderes nikkel(II)komplexeknél $\sim 250 \text{ nm}$ -nél figyelhető meg.

3.4. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia egyike azoknak a spektroszkópiai módszereknek, amelyek a polarizált fény és egy optikailag aktív anyag kölcsönhatásán alapulnak. A síkban polarizált fénysugár felbontható két cirkulárisan polarizált fény, egy jobbra és egy balra forgó komponens összegére, amelyek azonos fázisban vannak és amplitúdójuk megegyezik. Ez fordítva is igaz: ha két egyenlő amplitúdójú, egymásra merőleges síkban polarizált fényt adunk össze, amelyek egymáshoz képest 90° fáziskülönbséggel rendelkeznek, úgy cirkulárisan polarizált fényt kapunk. A mérőműszer is ezen elv alapján állít elő cirkulárisan polarizált fényt. Az optikailag aktív anyag abszorpció (extinkció) koefficiense és törésmutatója különbözik a kétféle cirkulárisan polarizált fénysugárra, azon áthaladva az abszorpcióban különbség mutatkozik (ez a különbség a teljes abszorpcióhoz képest igen kicsi, annak kb. 1%-a). A cirkuláris dikroizmus (CD) görbe a hullámhossz függvényében ábrázolja a két összetevő eltérő abszorpcióját, pontosabban a $\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$ értékét. Tehát a cirkuláris dikroizmus, vagy más néven Cotton-effektus a síkban polarizált fény két

összetevőjének különböző abszorpciója. A CD görbe maximumai és minimumai az elektrongerjesztési abszorpciós spektrum maximuma helyén, illetve ahhoz igen közel jelentkeznek, és viszonylag keskeny Gauss-görbék, ellentétben az elektrongerjesztési spektrummal.

A fémkomplexek optikai aktivitása a komplex molekula aszimmetriájától, vagy a ligandum saját aszimmetriájától származhat. A komplex molekula optikai aktivitását okozhatja a központi atom aszimmetriája, vagy a komplexképződés hatására a ligandum donoratómján kialakuló aszimmetria. Ha a komplex optikai aktivitása a komplexképződés alatt alakul ki, akkor a komplexképződéssel a két enantiomer racém elegyét kapjuk, melyekhez ellentétes előjelű, azonos értékű Cotton-effektus tartozik, így kioltják egymást. Ezeket az enantiomereket csak kinetikailag inert komplexek esetében lehet elválasztani és vizsgálni.

A Cu(II), Ni(II) és Pd(II) peptidkomplexeinek vizsgálatára széleskörűen alkalmazott szerkezetvizsgálati módszer a CD spektroszkópia. Számos di- és tripeptidkomplex tanulmányozása során bizonyos törvényszerűségeket figyeltek meg.^[5,168] A hexadekán szabályt alkalmazva ezen komplexek CD spektrumai jól értelmezhetők. Ez alapján ha a komplex koordinációs síkja alatti és feletti teret 8-8 szektorra osztjuk, és minden szomszédos szektornak ellentétes előjelet tulajdonítunk, akkor az adott szektorban található optikailag aktív csoport hatására bekövetkező Cotton-effektus előjelét a szektor előjele adja meg. Ezenkívül azt is megfigyelték, hogy egy XYZ tripeptid fémkomplexének Cotton-effektusa egy adott hullámhosszon a következőképpen számítható (G glicint jeleöl):

$$\Delta\epsilon_{\lambda}^{XYZ} = \Delta\epsilon_{\lambda}^{XGG} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{GYG} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{GGZ} \quad (11)$$

A másik fontos megállapítás, hogy a komplexekben különböző helyzetben lévő, de azonos kémiai minőségű optikailag aktív csoportok különböző nagyságú Cotton-effektust eredményeznek:

$$\Delta\epsilon_{\lambda}^{GXG} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{GGX} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{XGG} \quad (12)$$

Ennek oka az, hogy a központi fémionhoz, mint kromofor csoporthoz kapcsolódó különböző donorcsoportok nem azonos hatásokkal továbbítják a királis információt.

A CD méréseket JASCO J-810 spektrométeren végeztük, 0,1 és 1 cm úthosszúságú küveták használatával 200-800 nm-es hullámhossztartományban. A spektrumokat szobahőmérsékleten különböző pH-értékeken vettük fel. Az oldatok koncentrációját úgy állítottuk be, hogy az abszorbancia 0,6-1 között legyen. A kapott CD spektrumok kiértékeléséhez a gyártó cég által biztosított szoftvert

használtuk. Az egyes komplexek egyedi spektrumait a PSEQUAD nevű program segítségével számoltuk ki.

3.5. ^1H NMR spektroszkópia

Az általunk vizsgált fémionok közül a Pd(II)- és egyes Zn(II)-komplexek körében végeztünk ^1H magmágneses-rezonancia méréseket. A síknégyszetes palládium(II)komplexek minden esetben diamágnesesek a d-pályák nagymértékű felhasadása miatt. Az NMR időskálájához viszonyítva ezekben a komplexekben a ligandumcsere sebessége többnyire lassú, ami azt eredményezi, hogy a szabad és a koordinált ligandum mágneses rezonanciajelei különböző kémiai eltolódás (δ) értékeknél jelennek meg. A kémiai eltolódás értékének változása (a szabad ligandumhoz viszonyítva), a jelek száma és felhasadása információt szolgáltat a komplexek koordinációs módjáról, illetve az esetleges izomerekről.

A cink(II)komplexek esetében a gyors ligandumcsere miatt sokszor az egyes asszociátumok jelei nem különülnek el. Mivel e komplexek vizsgálatára a spektrofotometria és a CD spektroszkópia nem alkalmazható (a látható tartományban nincs elnyelésük), néhány esetben informatív lehet a ^1H NMR.

Méréseinkhez 99,8%-os izotóptisztaságú D_2O -t (ISOTEC Inc.) használtunk oldószerként. Minden esetben felvettük a pD-függő NMR spektrumokat a szabad ligandumot és a komplexet tartalmazó minták esetén. A minták koncentrációja a rendelkezésünkre álló ligandum mennyiségétől függött, ligandumra nézve 0,01-0,002 mol·dm⁻³ koncentrációjúak, a fém/ligandum arány 1:1, 1:2, 1:4 és 1:10 volt. Az oldatok pH-ját NaOD és DCl vagy DNO_3 oldatok segítségével állítottuk be. Belső standardként tetrametil-ammónium-tetrafluoroborátot (3,18 ppm) használtunk.

Az alkalmazott technikák körében egydimenziós, illetve kétdimenziós (COSY) méréseket végeztünk. Az utóbbi egy palládiumkomplex koordinációs izomerpárjainak azonosításában volt segítségünkre.

Az NMR spektrumokat BRUKER AM 360 MHz FT-NMR készüléken vettük fel, a kiértékeléshez pedig az 1D és 2D WIN-NMR Bruker szoftvert használtuk.

3.6. ESR spektroszkópia

Az elektrospin-rezonancia spektroszkópia módszere olyan részecskék tanulmányozására alkalmas, amelyek párosítatlan elektront tartalmaznak, azaz

paramágneses sajátosságúak. A spektroszkópia másik neve, az elektron paramágneses rezonancia (EPR) is erre utal. A réz(II)ion paramágneses volta miatt ez a módszer kiválóan alkalmas komplexei vizsgálatára. Az ESR spektrumok jellemzői közé tartozik a hiperfinom szerkezet. A szerkezet létrejöttének oka, hogy az a mágneses tér, amely a magok mágneses momentumától származik, hatással van a párosítatlan elektronok mágneses momentumára. Általánosan megállapítható, hogy egy I spinszámú mag a spektrumban $(2I + 1)$ számú, azonos intenzitású finomszerkezetet hoz létre. A rézionra az $I = 3/2$, ami azt jelenti, hogy a réz(II)komplexek esetén 4 vonalból áll a hiperfinom szerkezet. Az ESR spektrumok hiperfinom szerkezete alapján a komplexek szerkezeti változásaira lehet következtetni. Az ESR spektrális paramétereket ($g_{\parallel}$, $A_{\parallel}$) a (13), (14) összefüggések alapján számolhatjuk ki, ezek összevetése más ismert koordinációjú komplex paramétereivel segítséget nyújthat a koordinációs mód és az esetleges térbeli szerkezet változásainak felderítésében.

$$g_{\parallel} = g_{\parallel}^0 \frac{H_0}{H_{\parallel}} \quad (13)$$

$$A_{\parallel} [\text{cm}^{-1}] = \frac{g_{\parallel} \cdot \mu_B \cdot a_{\parallel}}{h \cdot c}, \quad (14)$$

ahol $H_{\parallel}$: a mintában mért mágneses térerő [Gauss]

H_0 : a standardra kapott mágneses térerő [Gauss]

$a_{\parallel}$: paralell csatolási állandó [Gauss]

μ_B : Bohr-magneton ($9,27400899 \cdot 10^{-24} \text{ J} \cdot \text{T}^{-1}$)

h : Planck-állandó ($6,625 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}^{-1}$)

c : a fénysebesség ($2,99792458 \cdot 10^{10} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$)

Az ESR méréseket Olaszországban végezték részben a Sassari-i, részben a Catania-i egyetemeken a kutatócsoportunkkal szakmai együttműködésben álló bioszervetlen kutatócsoportok tagjai. Varian E-9, illetve Bruker ER 200D spektrométerek segítségével vették fel az ESR spektrumokat, etilén-glikol hozzáadása után 120 , illetve 150 K-re lefagyasztott mintákban. A fémtörzsoldat $^{63}\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ – ot tartalmazott. A minták rézkoncentrációja $0,005 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ volt. Külső standardként difenil-pikril-hidrazint használtak, melyre a $g_{\parallel}^0$ értéke 2,0028.

4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. N-terminálisan védett többhisztidin-tartalmú peptidek réz(II)komplexei

1. táblázat. Hisztidintartalmú peptidek deprotonálódási állandói és réz(II)komplexeik stabilitási állandói ($t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I=0,2\text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}\text{ KCl}$)

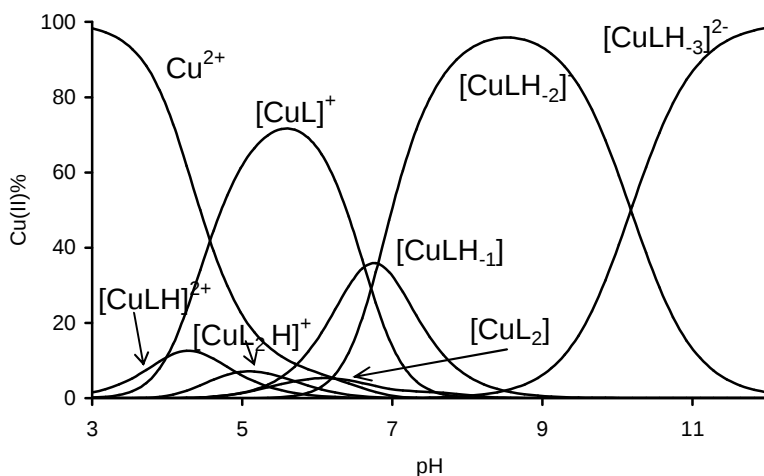
	Ac-HGH-OH	Ac-HGH-NHMe	Ac-HHGH-OH	Ac-HHGH-NHMe
pK (COOH)	2,31(6)		2,89(5)	
pK ($\text{N}_{\text{im}}\text{H}^+$)	6,17(4)	6,07(3)	5,43(2)	5,72(3)
pK ($\text{N}_{\text{im}}\text{H}^+$)	7,15(3)	6,80(2)	6,49(3)	6,28(2)
pK ($\text{N}_{\text{im}}\text{H}^+$)			7,37(2)	7,04(1)
[CuLH ₂]			17,52(6)	–
[CuLH]	10,89(9)	10,69(7)	13,13(5)	12,79(2)
[CuL]	6,90(2)	6,32(3)	7,87(3)	7,22(2)
[CuLH ₋₁]	0,27(4)	–0,11(5)	0,95(2)	0,79(3)
[CuLH ₋₂]	–6,54(3)	–5,91(2)	–7,43(2)	–6,12(1)
[CuLH ₋₃]	–16,72(3)	–16,01(2)	–17,29(2)	–15,24(2)
[CuLH ₋₄]	–	–	–	–26,43(6)
[CuL ₂ H]	17,41(10)	–	–	–
[CuL ₂]	11,71(5)	10,62(6)	–	–
pK(CuLH-CuL)	3,99	4,37	5,26	5,57
pK ₁ (amid)	6,63	6,43	6,92	6,43
pK ₂ (amid)	6,81	5,80	8,38	6,91
pK ₃ (amid)	10,18	10,10	9,86	9,12
pK ₄ (pirrol)	–	–	–	11,19
logK(Cu+N _{im})	3,74	3,89	3,66	–
logK(Cu+2N _{im})	6,90	6,32	5,76	5,75
logK(Cu+3N _{im})			7,87	7,22

Ezen vizsgálatok során négy ligandum rézkomplex-képződési folyamatait tanulmányoztuk: két tripeptidét (Ac-HisGlyHis-OH, Ac-HisGlyHis-NHMe), valamint két tetrapeptidét (Ac-HisHisGlyHis-OH és Ac-HisHisGlyHis-NHMe). A vizsgált ligandumok szerkezeti képletei a 35., 36. oldalon láthatók (18.a.,b.,c.,d. ábra). Amint azt a fejezet címe is elárulja, mindegyik ligandum N-terminálisan védett, azaz acetilezett, viszont a C-terminális végük felől mind a tri-, mind a tetrapeptidek esetében az egyik ligandum szabad: terminális karboxilcsoportot tartalmaz, a másik metil-amiddal blokkolt. A ligandumok deprotonálódási állandóit az 1. táblázat tartalmazza. Az jól látszik, hogy a karboxilát pK-k jól elválnak az imidazolcsoportok pK értékeitől, az utóbbiak esetében nem volt célunk a mikroállandó értékek meghatározása. A rendszerek

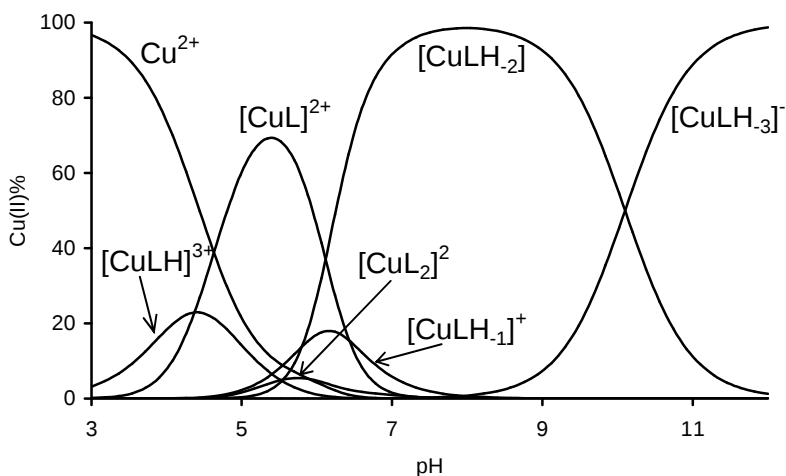
vizsgálatakor a pH-potenciometria alapján felállított modellt spektrofotometriás, ESR, valamint CD spektroszkópiás mérésekkel támasztottuk alá.

4.1.1. Két hisztidint tartalmazó tripeptidek réz(II)komplexei

Az Ac-HisGlyHis-OH, illetve az Ac-HisGlyHis-NHMe ligandumokkal alkotott réz(II)komplexek stabilitási állandóinak értékei az 1. táblázatban vannak összefoglalva, ezen értékek alapján szerkesztett koncentrációeloszlási görbék a 19., 20. ábrákon láthatók.

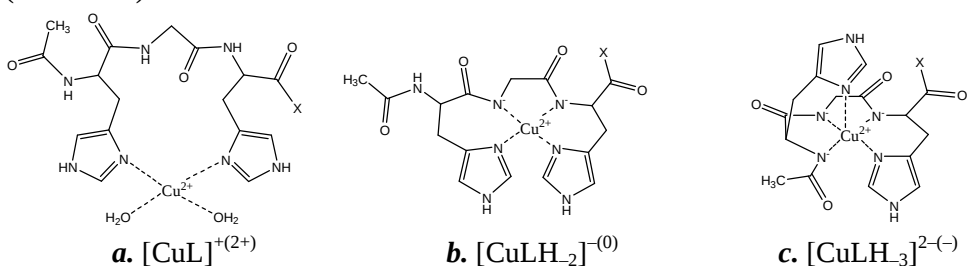


19. ábra. A Cu(II) – Ac-HisGlyHis-OH rendszer komplexeinek koncentrációeloszlási görbéi ($C_{\text{Cu}^{2+}} = C_L = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)



20. ábra. A Cu(II) – Ac-HisGlyHis-NHMe rendszer komplexeinek koncentrációeloszlási görbéi ($C_{\text{Cu}^{2+}} = C_L = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Ezekből kiderül, hogy mindkét rendszer esetén a komplexképződés a $[\text{CuLH}]$ típusú részecske megjelenésével kezdődik, amelyben a hisztidin imidazolcsoportja horgonydonorként szerepel, az ESR spektrumok alapján feltételezhető réz(II)ion karboxilátcsoporthoz való koordinálódása is a C-terminálisan szabad ligandum esetében. A Cu-N_{im} koordinációra a $\text{Cu(II)} - \text{N-acetil-hisztamin}$ rendszer lehet a vonatkoztatási alap, ahol $\log K = 3,97$.^[9] Az 1. táblázatban az egy N_{im} koordinációra vonatkozó értékek ($\log K (\text{Cu} + \text{N}_{\text{im}})$) igen közel állnak az Ac-Ha rendszer vizsgálatakor meghatározott értékhez. A következő deprotonálódási lépcsőben a $[\text{CuL}]$ összetételű komplex képződik, a komplex stabilitásának növekedési mértékéből ($\log K (\text{Cu} + 2\text{N}_{\text{im}})$ a $\log K (\text{Cu} + \text{N}_{\text{im}})$ -hez viszonyítva) a második imidazolnitrogén koordinációja feltételezhető. Ez a komplex jóval nagyobb koncentrációban van jelen az előzőhöz képest, és makrokelát szerkezetű (21.a. ábra).



21. ábra. Az $\text{Cu(II)}\text{-Ac-HisGlyHis-OH}$ és $\text{Cu(II)}\text{-Ac-HisGlyHis-NHMe}$ rendszerekben képződő komplexek szerkezetei ($\text{X} = \text{O}^-$ vagy NHMe)

A C-terminálisan is védett származék esetén valamelyest kisebb stabilitású komplex képződik, ami valószínűleg a karboxilátcsoport-koordináció stabilizáló hatásának hiányából fakad. A SOD enzim aktív centrumának modellezése szempontjából ennek a makrokelát szerkezetű komplexnek van jelentősége, mivel itt a réznek még van elég szabad koordinációs helye a szuperoxidgyök átmeneti koordinálódásához, ami egyik fontos kritériuma a SOD aktivitásnak.^[169] Ugyanakkor a komplex képződésének a fiziológiai pH tartományba kellene esni ahhoz, hogy jó potenciális modellje legyen az enzim aktív centrumának, valamint hogy jelentősebb SOD aktivitással bírjon. Hasonló makrokelát szerkezet létezését találtak már több esetben.^[109,110] Ezen vizsgálatoknál, úgy mint esetünkben is 650, és 700 nm között minimális CD aktivitás volt jellemző, ami közvetett bizonyítéka annak, hogy a koordináció az imidazolnitrogéneken keresztül valósul meg. Ugyanis a fémionhoz koordinálódó donorcsoportok eltérő mértékben képesek továbbítani a királis információt, ezeket a megállapításokat korábban Sigel és

Martin tették.^[5] Az imidazolnitrogén, valamint a karboxilátcsoport igen csekély mértékben képes ezen információ közvetítésére, míg az amidnitrogén az első helyen áll a sorban. Az Ac-HisGlyHis-OH ligandum [CuL] komplexe esetében az abszorpciós spektrum igen jó egyezést mutat az irodalomból már ismert Ac-HGHG-OH^[109] ligandum makrokelát szerkezetű komplexével (Ac-HGHG-OH: $\lambda_{\max} = 660 \text{ nm}$, $\epsilon = 38 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; Ac-HGH-OH: $\lambda_{\max} = 660 \text{ nm}$, $\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), ami szintén alátámasztja az általunk feltételezett szerkezetet, és ezek az értékek jól egyeznek az erre a koordinációs módra elméletileg számított $\lambda_{\max}$ értékkel (665 nm az ekvatoriálisan koordinált $[2\text{N}_{\text{im}}, \text{COO}^-, \text{H}_2\text{O}]$ donoratom-csoportra^[170]). Ugyanakkor az ESR-re vonatkozó irodalmi adatok összehasonlításából kiderül, hogy a [CuL] komplexekre megadott paraméterek eltérnek egymástól,^[109,110] és eltérnek az általunk vizsgált rendszerek paramétereitől is (2. táblázat, 51. old.), ami a ligandumok eltérő szerkezetéből is fakadhat.

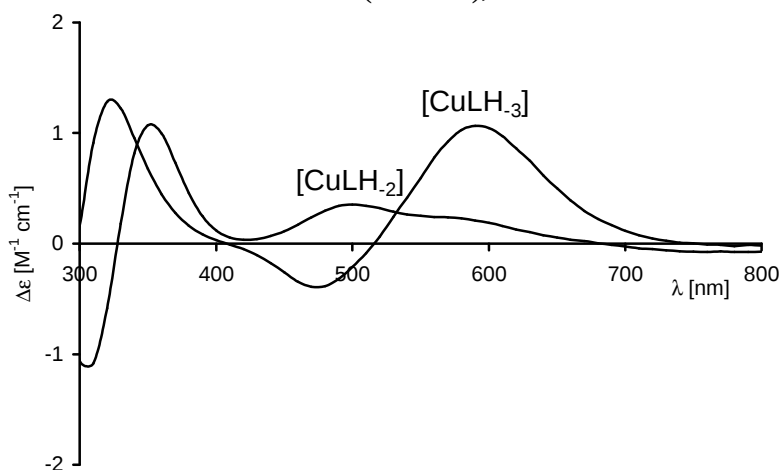
A pH növelésével a $[\text{CuLH}_{-1}]$ komplex alakul ki, amelyben a két imidazolnitrogén mellett egy amidnitrogén deprotonálódását és koordinálódását is feltételezzük. Ezt alátámasztandó, a részecske megjelenésével párhuzamosan a CD spektrumokban mindkét rendszer esetén Cotton-effektus megjelenése volt tapasztalható, azonban csekély intenzitásuk a komplexek kis koncentrációjával magyarázható. Ugyanilyen típusú részecske képződését viszont nem tapasztalták a Cu(II) – Ac-HVH-NH₂ rendszerben, itt az első két amidnitrogén kooperatív deprotonálódása megy végbe. A két koncentrációeloszlási görbét összevetve (19.,20. ábra, 47. old.) láthatjuk, hogy a $[\text{CuLH}_{-1}]$ részecske nagyobb koncentrációban van jelen a C-terminálisan szabad tripeptid esetében, mint az Ac-HGH-NHMe ligandumnál. Véleményünk szerint a két tripeptid koordinálódása közötti különbséget a karboxilátcsoport jelenléte vagy távolléte határozza meg. Abban az esetben, mikor jelen van a karboxilátcsoport (Ac-HGH-OH), lehetőség van a peptidnitrogén (His(3)-hoz tartozó) koordinációja mellett a karboxilát kötődésére is, amikor egy öttagú kelátgyűrű (N^-, COO^-) stabilizálja a molekulát a két imidazolnitrogén egyidejű koordinációja mellett. A karboxilátcsoport hiányában a $[\text{CuLH}_{-1}]$ komplex stabilitása csekély, ezért kisebb mennyiségben képződik.

Savas pH-n viszonylag sok részecske van jelen egyszerre az oldatban (19.,20. ábra), viszont a [CuL] komplex kivételével ezek mennyisége kicsinek mondható. Az ESR spektrumok is alátámasztják több komplex egyidejű jelenlétét mindkét ligandum esetén: folyamatos eltolódást mutatnak a kis pH értékeken felvett ESR spektrumok, ami egy sor komplex spektrumának a superpozíciójából adódik. Mindemellett a lefagyasztott minták ESR spektrumaiban intenzitás-

csökkenés volt megfigyelhető a $[\text{CuLH}_1]$ komplexek képződésének pH tartományában. Ez arra utal, hogy a hőmérsékletcsökkenés kedvez a polimer részecskék kialakulásának, amelyekben az imidazolgyűrű hídként szerepel a réz(II)ionok között, ilyenkor a rézcentrumok közel kerülnek egymáshoz, emiatt ezek a komplexek ESR csendesek.

Egy újabb amidnitrogén deprotonálódásával a $[\text{CuLH}_2]$ típusú komplex képződik ugyancsak mindkét rendszerben (21.b. ábra, 48. old.), amely uralkodó a fiziológiás pH tartományban (19.,20. ábra, 47. old.). A spektrális paraméterek változásai alátámasztják a részecske képződését (2.,3. táblázat, 51.,52. old.), amelynek eléggé szokatlan a szerkezete. Ugyanis (7,5,6)-tagú csatolt kelátgyűrűrendszer alakul ki az $[\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}]$ donoratombok koordinációjával, miközben a két szélső imidazolnitrogén közötti két amidnitrogén a Gly(2)-, illetve a His(3)-hoz tartozik. Az ESR spektrum szokatlanul kis hiperfinom csatolási állandója torzult szerkezet léteire utal, ami alátámasztja a 7-tagú kelátgyűrű képződését. Mindamellet, hogy nem jellemző a peptidkomplexekre a 7-tagú kelát képződése, több esetben is találtak már ilyen szerkezetet: így a Cu,Zn-SOD enzimet,^[109,110] illetve prion proteinek^[137,171-174] modellező peptidek esetében is.

A következő deprotonálódás során mind az Ac-HisGlyHis-OH, mind az Ac-HisGlyHis-NHMe ligandum esetén a $[\text{CuLH}_3]$ összetételű részecske képződik, feltételezésünk szerint a komplexek koordinációs módja is egyezik. A komplexképződési folyamat jelentős spektrális változásokkal jár (2.,3. táblázat), a CD spektrum is számottevően változik (22. ábra),



22. ábra. A Cu(II) - Ac-HisGlyHis-NHMe rendszer egyes komplexeinek moláris CD spektrumai

ezek arra utalnak, hogy nem hidroxokomplex képződéséről van szó. Az újabb amidnitrogén deprotonálódásával és síkban való koordinálódásával a korábban 7-tagszámú kelátgyűrűt 5-tagú kelát váltja fel. Így a (7,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer helyett (5,5,6) képződik, és korábbi vizsgálatok során már megállapították, hogy az (5,5,6)-tagú jóval nagyobb termodinamikai stabilitással rendelkezik, mint az előbbi.^[175] Ezáltal a $[\text{CuLH}_2]$ komplexben ekvatoriálisan koordinált imidazolnitrogén (His(1)-hez tartozó) kiszorul, és a $[\text{CuLH}_3]$ -ban átkerül az axiális pozícióba (21.c. ábra, 48. old.), ezt az ESR spektrum $A_{\parallel}$ alacsony értéke is alátámasztja. A karboxilátcsoport nem vesz részt a koordinációban, így a megvalósuló koordinációs mód $[(\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}})_{\text{ekvatoriális}} + + (\text{N}_{\text{im}})_{\text{axiális}}]$, ezt a fajta koordinációs módot mutatták ki az Ac-HGHG-OH^[109] ligandum réz(II)komplexében is. Ugyancsak hasonló donoratomok réz(II)ionhoz való kötődését találjuk egy nagyobb peptidfragmens szén-terminális végében, miközben egy másik réz(II)ion a peptid amino-végéhez koordinálódik.^[85] Ezenkívül az abszorpciós spektrumok torzulását figyeltük meg, ami valószínűleg a komplex szokatlan térbeli szerkezetéből fakad, ám ez egyezésben van a négyzetes piramisos térbeli szerkezetű részecskéknél tapasztaltakkal.^[176]

2. táblázat. Hisztidintartalmú peptidek ESR és UV-Vis spektrális paraméterei

Ligandum	Spektrális paraméterek			Komplex	Donoratomok
	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ (10^{-4} cm^{-1})	λ (nm), ε ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)		
Ac-HGH-OH	2,294	177	660, 40	$[\text{CuL}]^+$	2 N_{im} , COO^-
	2,285	173	<i>a</i>	$[\text{CuH}_1\text{L}]$	2 N_{im} , N^- , COO^-
	2,207	184	573, 122	$[\text{CuH}_2\text{L}]^-$	2 N_{im} , 2 N^-
	2,185	197	<i>b</i>	$[\text{CuH}_3\text{L}]^{2-}$	N_{im} , 3 N^- , $(\text{N}_{\text{im}})_{\text{ax}}$
Ac-HGH-NHMe	2,301	176	641, 38	$[\text{CuL}]^{2+}$	2 N_{im}
	2,205	188	566, 105	$[\text{CuH}_2\text{L}]$	2 N_{im} , 2 N^-
	2,185	197	<i>b</i>	$[\text{CuH}_3\text{L}]^-$	N_{im} , 3 N^- , $(\text{N}_{\text{im}})_{\text{ax}}$
Ac-HHGH-OH	2,302	176	655, 40	$[\text{CuHL}]^{2+}$	2 N_{im}
	2,243	193	<i>a</i>	$[\text{CuH}_1\text{L}]$	2 N_{im} , N^-
	2,200	191	571, 106	$[\text{CuH}_2\text{L}]^-$	2 N_{im} , 2 N^-
	2,182	198	<i>b</i>	$[\text{CuH}_3\text{L}]^{2-}$	N_{im} , 3 N^- , $(\text{N}_{\text{im}})_{\text{ax}}$
Ac-HHGH-NHMe	2,203	187	568, 108	$[\text{CuH}_2\text{L}]$	2 N_{im} , N^-
	2,185	199	<i>b</i>	$[\text{CuH}_3\text{L}]^-$	N_{im} , 3 N^- , $(\text{N}_{\text{im}})_{\text{ax}}$

a a rosszul oldódó komplexek, illetve a ligandum szennyezettsége miatt az oldat nem volt átlátszó

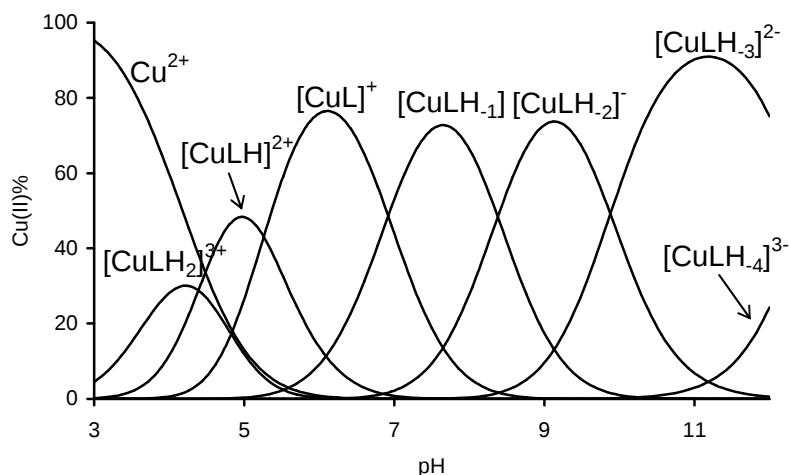
b a magyarázatot lásd a szövegben

3. táblázat. Több hisztidint tartalmazó peptidek réz(II)komplexeinek CD spektrális paraméterei: $\lambda_{\max}(\Delta\epsilon)[\text{nm}(\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1})]$.

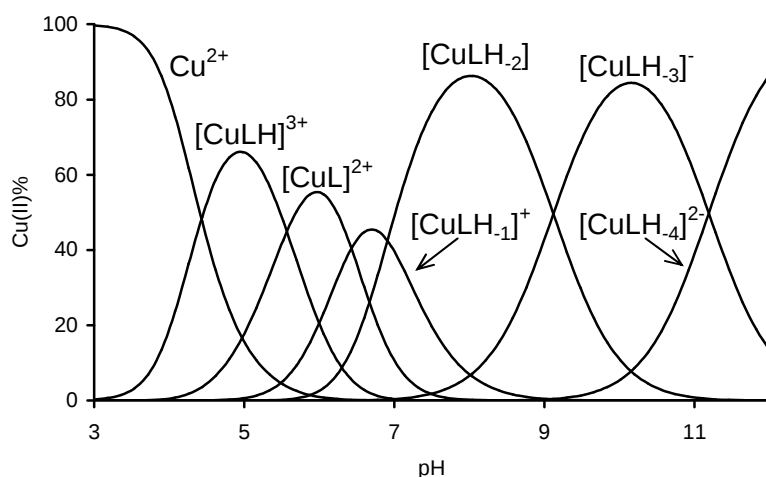
Komplex	Sáv	Ac-HGH-OH	Ac-HGH-NHMe	Ac-HHGH-OH	Ac-HHGH-NHMe
[CuH ₋₁ L]	N-Cu(II)	305(+0,4)	310(0,2)	300(+0,4)	295(-0,9)
		350(-0,4)	350(-0,4)	340(+0,1)	345(+1,3)
	d-d	–	–	565(+0,1)	565(+0,5)
[CuH ₋₂ L]	N-Cu(II)	300(-1,59)	303(-1,04)	300(-0,89)	300(-1,25)
		350(+2,13)	350(+1,08)	349(+1,43)	347(+1,53)
	d-d	580(+0,72)	572(+0,30) 502(+0,32)	583(+0,58)	573(+0,41)
[CuH ₋₃ L]	N-Cu(II)	325(+1,36)	281(-0,70)	290(-0,83)	291(-0,77)
			318(+1,87)	330(+1,38)	331(+1,66)
	d-d	480(-0,56) 590(+1,18)	475(-0,64)	472(-0,19)	473(-0,42)
[CuH ₋₄ L]	N-Cu(II)	–	–	280(-0,8)	281(-1,82)
				320(+8,2)	319(+3,57)
	d-d	–	–	480(-2,4)	479(-1,08)
				610(+2,3)	593(+1,70)

4.1.2. Három hisztidint tartalmazó tetrapeptidek réz(II)komplexei

A két vizsgált tetrapeptid az Ac-HisHisGlyHis-OH, valamint az Ac-HisHisGlyHis-NHMe volt. Mindkét rendszer esetében azonos sztöchiometriájú komplexek képződnek, ezért hacsak nem valamelyik konkrét ligandum komplexéről van szó, akkor az adott megállapítás mindkét rendszer komplexeire értendő. A réz(II)-vel alkotott komplexek stabilitási állandóit a *1. táblázat* tartalmazza (*46. old.*), mindkét rendszer koncentrációeloszlási görbéi a *23., 24. ábrán* láthatók. Ezen ligandumok réz(II)komplexxépződési folyamatait összefoglaló közleményünk megjelenését követően, méréseinktől függetlenül, a szegedi bioszervetlen kutatócsoport munkája nyomán is megjelent egy közlemény, melyben az általunk is vizsgált Cu(II) – Ac-HisHisGlyHis-OH rendszer komplexeiről számolnak be.^[177] A képződő komplexek koncentrációjának az eloszlása nagyon hasonló az esetünkben bemutatottal, kisebb eltérésekkel az eredmények jó egyezésben vannak az általunk közöltekkel.



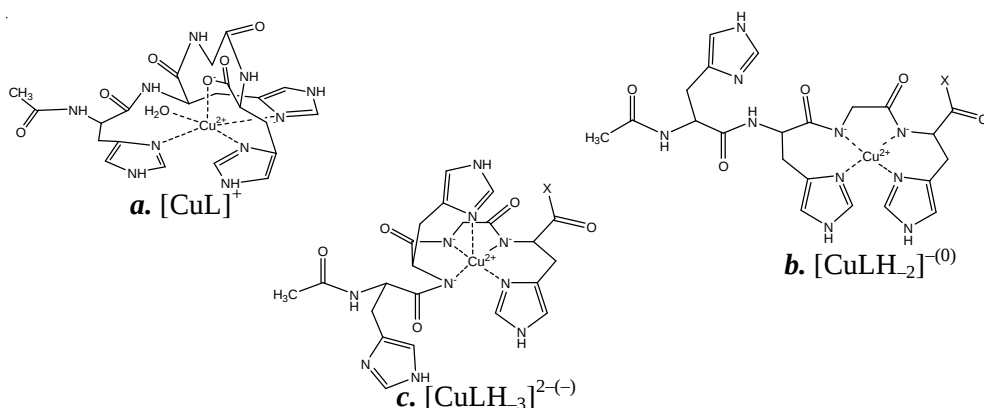
23. ábra. A Cu(II) – Ac-HisHisGlyHis-OH rendszer komplexekének koncentrációeloszlási görbéi ($C_{\text{Cu}^{2+}} = C_L = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)



24. ábra. A Cu(II) – Ac-HisHisGlyHis-NHMe rendszer komplexekének koncentrációeloszlási görbéi ($C_{\text{Cu}^{2+}} = C_L = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

A komplexképződési folyamat az Ac-HisHisGlyHis-OH ligandum esetében a $[\text{CuLH}_2]$ részecske megjelenésével kezdődik, ebben $[\text{N}_{\text{im}}, \text{COO}^-]$ koordináció valószínűsíthető. Ez a fajta komplex nem jelenik meg a másik ligandum esetében, ami a karboxilát stabilizáló hatásának hiányával magyarázható. Ebben eltérő viselkedést mutatnak a háromhisztidines tetrapeptidek és a kéthisztidin-tartalmú tripeptidek. Ugyanis a Cu(II) – Ac-HisGlyHis-NHMe rendszerben megjelenik az egyfogú imidazolkoordinációval jellemezhető komplex, miközben szintén nem tartalmaz karboxilát csoportot. Az eltérő ligandumméret lehet az egyik ok, ami

miatt ez a koordinációs mód nem jelenik meg az Ac-HisHisGlyHis-NHMe ligandumot tartalmazó rendszerben, másrésről a töltéskülönbségek is közrejátszhatnak. Viszont a $[\text{CuLH}]$, illetve a $[\text{CuL}]$ mindkét tetrapeptid-rendszerben egyaránt képződik, amelyekben újabb hisztidin oldalláncbeli imidazolnitrogének deprotonálódnak és koordinálódnak, azaz két-, illetve háromnitrogénes (25.a. ábra) komplexek jönnek létre. Amint azt a tripeptidek esetében is tapasztaltuk, a részecskék megjelenésének pH tartományában csekély intenzitású CD spektrumokat mértünk, ami alátámasztja, hogy a koordináció kizárólag az imidazolnitrogének keresztül valósul meg. Savas pH-n egyidejűleg vannak jelen az oldatban a fent említett részecskék, ami magyarázza az ESR és a látható spektrumok folyamatos tolódását. Mindemellett az imidazolgyűrű hídligandumként való viselkedését nem lehet kizárni, más szóval az oligomer részecskék képződését. A tri- és a tetrapeptidek származtatott stabilitási értékeinek ($\log K (\text{Cu} + 2\text{N}_{\text{im}})$ és $\log K (\text{Cu} + 3\text{N}_{\text{im}})$) összehasonlításából látszik, hogy a három imidazolgyűrű egyidejű koordinációja nagyobb stabilitást biztosít, mint a két oldallánc koordinációja (1. táblázat, 46. old.).



25. ábra. Az $\text{Cu(II)}\text{-Ac-HisHisGlyHis-OH}$ és $\text{Cu(II)}\text{-Ac-HisHisGlyHis-NHMe}$ rendszerben képződő komplexek szerkezetei ($\text{X} = \text{O}^-$ vagy NHMe)

Egy újabb deprotonálódási folyamat következtében a $[\text{CuLH}_1]$ összetételű komplex képződik, amelyben véleményünk szerint amidnitrogén koordinálódik még az előző imidazolnitrogének mellett. A folyamatot jellemző pK értékek amidnitrogén deprotonálódására utalnak (1. táblázat, 46. old.). A 19., 20. (47. old.), illetve a 23., 24. ábrák (53. old.) összehasonlításából látszik, hogy a $[\text{CuLH}_1]$ részecske koncentrációja a tetrapeptidek esetében számottevően nagyobb, mint a tripeptidekében. Nagy valószínűséggel a hisztidinek eltérő száma okozza ezt az

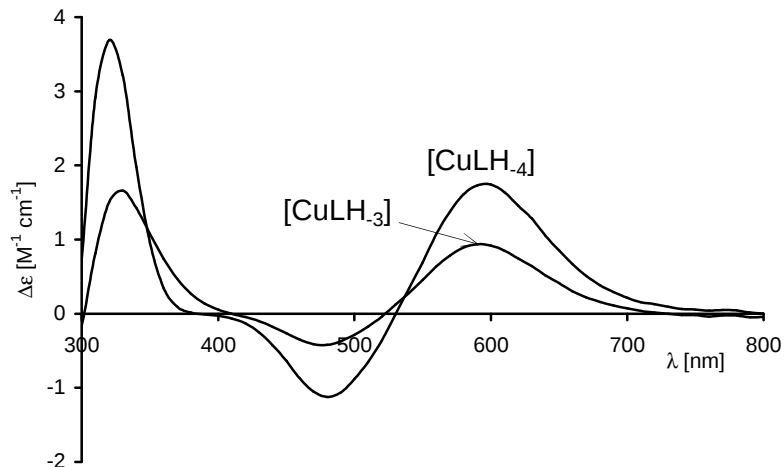
eltérést. Míg a tripeptidek esetében a két hisztidin koordinálódása nem elegendő ahhoz, hogy számottevő mennyiségben jelenjen meg az egy deprotonálódott amidnitrogént is tartalmazó $[\text{CuLH}_1]$ komplex, addig a három hisztidinoldallánc koordinálódása nagyobb stabilitást biztosítva az említett komplex nagyobb mennyiségét eredményezi. A tetrapeptideken belüli különbségek a karboxilát távolvagy jelenlétére vezethetők vissza. Emellett érdemes megemlíteni, hogy az adott pK -val jellemezhető folyamat akár koordinált vízmolekula deprotonálódásához is hozzárendelhető.^[177] Mivel mindegyik feltevésnek van realitásalapja, könnyen lehet, hogy többféle koordinációs izomer egyensúlya jellemzi a rendszert.

A második amidnitrogén deprotonálódása a $[\text{CuLH}_2]$ típusú komplex képződését eredményezi. A spektrális paraméterek változása (2.,3. táblázat, 51.,52. old.) a második amidnitrogén koordinálódását támasztja alá, így a koordinációs mód $[\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}]$ -re módosul az előbbi komplexhez képest. A két amidnitrogén a Gly(3), illetve a His(4)-hez tartoznak (25.b. ábra), analóg szerkezetet képezve, mint amelyet a tripeptideknél is láttunk. A szegedi kutatócsoport úgy véli, hogy az Ac-HisHisGlyHis-OH ligandum $[\text{CuLH}_2]$ összetételű részecskéje két koordinációs izomert is takar: az egyik az általunk is feltételezett szerkezet, a másik az előző szerkezethez képest egy axiálisan koordinált imidazolgyűrűt is tartalmaz, amely a His(1)-hez tartozik. Feltételezésüket arra alapozzák, hogy a látható spektrumban tapasztalt λ_{max} érték vörös eltolódást mutat néhány, szintén $[\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}]$ koordinációt tartalmazó komplexéhez képest, illetve hogy az ESR paraméterek torzulásra utalnak, és úgy vélik, hogy ezt a torzulást az imidazolgyűrű axiális koordinációja okozza. Véleményünk szerint a 7-tagú kelát is okozhatja a torzult szerkezetre utaló paramétereket, ám az imidazolgyűrű axiális koordinációja sem zárható ki, így a koordinációs izomerek léte ezúttal is valószínűsíthető.

A pH növelésével sor kerül a harmadik amidnitrogén deprotonálódására, melynek koordinációja a $[\text{CuLH}_3]$ komplex képződését eredményezi. A spektrális paraméterek igen hasonlóak a tripeptidekéhez, ezért arra következtettünk, hogy a koordinációs mód is hasonló. Jelen esetben is kiszorítja a koordinálódó harmadik amidnitrogén az ekvatoriális síkból az imidazolgyűrűt, amely átkerül az axiális pozícióba, négyzetes piramisos szerkezetet hozva létre (25.c. ábra). A tetrapeptidek esetében is megfigyelhető volt az abszorpciós spektrumban a torzulás, ami a négyzetes piramisos térbeli szerkezetnek a következménye. Az egyik lényeges különbség a két tetrapeptid komplexképződési folyamataiban az, hogy a $[\text{CuLH}_2]$ és a $[\text{CuLH}_3]$ képződése az Ac-HisHisGlyHis-OH ligandum esetében a nagyobb pH értékek felé van tolódva a másik tetrapeptid

(Ac-HisHisGlyHis-NHMe) ugyanezen összetételű komplexeihez képest. Ezt a legjobban a két koncentrációeloszlás szemlélteti (23.,24. ábra, 53. old.), valamint az 1. táblázatban (46. old.) feltüntetett amidnitrogének deprotonálódására vonatkozó lépcsőzetes állandók értékei ($pK(\text{amid})$). Az is látszik a táblázatból, hogy ugyanez a tendencia megvan a tripeptideknél is, csak kisebb mértékben. Ennek valószínűleg több oka is van, amelyek együttesen hatva eredményezik a fent leírtakat. Az egyik a komplexek eltérő töltése lehet, amelyek a koncentrációeloszlásokban vannak feltüntetve, a másik a $[\text{CuLH}_1]$ eltérő stabilitása (nagyobb stabilitás esetén a nagyobb pH-k felé tolja az utána keletkező komplexek képződését). A tetrapeptidek esetében felmerül még a második amidcsoport csökkenő savassága, amit a nemkoordinálódó oldallánc (a 7-tagú kelátból eredő) okoz (25.c. ábra, 54. old.).

A tetrapeptidek esetében negyedik ekvivalens lúgfogyás is mérhető volt, ami a $[\text{CuLH}_4]$ összetételű komplex képződését eredményezi. Ez vagy újabb amidnitrogén, vagy a pirrol típusú nitrogén deprotonálódásának lehet a következménye. Egy harmadik lehetőség szerint vegyes-hidroxokomplex képződik, ám a Cotton-effektus növekedés ez ellen szól, ezt szemléltetik a 26. ábrán látható $\text{Cu(II)} - \text{Ac-HisHisGlyHis-NHMe}$ rendszer CD spektrumai.



26. ábra. A $\text{Cu(II)} - \text{Ac-HisHisGlyHis-NHMe}$ rendszer egyes komplexeinek moláris CD spektrumai

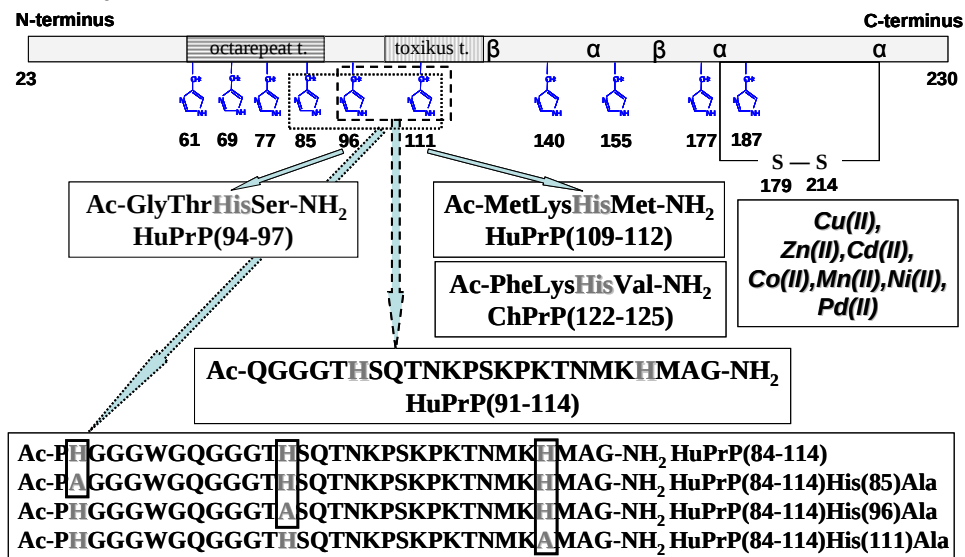
A negyedik amidnitrogén deprotonálódásakor $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-]$ koordináció alakulna ki, ami igen jellegzetes ESR spektrumot eredményezne. Nevezetesen a szuperhiperfinom csatolás (4 ekvivalens nitrogéné a réz(II)ionnal) következtében 9 vonal megjelenését lehet várni legalább az első párhuzamos jelnél, mint ahogy

azt a réz(II)–ciklo(β -AlaGly- β -AlaGly) rendszerénél is tapasztalták, amelyben a $[\text{CuLH}_4]$ összetételű részecskét csak a négy amidnitrogénes koordinációval lehet leírni.^[178] Az Ac-HisHisGlyHis-OH ligandum esetén a $[\text{CuLH}_4]$ képződése olyannyira nagy pH-k felé tolódik, hogy stabilitási állandójának értékét a pH-potenciometriás mérésekből nem lehet biztonsággal megállapítani. A másik terapeptidnél a negyedik amidnitrogén koordinálódását ki lehet zárni, mivel az ESR spektrumban az említett típusú csatolást nem tapasztaltuk. A védett ligandum esetén a negyedik nitrogén deprotonálódására vonatkozó érték a $\text{p}K_4(\text{NH}) = 11,19$ beleesik az imidazol pirrol típusú (N(1)H) nitrogénjének a deprotonálódási tartományába (9,6 - 11,2).^[5] Ezek alapján feltételezhető a $[\text{CuLH}_4]$ komplexben egy negatív töltésű imidazoláto-gyűrű képződése (His(4)-hez tartozó), miközben a koordinációs mód változatlan marad: $[3\text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}]$.

Összegzésként elmondható, hogy mind a négy vizsgált ligandum igen jó rézmegkötő-képességgel bír. A peptidekben található hisztidin-oldalláncok hatékony horgonydonoroknak bizonyultak a réz(II)ion számára, ezáltal az képes volt indukálni a peptidnitrogének deprotonálódását és stabil komplexeket alkotni. A tripeptidek esetében az első két amidnitrogén deprotonálódása közel kooperatív módon megy végbe, míg a tetrapeptideknél ez a folyamat lépcsőzetes. A tetrapeptidekben lévő harmadik hisztidin tovább növeli a peptid fémmegkötő-képességét.

4.2. A prion proteint modellező peptidek kétértékű átmenetifémekkel alkotott komplexei

PhD munkám kezdetekor a prion protein fémmegkötő-képességét illetően széleskörűen tanulmányozott volt már az octarepeat tartomány, ám az azon kívüli tartományok alig, ezért a ligandumok kiválasztásakor ezt a szempontot vettük figyelembe. A 27. ábra vázlatosan mutatja be a vizsgált ligandumokat és a tanulmányozott fémionok körét.



27. ábra. A vizsgált ligandumok (prionmodellek) illetve fémionok

A két tetrapeptid a His(96) és a His(111) körüli peptidrészek aminosavsorrendjét utánozzák (a harmadikról később lesz szó). Mivel ugyanazon körülmények között voltak vizsgálva, ezért lehetőségünk volt a rézzel alkotott komplexek stabilitási állandóinak összehasonlításával e fémhez való affinitásuk sorrendjének a meghatározására. Az Ac-GlyThrHisSer-NH₂ és az Ac-MetLysHisMet-NH₂ az ember prion proteinjének (HuPrP azaz humán PrP) 96. és 111. pozícióban lévő hisztidinjeinek a környékét modellezzik, viszont a harmadik, az Ac-PheLysHisVal-NH₂ az utóbb említett humán fragmensnek a csirke prionjában megtalálható analógja. A humán szegmens két metioninja helyett ebben fenilalanint és valint találunk. Mivel az irodalomban vita övezte a metioninoldallancok koordinációjának a valószínűségét a humán fragmens esetén, ezért érdekes volt a két tetrapeptid rézzel való komplexképződési folyamatainak az összevetése. Másrészről ismert, hogy a csirke prion proteinje ellenálló a juhok által

terjesztett surlókór prionjaival szemben. Ez okból is esett e tetrapeptidre választásunk. Az említett tetrapeptidek komplexképződési folyamatait a réz(II)ionon kívül egyéb fémionokkal is tanulmányoztuk. Az irodalomban a Mn(II)- és Zn(II)ionok kapcsán találunk utalást arra, hogy kötődésük kapcsolatba hozható a protein konformáció-változásaival. Ezen két fémionon kívül, vizsgálatainkat Cd(II), Co(II), Ni(II) és Pd(II)-vel is elvégeztük. Az első két fémre választásunk úgy esett, hogy koordinációs kémiai szempontból nagy hasonlóságot mutatnak a Zn(II)-vel, viszont élettani szempontból funkciójuk jelentősen különbözik. Az irodalomból ismert, hogy a nikkel(II)ion elég gyakran hasonló módon koordinálódik mint a rézion, és mivel mára talán elfogadott, hogy a PrP egy rézkötő protein, ezért volt érdekes a nikkelkomplexek tanulmányozása. A palládium(II)ion viszont legnagyobb mértékben képes az amidnitrogének deprotonálódását indukálni a felsorolt fémionok közül, komplexei ezért érdekesek.

Mindkét hisztidint, a 96.- és a 111.-t is tartalmazza az a peptid (HuPrP(91-114)), melynek nikkel(II)ionnal alkotott komplexeit lengyelországi tanulmányi utam során volt lehetőségem vizsgálni.

Az egyhisztidin-tartalmú tetrapeptidek vizsgálataiból kiderült, hogy a mi kis modelljeinkhez igen csekély mértékben kötődik a cinkion, annak ellenére, hogy az irodalomban a prion cinkionindukált konformáció-változásáról írnak. Mindemellett találunk utalást arra, hogy több hisztidin jelenléte elősegítheti a nagyobb mértékű affinitást a Zn(II) felé.^[76,179] Így érdekes volt a nagytagszámú és egyben többhisztidin-tartalmú prionmodellek cinkkomplex-képződési folyamatait megvizsgálni. Olyan peptid tanulmányozására került sor, mely 31 aminosavból áll és mind az octarepeat tartománybeli His(85)-t, mind az azon kívül eső His(96) és His(111)-t is tartalmazza (HuPrP(84-114)). Ezen kívül ennek a ligandumnak olyan mutánsait is tanulmányoztuk, melyekben a His(85) vagy a His(111) egyenként alaninra voltak cserélve (HuPrP(84-114)His(85)Ala, HuPrP(84-114)His(111)Ala). Méréseinkkel párhuzamosan kutatócsoportunkban ezek rézkomplexképződési folyamatait vizsgálták. A PrP rézhez való nagy affinitása ismert, ellenben az is ismert, hogy a szervezetben a cinkkoncentráció nagyobb, mint a rézé, ezért végeztünk a nagytagszámú molekulákkal (HuPrP(84-114)His(85)Ala, HuPrP(84-114)His(96)Ala) olyan méréseket, amikor a mintánk mindkét fémiont egyidejűleg tartalmazta (vegyes fémes rendszerek).

A peptidek mindegyikének N- és C-terminálisan is blokkolt formáját vizsgáltuk. Ahogy azt korábban megállapították, ezek sokkal jobban modellezik az adott fragmenst a proteinben.^[144]

4.2.1. A His(111) és a His(96) rézkötőhelyeket modellező tetrapeptidek vizsgálata

4.2.1.1. A Cu(II) – Ac-MKHM-NH₂ és Cu(II) – Ac-FKHV-NH₂ rendszerek komplexképződésbeli különbségei

A His(111) környékét modellező tetrapeptid (HuPrP(Ac109-112NH₂): Ac-MetLysHisMet-NH₂), illetve ennek a szekvenciának a csirkékben megtalálható analógja (ChPrP(Ac122-125NH₂): Ac-PheLysHisVal-NH₂) eredményeinek bemutatásával kezdjük, és később térünk rá a His(96) tetrapeptid modell eredményeinek bemutatására. Mindkét ligandum protonálódási állandói, illetve réz(II)komplexeik stabilitási állandói a 4. táblázatban vannak összefoglalva.

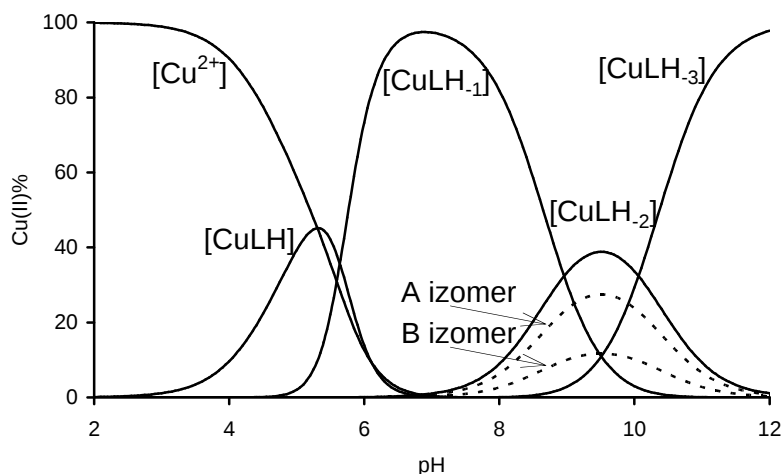
4. táblázat. A humán és a csirke prion proteint modellező tetrapeptidfragmensek deprotonálódási állandói és réz(II)komplexeik stabilitási állandói (t=25 °C, I=0,2 mol·dm⁻³ KCl)

	ChPrP(Ac122-125NH ₂) Ac-PheLysHisVal-NH ₂	HuPrP(Ac109-112NH ₂) Ac-MetLysHisMet-NH ₂
pK(His)	6,29(3)	6,22(1)
pK(Lys)	10,28(2)	10,28(1)
Komplex	logβ	logβ
[CuLH]	13,88(6)	13,98(11)
[CuL]	7,38(11)	–
[CuLH ₋₁]	2,02(3)	2,70(5)
[CuLH ₋₂]	-6,50(4)	-6,26(9)
		*[CuLH ₋₂] _{3N} : -6,78(9)
		**[CuLH ₋₂] _{4N} : -6,41(9)
[CuLH ₋₃]	-16,69(4)	-16,32(9)

*[CuLH₋₂]_{3N}: 3N-es komplex deprotonált lizil-ε-aminocsoporttal

**[CuLH₋₂]_{4N}: 4N-es komplex protonált lizil-ε-aminocsoporttal

A ligandumoknak két-két disszociábilis protonja van, melyek lúggal való titrálás során válnak le, eszerint az adott pK-értékek a hisztidin-oldalláncbeli imidazol- és a lizin-oldalláncbeli ε-aminocsoport deprotonálódásához rendelhetők. A réz(II)komplexe koncentrációeloszlási görbéi a 28.,29. ábrákon láthatók, megfigyelhető, hogy ezek eléggé hasonlóak.

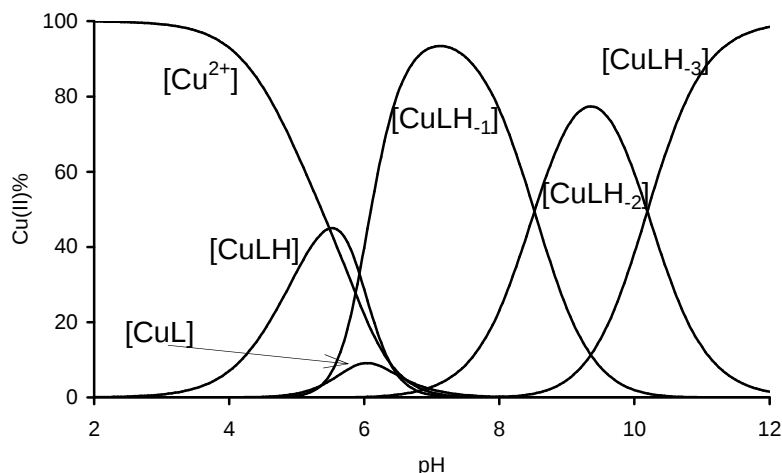


A $[\text{CuLH}_2]$ koordinációs izomerei (---):

A izomer: 4N-es komplex protonált lizil- ϵ -aminocsoporttal

B izomer: 3N-es komplex deprotonált lizil- ϵ -aminocsoporttal

28. ábra. A $\text{Cu(II)} - \text{HuPrP(Ac109-112NH}_2\text{)}$ (L: Ac-MKHM-NH₂) rendszer komplexeinek koncentrációeloszlási görbéi ($C_{\text{Cu}^{2+}} = C_L = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)



29. ábra. A $\text{Cu(II)} - \text{ChPrP(Ac122-125NH}_2\text{)}$ (L: Ac-FKHV-NH₂) rendszer komplexeinek koncentrációeloszlási görbéi ($C_{\text{Cu}^{2+}} = C_L = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Mindkét rendszerben a komplexképződés pH 4 körül a $[\text{CuLH}]$ összetételű részecske megjelenésével kezdődik. A lizinoldallánc protonáltságát figyelembe véve ebben a komplexben a ligandum egyfogú koordinálódását feltételezzük a rézionhoz (az imidazolnitrogénen keresztül). Ezt alátámasztandó, pH 5,5 alatt gyakorlatilag nem tapasztalunk CD aktivitást egyik rendszerben sem. Emellett az

ESR paraméterek viszonylag jó egyezést mutatnak (5. táblázat) az octarepeat monomer egységet modellező ligandum azon komplexével, melyben szintén egyfogú hisztidin koordinációt feltételeznek ($g_{\parallel} = 2,360$, $A_{\parallel} = 130$).^[136]

5. táblázat. A human és csirke prion proteint modellező tetrapeptidek réz(II)komplexeinek spektrális paraméterei.

Komplex	ChPrP(Ac122-125NH ₂) Ac-PheLysHisVal-NH ₂			HuPrP(Ac109-112NH ₂) Ac-MetLysHisMet-NH ₂		
	UV-Vis	CD	ESR	UV-Vis	CD	ESR
	$\lambda_{\max}(\epsilon)$ ▲	$\lambda_{\max}(\Delta\epsilon)$ ▲	$g_{\parallel}/A_{\parallel}$ +	$\lambda_{\max}(\epsilon)$ ▲	$\lambda_{\max}(\Delta\epsilon)$ ▲	$g_{\parallel}/A_{\parallel}$ +
[CuLH]	—	—	2,373/133	—	—	2,370/133
[CuLH ₋₁]	606(98)	605(-0,35) 510(+0,40) 345(-1,31) 243(+12,3)	2,228/165	629(123)	660(+0,15) 530(+0,33) 380(+0,16) 325(-1,27) 248(+7,56) 218(-0,75)	2,231/172
[CuLH ₋₂]	528(134)	650(+1,00) 500(-1,33) 360(-0,17) 320(+1,10) 290(-0,10) 260(+4,49) 220(+23,9)	2,195/195	*[CuLH ₋₂] _{3N} : ugyanaz mint a [CuLH ₋₁]		
		**[CuLH ₋₂] _{4N} : ugyanaz mint a [CuLH ₋₃]				
[CuLH ₋₃]	525(142)	655(+1,27) 503(-1,84) 355(-0,16) 320(+0,65) 290(-0,86) 260(+4,82) 222(+29,9)	2,195/195	521(127)	652(+0,92) 494(-1,56) 354(-0,17) 316(+0,74) 289(-0,81) 256(+4,80) 229(-2,93)	2,195/194

*[CuLH₋₂]_{3N}: 3N-es komplex deprotonált lizil-ε-aminocsoporttal

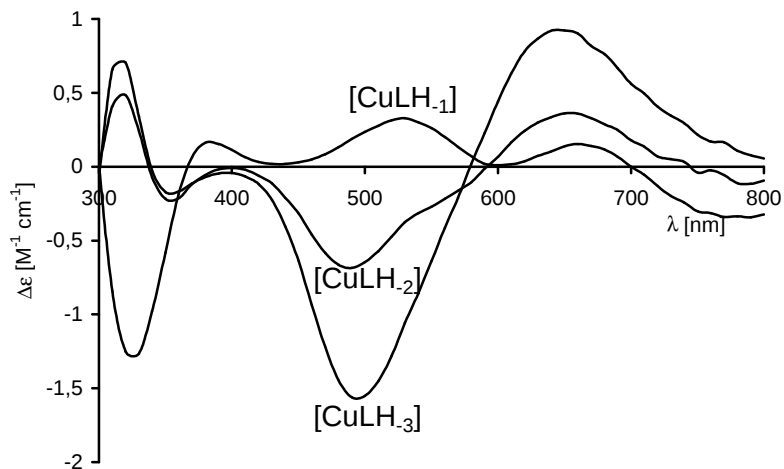
**[CuLH₋₂]_{4N}: 4N-es komplex protonált lizil-ε-aminocsoporttal

▲ [nm(dm³mol⁻¹cm⁻¹)]

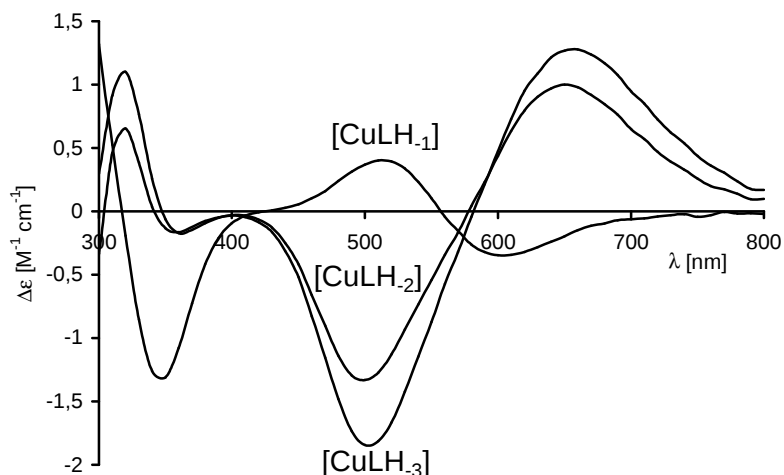
+(10⁻⁴cm⁻¹)

Egy újabb protonvesztés a [CuL] komplexet eredményezheti, ám az Ac-MetLysHisMet-NH₂ esetében egyáltalán nem számolható a képződése, és az Ac-PheLysHisVal-NH₂ esetében is csak kis mennyiségben képződik, ami azt jelenti, hogy mindkét rendszerben kooperatív módon megy végbe a következő két

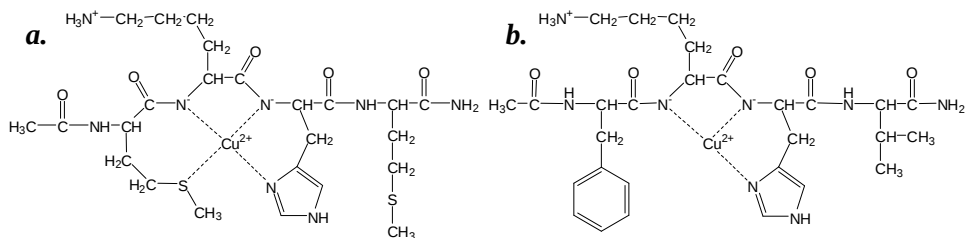
deprotonálódási folyamat. Azt feltételezzük, hogy ezek amidnitrogének (His és Lys) deprotonálódásához tartoznak, ugyanis az abszorpciós spektrumban kék eltolódást és a komplexek koncentrációjának növekedésével párhuzamosan abszorbancianövekedést tapasztaltunk. Ez utóbbit figyelhettük meg (abszorbancia helyett $\Delta\epsilon$ értendő) a CD spektrumokban is a d-d átmenetekhez tartozó sávoknál; ezen kívül az $N^- \rightarrow Cu^{2+}$ töltésátviteli sávok jelenléte is alátámasztja, hogy a rézion koordinációs szférájában ott van az amidnitrogén ($\lambda_{max} = 240-345$ nm) (5. táblázat). Azt, hogy ezek a sávok az $N^- \rightarrow Cu^{2+}$ átmenetekhez tartoznak, az támasztja alá, hogy a kizárólagos imidazolkoordináció pH-tartományában nem tapasztalunk, illetve elenyésző intenzitású CD aktivitást figyelhetünk meg e hullámhossztartományban, ám az amidnitrogének deprotonálódásával Cotton-effektus jelenik meg a spektrumnak ezen a részén is. Ugyanakkor nem zárható ki az, hogy a $N_{im} \rightarrow Cu^{2+}$ átmenetekhez tartozó sávok is megjelennek ebben a tartományban, ám csekély intenzitásuk miatt átfedésben vannak a $N^- \rightarrow Cu^{2+}$ CT sávokkal. Tehát a $[CuLH_1]$ komplexben a $[2N^-, N_{im}]$ kötésmódot feltételezzük, miközben a lizin oldallánca protonálva marad, ezért a részecskét $[Cu(H_2L)H]$ formában is felírhatjuk. Az ESR paraméterek alátámasztják a három nitrogéndonor koordinálódását, ezt más hasonló rendszerek adataival összehasonlítva állapíthatjuk meg.^[151] A vizsgált rendszerek paramétereinek összevetéséből láthatjuk, hogy a humán és a csirke prionfragmens nagyfokú hasonlóságot mutat, ám a CD spektrumokban megfigyelhetünk egy különbséget (30.,31. ábra). A HuPrP(Ac109-112NH₂), azaz a metioninokat tartalmazó $[CuLH_1]$ komplex jelenlétének pH-tartományában egy töltésátviteli sáv megjelenését tapasztaltuk, amely nem jelenik meg a másik ligandum esetében. Korábban megfigyelték, hogy a metionin tioéterkénjének a koordinációját jól jelzi egy CT sáv megjelenése a CD spektrumban,^[180,181] az adatok egyértelműen azt mutatták, hogy a tioétercsoport axiális koordinálódása jelentős negatív, míg ekvatoriális koordinálódása kevésbé intenzív pozitív Cotton-effektussal jár együtt. Esetünkben ez utóbbi áll fenn. A legnagyobb λ_{max} érték 360 nm-nél volt, esetünkben kicsivel feljebb ($\lambda_{max} = 380$ nm), míg a HuPrP(Ac106-114NH₂) nonapeptid esetében még nagyobb 385 nm értéknél jelenik meg ez a sáv. A $S \rightarrow Cu^{2+}$ CT sáv intenzitása a $[CuLH_1]$ komplex koncentrációjával arányosan változik. Az amidnitrogének deprotonálódási irányát figyelembe véve a Met(109) oldallancának kötődését valószínűsítjük.



30. ábra. A Cu(II) – HuPrP(Ac109-112NH₂) (L: Ac-MKHM-NH₂) rendszer egyes komplexjeinek moláris CD spektrumai



31. ábra. A Cu(II) – ChPrP(Ac122-125NH₂) (L: Ac-FKHV-NH₂) rendszer egyes komplexjeinek moláris CD spektrumai



32. ábra. Az **a.**:Cu(II) – HuPrP(Ac109-112NH₂) (L: Ac-MetLysHisMet-NH₂), illetve **b.**:Cu(II) – ChPrP(Ac122-125NH₂) (L: Ac-PheLysHisVal-NH₂) rendszerben képződő [CuLH₁] komplexek szerkezetei

Mindkét rendszer $[\text{CuLH}_{-1}]$ komplexének szerkezete a 32. ábrán látható. Az itt ábrázolt kötésmódbeli különbséget az egyensúlyi adatok is alátámasztják. A 6. táblázatban az amidnitrogének deprotonálódására vonatkozó pK értékeket találhatjuk, az első két amidnitrogén kooperatív deprotonálódása miatt a lépcsőzetes értékek helyett átlagot adunk meg (pK_{-12}). Ezekből kiderül, hogy a pK_{-3} és a pK_{-12} közötti különbség nagyobb értéket mutat a metionintartalmú ligandum esetén, ami alátámasztja azt a feltevésünket, mely szerint a metioninoldallánc koordinációja bár gyenge, ám stabilizálja a $[\text{CuLH}_{-1}]$ komplexet, így a tioéterkén helyére belépő harmadik amidnitrogén koordinálódása nagyobb pH értékre tolódik, azaz a másik rendszer esetében a harmadik amidnitrogén kötődése kedvezményezettebb (a pK_{-3} értéke kisebb). Vizsgálatainkkal egyidejűleg kutatócsoportunkban a két peptid nagyobb (nonapeptid) változatát is vizsgálták, melyek ugyanezen szekvenciát tartalmaznak, ám nagyobb tartományt ölelnek fel a proteinből.

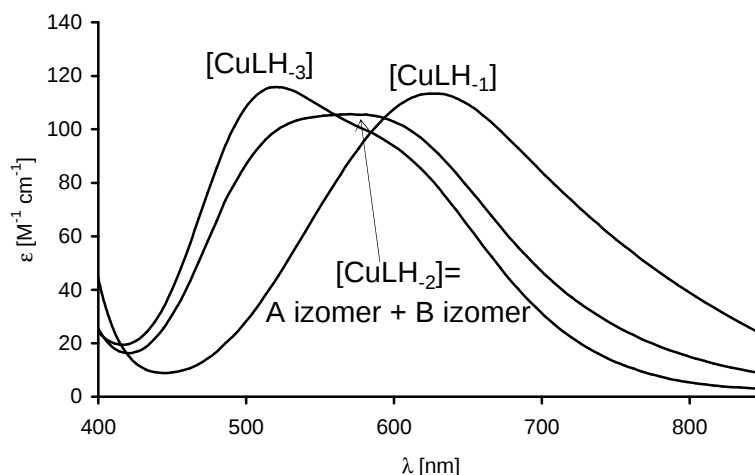
6. táblázat. A humán és a csirke prion proteint modellező peptidfragmensek réz(II)komplexeinek stabilitási állandóiból származtatott amid-deprotonálódásra vonatkozó pK értékek

Amidnitrogén deprotonálódásra vonatkozó pK	Tetrapeptid	
	ChPrP(Ac122-125NH ₂) Ac-PheLysHisVal-NH ₂	HuPrP(Ac109-112NH ₂) Ac-MetLysHisMet-NH ₂
pK_{-12}	5,93	5,64
pK_{-3}	8,52	8,96
	Nonapeptid	
	ChPrP(Ac119-127NH ₂):	HuPrP(Ac106-114NH ₂):
pK_{-12}	5,90	5,58
pK_{-3}	7,05	7,83

A 6. táblázatban a két nonapeptidre kapott értékek is fel vannak tüntetve összehasonlítás céljából, és azt láthatjuk, hogy ugyanaz a tendencia, amit a tetrapeptidek esetén figyeltünk meg, a nonapeptideknél is mutatkozik. Az irodalmi részben már említésre került, hogy a metionin-oldalláncokat illetően ellentmondásos adatokat találunk. Ezt eloszlatandó, eredményeink azt mutatják, hogy van tioéterkén koordinálódás (ellentétben a [146,147]-es számú közleményekkel), és kizárólag a Met(109)-hez tartozó (a [145]-ös közleményben feltételezettekkel szemben). Ezt a fentiekben leírtakkal kívánjuk alátámasztani, illetve azzal, hogy a paraméterek eléggé nagy hasonlóságot mutatnak a

nonapeptidek és az általunk vizsgált tetrapeptidek esetében ahhoz, hogy ugyanazt a kötőmódot feltételezzük. A nonapeptidek esetében, ahol lenne lehetőség az amidnitrogén C-terminus irányába történő deprotonálódására (van három egymást követő amidnitrogén) és a Met(112) koordinációra, nem ez az irány valósul meg, ezért kizárólag a Met(109) oldallánc koordinációját javasoljuk. Szintén ezt támasztja alá az a tény, hogy esetünkben a CT sáv intenzitása a $[\text{CuLH}_1]$ komplex koncentrációjának függvénye. Ez azt is jelenti, hogy a tioétercsoport koordinációja pH-függő, ugyanis a háromnitrogénes komplexben a negyedik koordinációs helyet elfoglalva, jelenléte a negyedik nitrogén kötődésétől függ, és ez utóbbi pH-függő folyamat. Az általunk vizsgált $\text{HuPrP}(\text{Ac109-112NH}_2)$ esetében a CT sáv intenzitása nagyobbak adódott, mint a nonapeptidnél ($\text{HuPrP}(\text{Ac106-114NH}_2)$). Ez alátámasztja azt a feltevést, mely szerint a tioétercsoport koordinálódása egy gyenge kölcsönhatás, és a háromnitrogénes komplex negyedik koordinációs helye a tioéterdonor által csak részben van elfoglalva. A nagyobb intenzitás arra utal, hogy a zárt és a nyitott szerkezetek aránya a tetrapeptid esetében nagyobb (a kisebb ligandumméret okánál fogva). Korábban hasonló következtetésekre jutottak egyéb metionintartalmú tripeptidek vizsgálatakor.^[180,181]

A pH növelésével egy újabb protontermelő folyamatot tapasztaltunk, amely mindegyik spektrális paraméter számottevő változásával jár (5. táblázat, 62. old.). Ezek újabb amid-deprotonálódásra utalnak (a deprotonálódásról már korábban szó esett a pK_3 értékek kapcsán). Az adott részecskéhez $[\text{CuLH}_2]$ sztöchiometria tartozik. Az ezt követő deprotonálódási lépcsőben a $[\text{CuLH}_3]$ komplex alakul ki, amelynél kizárólag a lizil protonált aminocsoportjának deprotonálódását vártuk, mely nem járna spektrális változással, tehát nagyon hasonló egyedi spektrumokat vártuk e két részecskére (ezt tapasztalták a nonapeptidek esetében). Ehhez képest a részecskék egyedi spektrumát kiszámolva mind az abszorpció, mind a CD spektrumoknál jelentős eltérést találunk a két egymást követő részecske spektrumában az $\text{Ac-MetLysHisMet-NH}_2$ ligandum esetén, valamint jóval kisebb eltérést az $\text{Ac-PheLysHisVal-NH}_2$ ligandum komplexeinél (33.,34. ábra). A nonapeptidektől való eltérés oka az, hogy a tetrapeptidek esetében az utolsó (harmadik) amidnitrogén, amely deprotonálódik, acetamidcsoportoz tartozó, mely jóval bázikusabb,^[5] mint egy átlagos peptid amidcsoportja (a nonapeptideknél ez deprotonálódik). Ezért van az, hogy a harmadik amidnitrogén deprotonálódása több mint egy log egységgel nagyobb pH-n megy végbe a tetrapeptidek esetében, mint a nonapeptidekében (6. táblázat). Ennek következményeként ezen amidnitrogén (acetamidcsoportoz tartozó) és a lizinaminocsoport deprotonálódási folyamatai

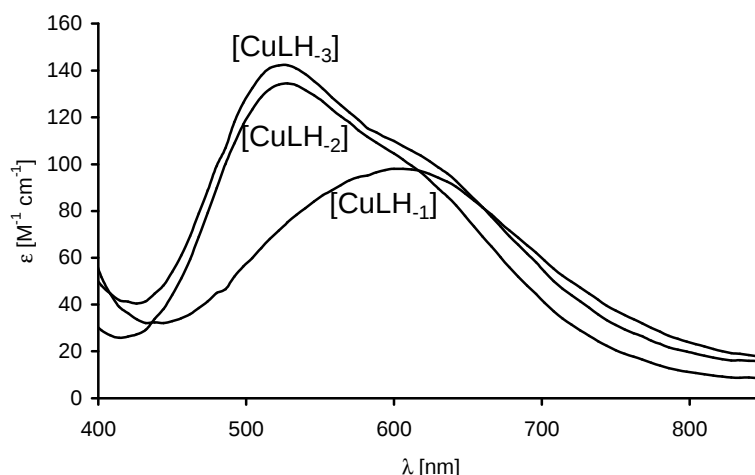


A $[\text{CuLH}_{-2}]$ koordinációs izomerei:

A izomer: 4N-es komplex protonált lizil- ϵ -aminocsoporttal, ezért spektruma a $[\text{CuLH}_{-3}]$ -hoz hasonló

B izomer: 3N-es komplex deprotonált lizil- ϵ -aminocsoporttal, ezért spektruma a $[\text{CuLH}_{-1}]$ -hez hasonló

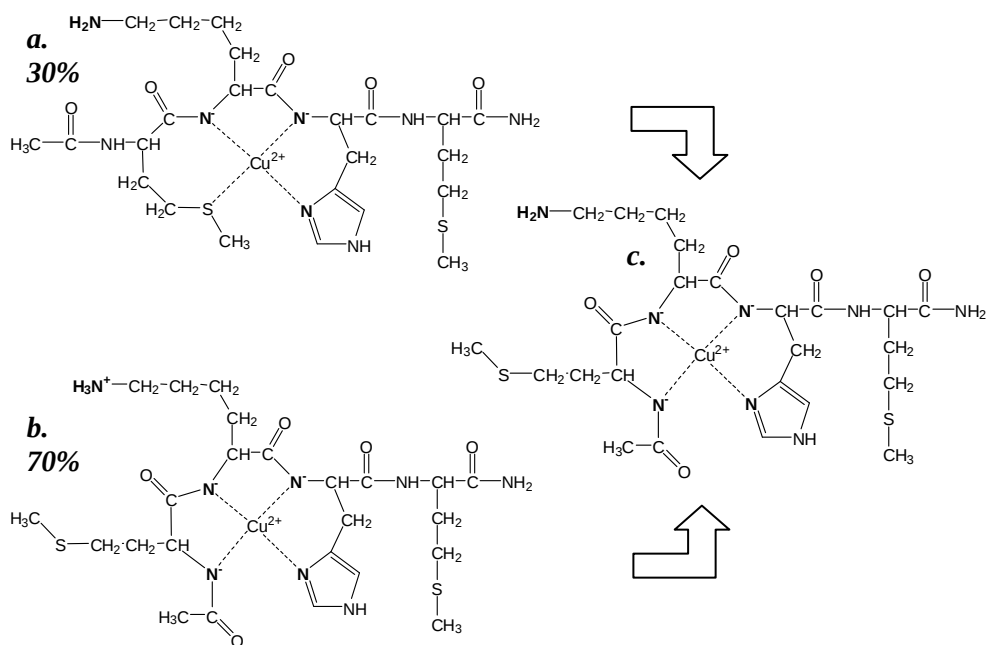
33. ábra. A Cu(II) – HuPrP(Ac109-112NH₂) (L: Ac-MKHM-NH₂) rendszer egyes komplexeinek moláris elektrongerjesztési abszorpciós spektrumai



34. ábra. A Cu(II) – ChPrP(Ac122-125NH₂) (L: Ac-FKHV-NH₂) rendszer egyes komplexeinek moláris elektrongerjesztési abszorpciós spektrumai

részben átfednek, így a $[\text{CuLH}_{-2}]$ összetételű részecske két izomert takar: (a) 3N-es komplex, melyben a lizin aminocsoportja deprotonálva van és (b) 4N-es komplex protonált lizinoldallánccal (35. ábra). Az átfedés jóval nagyobb mértékű a Ac-MetLysHisMet-NH₂ ligandum esetében, mivel a már említett tioéterkén

koordinálódása miatt a harmadik amidnitrogén deprotonálódása még jobban felcsúszik a nagyobb pH-k felé, ami viszont nincs meg Ac-PheLysHisVal-NH₂ ligandum komplexénél, ezért esetében jóval kisebb mértékű átfedésről van szó. Az elsőként említett ligandum mikrorészecskéinek mikroállandó-értékeit a 4. táblázat tartalmazza, számításukhoz a mikroállandókról szóló elméleti alapokat használtuk.^[182] A moláris (egyedi) elektrongerjesztési abszorpciós spektrumok alapján lehetőségünk volt kiszámolni a képződő izomerek arányát. A számolás elvi alapja az volt, hogy mivel a [CuLH₂] (a) izomerje 3N-es komplex, ezért abszorpciós spektrumának nagyon hasonlónak kell lennie a szintén 3N-es [CuLH₁] spektrumához (a különbség a lizinoldallánc protonáltsága), továbbá (b) izomerje 4N-es, ezért feltételezésünk szerint spektruma a szintén 4N-es [CuLH₃] komplexével egyezik nagymértékben. Ebből adódóan, jó közelítéssel ismerjük az izomerek egyedi spektrumait, ezeket a megfelelő arányban összeadva, megkaphatjuk a [CuLH₂]-re számított spektrumot (33. ábra). Ez az arány 30±5% és 70±5%-nak adódott (35. ábra) ($0,3[\text{CuLH}_1]_{\text{spektrum}} + 0,7[\text{CuLH}_3]_{\text{spektrum}} = [\text{CuLH}_2]_{\text{spektrum}}$). Mivel a másik ligandum esetén a deprotonálódási folyamatok csak kis mértékben fednek át, úgy véljük, a számolás viszonylag nagy hibája miatt az elveszíti értelmét.



35. ábra. A Cu(II) – HuPrP(Ac109-112NH₂) (L: Ac-MetLysHisMet-NH₂) rendszerben képződő [CuLH₂] komplex koordinációs izomereinek(a,b.) illetve a [CuLH₃] komplex (c.) szerkezetei

Mindemellett a nagyobb pH-n történő harmadik amidnitrogén deprotonálódás (nagyobb pK_3 értékek a nonapeptidekhez képest) bizonyítékul szolgált arra is, hogy a deprotonálódás valóban az N-terminus irányába halad.

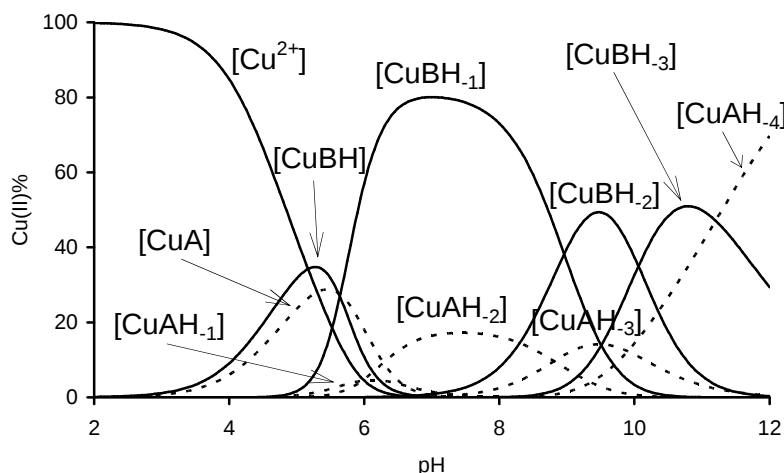
A nonapeptidek esetében azon részecskék képződésekor, melyekben csak a lizinoldallánc koordinálódását feltételezik, spektrális paramétereik (UV-Vis, ESR) változását nem tapasztaltak, ami alátámasztja azt a feltételezést, mely szerint azok nem koordinálódnak. További bizonyítékot szolgáltatnak erre az egyensúlyi adatok, ugyanis a szabad ligandum ($pK(\text{Lys})$) és a komplexek $pK(\text{Cu-Lys})$ értékei azt mutatják, hogy a deprotonálódás csaknem ugyanazon a pH értékeken zajlik. Esetünkben az izomerképződés miatt az értékek nem vethetők össze a nonapeptidekkel analóg módon. A nonapeptidekkel való nagy hasonlóság miatt feltételezhető, hogy a lizin aminocsoportjának deprotonálódása a tetrapeptidek esetében sem jár koordinálódással. Ezenkívül ennek közvetett bizonyítékául szolgál az, hogy az izomerarányt sikerült kiszámolni, amely azt feltételezte, hogy a 4N-es protonált Lys-t és a 4N deprotonált Lys-t tartalmazó komplexek spektrumai megegyeznek.

A 3N-es és 4N-es komplexek látható abszorpciós spektrumai eléggé szokatlanok. Ugyanis a 3N-es esetében az abszorpciós maximumok hullámhosszértékei kisebb energiának felelnek meg, mint azt a szokásos 3N-es komplexeknél korábban megfigyelték.^[183] Másrészt a 4N-esek esetében a spektrumalak nagyobb hullámhossz felőli részében minden esetben egy váll jelenik meg (33.,34. ábra, 67. old.). Ezen paraméterek a rézkomplexek térbeli szerkezetének torzulására utalnak.

A vizsgált rendszerek komplexeinek stabilitási állandóit meghatározva, lehetőségünk volt azok értékeit összevetni az octarepeat tartomány komplexeinek értékeivel. A 36. ábra egy olyan modell rendszert mutat be, mely mindkét ligandum, az egyik általunk vizsgált tetrapeptid és az octarepeat tartomány monomer egységének rézhez való affinitását hasonlítja össze. Az ábrából kiderül, hogy a tetrapeptid (His(111) kötőhelymodell) jóval erősebben köti a rézet, mint az octarepeat monomer. Ez a különbség leginkább a fiziológiás tartomány környékén a legjelentősebb.

Végül elmondható, hogy a nonapeptidek és az általunk vizsgált tetrapeptidek komplexképződési folyamatait összehasonlítva, a tetrapeptidek a fémmegkötőhely jó modelljeinek bizonyultak. Ami az amid-deprotonálódási értéket (nagyobb pK_3 , az acetamidcsoportból adódóan), illetve ennek és a Lys-oldallánc egyidejű jelenléte

következményeként esetlegesen fellépő izomerképződést illeti, a folyamat jól leírható, ezért szükség esetén figyelembe vehető. Ezenkívül ezek a kis modellek segítségül szolgálnak a nagyobb peptidekben megvalósuló deprotonálódás irányának az eldöntésében.



36. ábra. Az **A:** octarepeat monomer (Ac-PHG₃GGWGQ-NH₂ - - - -) és a **B:** HuPrP(Ac109-112NH₂) (Ac-MKHM-NH₂ —) réz(II)komplexei stabilitásának összehasonlítása ($C_{\text{Cu}^{2+}} = C_{\text{A}} = C_{\text{B}} = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

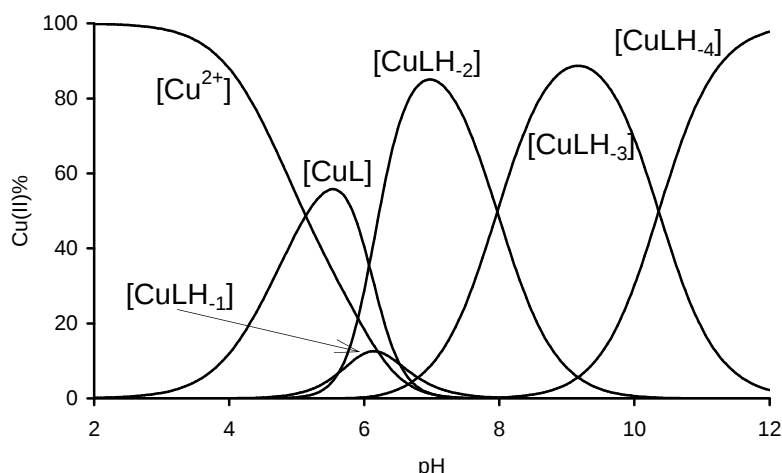
4.2.1.2. A Cu(II) – Ac-GTHS-NH₂ rendszer komplexképződési folyamatai

Azon megfontolások alapján, hogy az előző alfejezetben tárgyalt két tetrapeptid egyszerű és megbízható modelljének bizonyult a prion hisztidintartalmú fémkötőhelyének, a His(96) környékét szintén egy tetrapeptiddel kívántuk modellezni. A HuPrP(Ac94-97NH₂): Ac-GlyThrHisSer-NH₂ deprotonálódási illetve rézkomplexei stabilitási állandói az 7. táblázatban vannak feltüntetve.

7. táblázat. A HuPrP(Ac94-97NH₂): Ac-GlyThrHisSer-NH₂ peptid deprotonálódási állandója és réz(II)komplexei stabilitási állandói ($t=25^\circ\text{C}$, $I=0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KCl}$)

pK(His)	6,35(2)
Komplex	log β
[CuL]	3,94(5)
[CuLH ₁]	-2,59(12)
[CuLH ₂]	-8,21(5)
[CuLH ₃]	-16,18(6)
[CuLH ₄]	-26,54(5)

Ezen értékek alapján szerkesztett koncentrációeloszlási görbék a 37. ábrán láthatók.



37. ábra. A Cu(II) – HuPrP(Ac94-97NH₂) (L: Ac-GTHS-NH₂) rendszer komplexeinek koncentrációeloszlási görbéi ($C_{Cu^{2+}} = C_L = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

A ligandumnak csak egy protonálódási pontja van, mégpedig a hisztidin imidazolnitrogénje, ahogy azt a pK érték is mutatja. Az előző két ligandumhoz képest ez nem tartalmaz lizint, ám hisztidin pK -ikat (4. táblázat, 60. old.) összevetve az adott ligandumával megállapítható, hogy a lizinoldallánc nem befolyásolja számottevően a hisztidin protonálódási folyamatait. A komplexképződési folyamatok nagy hasonlóságot mutatnak mindhárom rendszerben, ezért a számos párhuzamvonás és összehasonlítás miatt érdemes lehet megjegyezni, hogy az ugyanazon koordinációs móddal rendelkező részecskék, sztöchiometriájukat tekintve eltérnek egymástól. Tehát a nem koordinálódó lizinoldallánc protonáltságát figyelembe véve egy protonnal többet tartalmaznak a már bemutatott ligandumok komplexei, pl. a lizintartalmú Ac-MetLysHisMet-NH₂ [CuLH] komplexe a Ac-GlyThrHisSer-NH₂ rendszer [CuL] komplexének felel meg. E részecske megjelenésével kezdődik a komplexképződési folyamat, mely pH 4 környékére tehető. A $\log K$ értékeket, melyek az imidazolnitrogén és a rézion kötődéséből keletkező komplex stabilitását jellemzik, összehasonlítva mindhárom ligandumra, megállapítható, hogy azok jó egyezésben vannak: 3,94 (Ac-GTHS-NH₂) (7. táblázat, 70. old.), 3,60 (Ac-FKHV-NH₂) és 3,70 (Ac-MKHM-NH₂) (4. táblázat, 60. old.), (a nem koordinálódó Lys amino pK -kat figyelembe véve). Mindemellett az ESR paraméterek is összhangban vannak (8. táblázat, 72. old., 5. táblázat, 62. old.).

8. táblázat. A prion proteint modellező HuPrP(94-97NH₂): Ac-GlyThrHisSer-NH₂ tetrapeptid réz(II)komplexeinek spektrális paraméterei.

Komplex	UV-Vis	CD	ESR
	$\lambda_{\max}(\epsilon)[\text{nm}(\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1})]$	$\lambda_{\max}(\Delta\epsilon)[\text{nm}(\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1})]$	$g_{\parallel}/A_{\parallel}$ (10^{-4}cm^{-1})
[CuL]	–	–	2,365/138
[CuH ₁ L]	–	–	2,290/168
[CuH ₂ L]	610(78)	611(-0,37)	2,240/176
		513(+0,31)	
		338(+0,44)	
		303(-0,24)	
		247(+6,30)	
[CuH ₃ L]	555(119)	590(-1,93)	2,201/210
		495(+1,36)	
		310(-1,36)	
		261(-0,38)	
		242(+0,91)	
[CuH ₄ L]	545(120)	587(-1,62)	2,205/199
		492(+0,72)	
		307(-0,92)	
		275(+0,11)	

Amint azt a két másik rendszer esetében is megfigyelhettük, úgy ebben is kooperatív amidnitrogén-deprotonálódás követi az egyfogú imidazol-koordinálódást. Ugyanis a [CuLH₁] komplex csekély mennyiségben képződik, illetve átfed a nagy koncentrációban jelenlévő [CuLH₂] komplex képződésével, így közel kooperatívnak mondható a két amidnitrogén deprotonálódása. Hasonló kooperativitásról számoltak be más hisztidintartalmú peptidkomplexek esetében,^[88,110] illetve a 4.1.1. fejezetben tárgyalt kéthisztidin-tartalmú tripeptidek esetében is ezt láthattuk, ezenkívül hasonlóan viselkednek az octarepeat tartományt modellező peptidek is.^[136,138] Ez a kooperativitás biológiai körülmények között lehet igazán fontos, ugyanis azt jelenti, hogy a pH kismértékű változása jelentős változást idéz elő a szabad illetve kötött rézionok arányában. Erre jó példa a sejtközi tér és a sejt belsejében meglévő pH különbség. A spektrális adatok alátámasztják az [N_{im}, N⁻, N⁻] donoratombok jelenlétét a réz koordinációs szférájában. Az UV-Vis spektrumokban a [CuLH₂] komplex abszorpciós maximuma a két másik ligandumával nagyon jól összhangban van (8. táblázat, 5. táblázat, 62. old.). Az ESR paraméterek az előző részecskékhez képest változást mutatnak, $g_{\parallel}$ esetében csökkenést és az $A_{\parallel}$ értéke növekedést, ami alátámasztja az

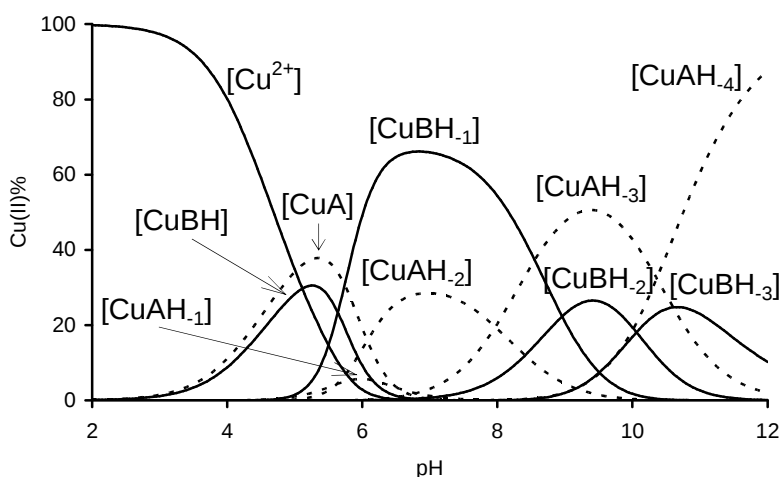
amidnitrogének koordinációját, ugyanakkor kicsivel eltérnek a két másik tetrapeptidétől. A CD spektrumokban a feltételezett amidkoordinációval párhuzamosan tapasztalunk Cotton-effektus-növekedést mind a d-d, mind a CT sávok megjelenésének hullámhossz-tartományában. Megfigyelhető, hogy táblázatban a d-d átmenetekhez tartozó sávok előjele pont ellentétes, mint azt az Ac-MKHM-NH₂ illetve Ac-FKHV-NH₂ ligandumokat tartalmazó rendszerek esetében láthattuk (5. táblázat, 62. old.). Ez az eltérés nem jelent koordinációs módbeli eltérést is egyaránt, ugyanis nemrégiben megfigyelték, hogy a His előtti második pozícióban lévő aminosav minősége befolyásolja számottevően ezt a hatást, miközben a vizsgált ligandumok komplexeiben a koordinációs mód azonos maradt. A szabály szerint a GXH peptid 4N komplexének CD spektrumában a kisebb hullámhossznál található d-d sáv előjele pozitív, míg nagyobb hullámhossznál negatív előjelű. Ha ebben a ligandumban a Gly-t egyéb aminosavra cseréljük (kivéve Pro), akkor a sávok előjele megváltozik.^[184]

9. táblázat. A humán és a csirke prion proteint modellező peptidfragmensek réz(II)komplexeinek stabilitási állandóiból származtatott amiddeprotonálódásra vonatkozó pK értékek

Amidnitrogén deprotonálódásra vonatkozó pK	HuPrP(Ac94-97NH ₂) Ac-GlyThrHisSer-NH ₂	ChPrP(Ac122-125NH ₂) Ac-PheLysHisVal-NH ₂	HuPrP(Ac109-112NH ₂) Ac-MetLysHisMet-NH ₂
pK ₋₁₂	6,08	5,93	5,64
pK ₋₃	7,97	8,52	8,96
log K (Cu + L)	3,94	3,60	3,70

Az első két amidnitrogén deprotonálódására vonatkozó átlagolt értékeket (pK₋₁₂) és a harmadik amiddeprotonálódást jellemző (pK₋₃) értékeket összevetve mindhárom ligandumra, megállapítható, hogy kis eltérés van közöttük (9. táblázat). A két amid koordinálódása a legkedvezményezettebb az Ac-MKHM-NH₂ esetében, a már tárgyalt Met(109) oldallánc koordinálódásának stabilizáló hatása következtében, így a harmadik amid deprotonálódása valamelyest gátolva van, ezt mutatja a legnagyobb pK₋₃ érték mindhárom közül. Az imidazol koordinációt követő két amid deprotonálódás (pK₋₁₂) kevésbé előnyös az Ac-GTHS-NH₂ esetében. Az azt követő harmadik amiddeprotonálódás mindhárom ligandum közül ebben megy végbe a legkisebb pH-n. Ebből adódóan a két amidnitrogénes komplex képződésének pH-tartománya az Ac-GTHS-NH₂ ligandum esetében a legszűkebb, azaz legkeskenyebb görbét láthatunk a koncentráció-eloszlásokban (37. ábra, 71. old., 28., 29. ábra, 61. old.). A harmadik amidnitrogén deprotonálódásával a

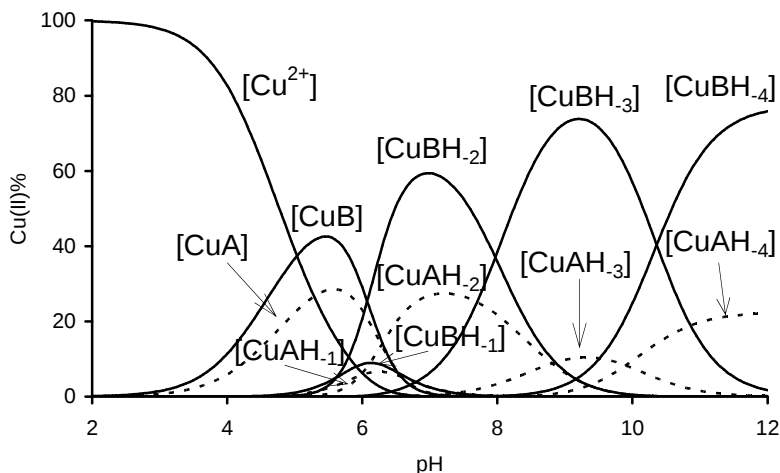
[CuLH₃] komplex képződik, melyben [N_{im}, N⁻, N⁻, N⁻] kötésmódot feltételezünk. Ezt az amiddeprotonálódást két eltolódás kíséri az abszorpciós spektrumokban ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 55 \text{ nm}$, 8. táblázat), ami kevesebb, mint amennyit a többi tetrapeptid harmadik amidnitrogénjének protonvesztésekor tapasztaltunk (5. táblázat, 62. old.), ám elegendő ahhoz, hogy amid-deprotonálódást feltételezhessünk.^[135] Ráadásul ez az abszorpciós maximum jó egyezésben van más glicintartalmú réz(II)komplexek paramétereivel (540-550 nm, míg esetünkben 555 nm), melyekben szintén az általunk feltételezett [N_{im}, N⁻, N⁻, N⁻] kötésmódot írták le.^[88,89] Az ESR paraméterek megfelelnek egy négynitrogénes kromofór paramétereinek.^[152] A CD spektrumokbeli eltérést az általunk vizsgált két másik tetrapeptid paramétereitől az optikailag inaktív Gly jelenlétével magyarázzuk, melynek amidnitrogénjéhez a rézion koordinálódik. A titrálási görbe alapján egy újabb deprotonálódási lépcső számítható. A [CuLH₄] sztöchiometriájú részecskéhez társítható spektrális paraméterek eltérnek a [CuLH₃] paramétereitől, ám ez az eltérés viszonylag kicsi ahhoz, hogy egy újabb amidnitrogén deprotonálódását feltételezzük. Az említett folyamathoz 10,36 pK érték tartozik, ami lehetőséget ad koordinált vízmolekula^[88] vagy a pirrol típusú nitrogén^[5] deprotonálódását feltételezni. A jelen adatok alapján nem áll módunkban eldönteni, melyik áll a háttérben.



38. ábra. Az A: HuPrP(Ac94-97NH₂) (Ac-GTHS-NH₂ - - -) és a B: HuPrP(Ac109-112NH₂) (Ac-MKHM-NH₂ —) réz(II)komplexeik stabilitásának összehasonlítása ($C_{\text{Cu}^{2+}} = C_{\text{A}} = C_{\text{B}} = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Ismerve a His(96) és a His(111) modellek fémmegkötő-képességét, stabilitási állandóikat összevethetjük, hogy kiderüljön melyiknek van nagyobb affinitása a réz(II)ionhoz. A 38. ábrából kiderül, hogy az Ac-MKHM-NH₂ erősebben köti azt

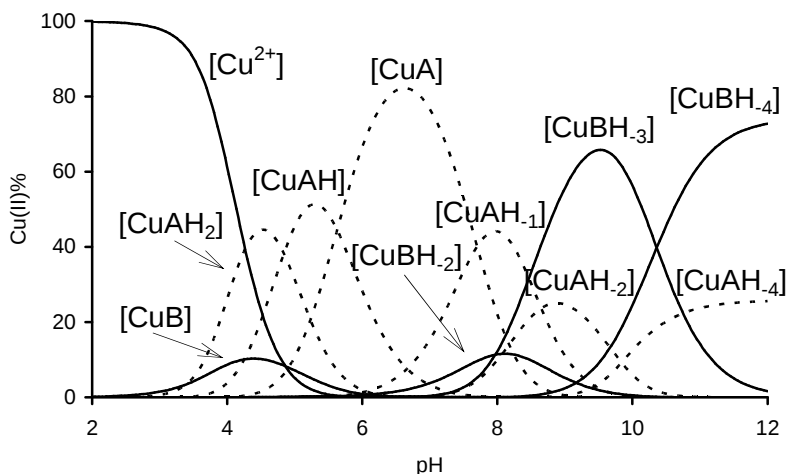
fiziológiás pH-n. Ennek a ligandumnak a fémmegkötő-képességét már összehasonlítottuk az octarepeat tartomány monomerével (36. ábra, 70. old.). Egy ilyen összehasonlítás látható az Ac-GTHS-NH₂ ligandumra és az octarepeat monomer egységre a 39. ábrán.



39. ábra. Az **A:** octarepeat monomer (Ac-PHGGGWGQ-NH₂ - - -) és a **B:** HuPrP(Ac94-97NH₂) (Ac-GTHS-NH₂ —) réz(II)komplexeik stabilitásának összehasonlítása ($C_{Cu^{2+}} = C_A = C_B = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Ebből az látszik, hogy a 96-os hisztidin környéke nagyobb affinitással rendelkezik a fémion felé, mint a prion N-terminusának az oktapeptidje. Ennek oka egyértelműen a deprotonálódás eltérő irányából adódóan az eltérő kelátgyűrűméretben keresendő. Ugyanis az octarepeat-ben a hisztidin előtti prolin meggátolja azt, hogy az amidnitrogének deprotonálódása a megszokott irányba haladjon. Ezért a C-terminus felé haladva a csatolt kelátrendszer (7,5,5)- tagú kelátokat tartalmaz, ez kisebb stabilitást biztosít a komplexnek, mint az octarepeat-en kívüli tartományok komplexeiben a (6,5,5)-tagú csatolt kelátrendszer. Az ábrából látszik, hogy kis pH-n, amíg a ligandum a hisztidin-oldalláncon keresztül csak egyfokúként koordinálódik a fémhez, nincs nagy különbség a fémmegkötőképességben, ám a kelátok kialakulása után ez a különbség egyre jelentősebb és a tetrapeptid válik kedvezményezetté. Ugyanakkor, ha egy olyan rendszert vizsgálunk, melyben a Cu(II), a tetrapeptid és az octarepeat monomer helyett az octarepeat tetramer vannak 1:1:1 arányban, azt látjuk, hogy ez a tendencia a visszajára fordul (40. ábra). Ez az irodalmi részben már említett kooperatív hatás miatt lehetséges. Tehát az octarepeat tartomány különálló hisztidinjeit szemlélve, megállapítható, hogy azok gyengébb fémmegkötőknek

bizonyultak, mint az azon kívüliek, ám a tartomány egészét vizsgálva, annak jóval nagyobb affinitása van a rézionhoz, mint az octarepeat-en kívül eső hisztidintartalmú modelleknek.



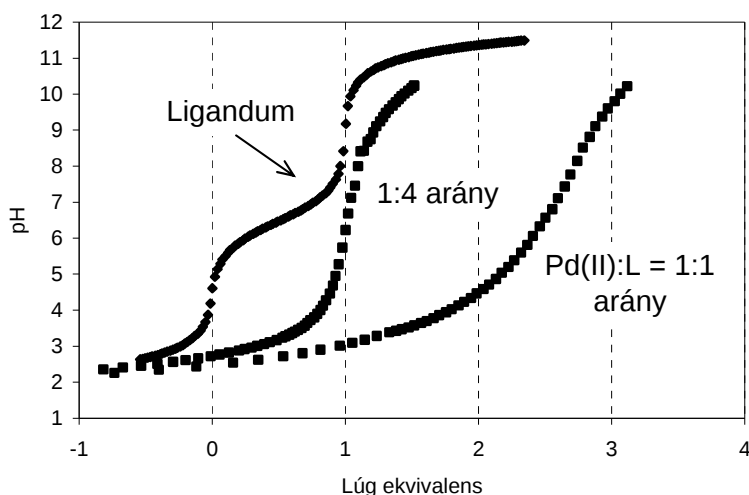
40. ábra. Az A: octarepeat tetramer ($\text{Ac}-(\text{PHGGGWGQ})_4\text{-NH}_2$ - - -) és a B: HuPrP(Ac94-97NH₂) (Ac-GTHS-NH_2 —) réz(II)komplexei stabilitásának összehasonlítása ($C_{\text{Cu}^{2+}} = C_A = C_B = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

4.2.2. A vizsgált ligandumok palládium(II)ionnal való kölcsönhatásai

Az irodalmi előzmények is azt mutatják, hogy a Pd(II) – peptid kölcsönhatás nagyon összetett. Ez különösen abban az esetben érvényes, amikor a peptid metionin, illetve hisztidin aminosavakat tartalmaz. Ez utóbbi esetében a lehetséges koordinációs módok sokasága is jelzi az adott rendszer bonyolultságát: (i) imidazol-N(1)-N(3) kötési izomerek^[185] alakulhatnak ki; (ii) az amidcsoportok nitrogénjeinek deprotonálódása mind az N-, mind a C-terminus irányába megindulhat; (iii) Pd(II)–N(3) koordináció következtében indukált imidazol-N(1)H deprotonálódás is létrejöhet, mely által két- illetve többmagvú di/polimerkomplexek képződhetnek (az imidazolgyűrű hídligandumként viselkedik); (iiii) ugyanazon palládiumionhoz több imidazolnitrogén egyidejű koordinálódása is mevalósulhat. Mindezek az NMR jelek különbözőségét eredményezik, ezért méréseinket a legegyszerűbb modell, az Ac-His-NHMe vizsgálatával kezdtük, azt remélve, hogy segítségünkre lehet a nagyobb priomodellek spektrumainak kiértékelésében.

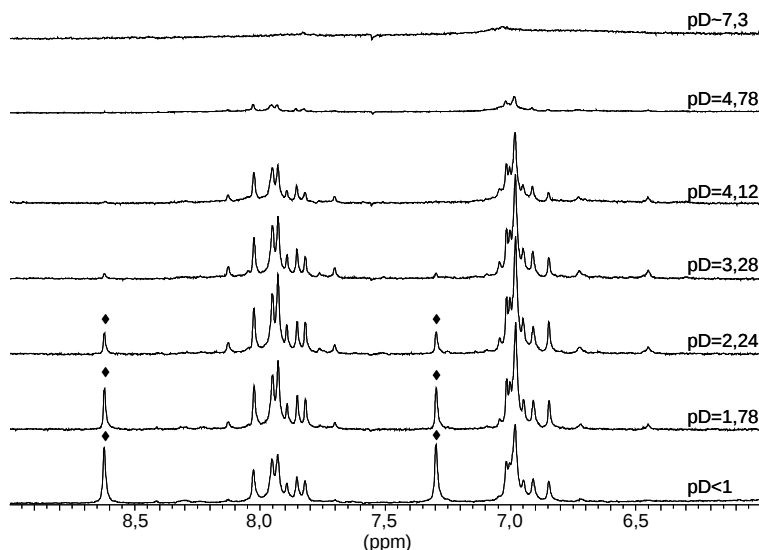
4.2.2.1. A Pd(II) – Ac-His-NHMe rendszer komplexképződési folyamatai

A ligandum szerkezeti képlete a 18.h. ábrán (37. old.) szerepel. Látható, hogy az acetil-hisztidil-metilamid egy fehérjevázhban kötött hisztidin legegyszerűbb modellje, azonban meg kell említenünk, hogy az amidcsoportok kémiai karaktere valamivel bázikusabb, mint a szokásos peptidcsoportoké.^[5] A palládium esetében ez nem okoz nagy különbséget, mivel közismert az amidnitrogénekhez való nagy affinitása, melyek deprotonálódását már erősen savas közegben képes indukálni. Ezen egyszerű ligandum vizsgálatát kezdetben azért szerettük volna megvalósítani, hogy információt kapjunk arról, milyen változásokon mennek keresztül a ¹H NMR jelek komplexképződés következtében, azonban a rendszer bonyolultabbnak bizonyult, mint ahogy azt eredetileg elképzeltük. Vizsgálatainkat 1:1, 1:2 és 1:4 fém/ligandum arányú mintákkal végeztük. A 41. ábrán a pH-potenciometriás titrálási görbéket láthatjuk,



41. ábra. A Pd(II) – Ac-His-NHMe rendszer titrálási görbéi ($C_L = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

ebből is megállapítható, hogy az 1:1 aránynál felvett görbe nem egyensúlyi folyamatot takar, ilyen jellegű görbét kaptunk 1:2 arány esetében is. Mindkét esetben a pH instabilitását figyeltük meg, a komplexek lassú képződési kinetikával jellemezhetők. 1:1 aránynál csapadékképződést (pH ~ 4), míg 1:2 aránynál a minta habzását figyeltük meg, ami szintén rosszul oldódó részecskék jelenlétére utal. A pD-függő NMR spektrumok elemzése azt mutatja, hogy már igen savas pH-n megindul a komplexképződés, mivel a szabad ligandum jelei mellett már ott vannak a komplexek jelei is (42. ábra).



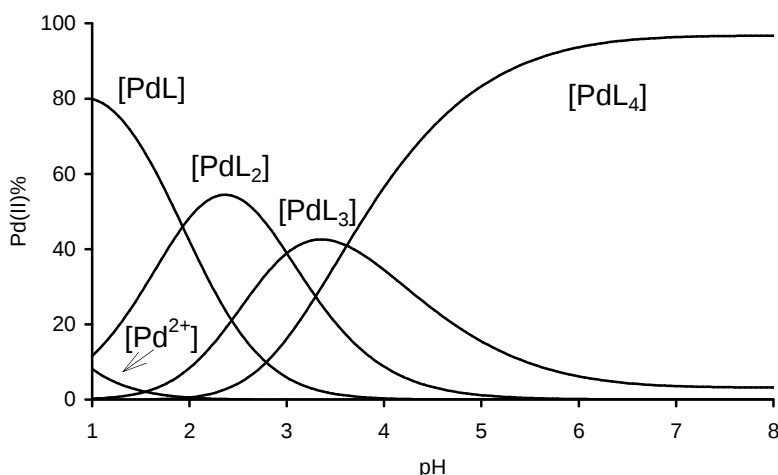
♦ a protonált szabad ligandum C(2)H és C(5)H protonok jelei
42. ábra. A Pd(II) – Ac-His-NHMe rendszer pD-függő ^1H NMR spektrumai: aromás tartomány ($C_{\text{Pd}^{2+}} = 2,0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $C_{\text{L}} = 2,1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Az 1:2 aránynál felvett spektrumokban azon jelek mellett, amelyek 1:1 aránynál is ott vannak, megjelennek még egyéb rezonanciacsúcsok is, ami újabb komplexek képződésére utal. A pH növelésével a szabad ligandum jelei eltűnnek, ám a komplex jelei nem, míg nagyobb pH-n (pD 5-6) ez utóbbiak is kezdenek ellaposodni, és végül eltűnnek (ezt figyeltük meg az Pd(II) – Ac-MKHM-NH₂ rendszer aromás tartományában is). Az alifás tartomány jelei felhasadnak, ez nagyobb mértékben az 1:2 aránynál valósul meg. Az aromás tartományban megjelenő jelek sokaságából, a mindkét terminuson kialakított metilcsoportokhoz tartozó protonok jeleinek felhasadásából, valamint a jelek ellaposodásából és eltűnéséből arra következtettünk, hogy a korábban felsorolt lehetséges koordinációs módok közül (76. old.) nagy valószínűséggel mindegyik megvalósul. Az imidazol-N(1)H deprotonálódás következtében létrejövő többmagvú polimerkomplexek képződése magyarázatot ad a csapadék megjelenésére. Próbálkozásaink ellenére nem sikerült az egy-egy adott koordinációs módhoz hozzárendelni egy-egy jelet vagy jelcsoportot.

Ehhez képest az 1:4 arány viszonylag egyszerűnek és 8 pH-ig jól kiértékelhetőnek mondható. A rendszert jellemző állandók a 10. táblázatban vannak összefoglalva és a komplexek eloszlása a 43. ábrán látható.

10. táblázat. Az Ac-His-NHMe deprotonálódási állandója és palládium(II)komplexei stabilitási állandói ($t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I=0,2\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{ KCl}$)

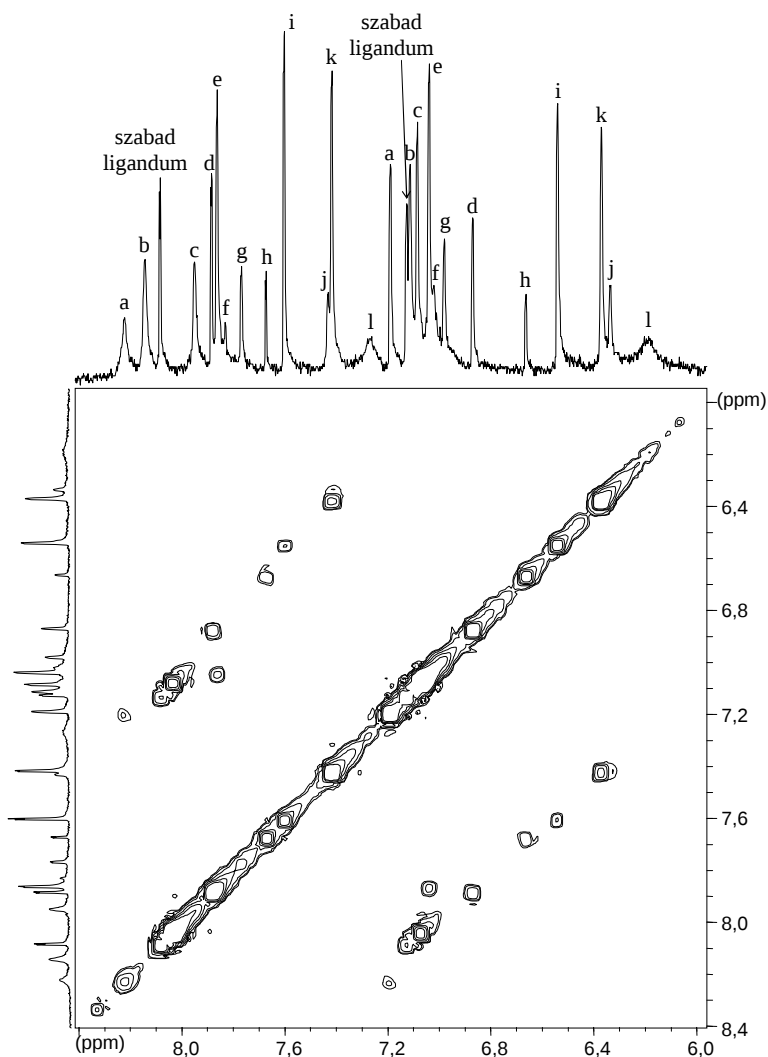
pK(His)	6,48(2)
Komplex	log β
[PdL]	9,0(5)
[PdL ₂]	16,17(6)
[PdL ₃]	22,52(7)
[PdL ₄]	28,49(5)



43. ábra. A Pd(II) – Ac-His-NHMe rendszer komplexeinek koncentrációeloszlási görbéi ($C_{\text{Pd}^{2+}} = 1 \times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $C_L = 4 \times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)

A komplexképződési folyamat a $[\text{PdL}_n]$ típusú komplexek egymást követő kialakulásával írható le. Az eloszlásgörbékéből látszik, hogy pH 2-re gyakorlatilag nincs szabad palládium a rendszerben, azaz már komplexben kötött. Az elsőként kialakuló komplex, a $[\text{PdL}]$ képződése igen savas tartományba esik, emiatt a meghatározott stabilitási állandó értéke kissé bizonytalan. Ezért a táblázatban látható érték helyett helyesebb, ha $\log \beta_1 \geq 9,0$ -et értünk, miközben a lépcsőzetes állandók ($\log K_2$ stb.) értékei, illetve a koncentrációeloszlás is pontosak. Érdeemes kiemelni, hogy ez az eloszlás akkor érvényes, ha legalább négyszeres ligandumfelesleget alkalmazunk. A pD-függő NMR spektrumok elemzése alátámasztja a potenciometria alapján meghatározott modellt. Érdekesség, hogy a 6-8 pH között az aromás tartományban, ahol kizárólag a $[\text{PdL}_4]$ komplex jeleit várjuk, 24 komplexjelet találunk (44. ábra, az ábra felső részén látható az $1D\text{ }^1\text{H}$ NMR spektrum). Figyelembe véve, hogy az imidazolgyűrű mind az N(1), mind az N(3) donoratomjain keresztül képes koordinálódni,^[185] ezek a $[\text{PdL}_4]$

komplex hat koordinációs izomeréhez tartoznak: (1111), (3333), (1333), (1113), *cis*(1133) és *trans*(1133).

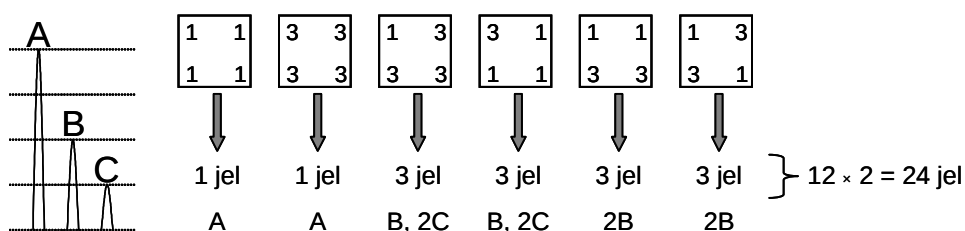


44. ábra. A Pd(II) – Ac-His-NHMe rendszer COSY spektruma 6,4 pD-n illetve a hozzátartozó 1D ^1H NMR spektrum: aromás tartomány ($C_{\text{Pd}^{2+}} = 4,9 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $C_{\text{L}} = 2,7 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Azt alátámasztandó, hogy a megjelenő jelsokaság valóban koordinációs izomerek képződéséhez rendelhető, felvettük az 1-Metil-1H-imidazol és a 4-Metil-1H-imidazol pD-függő NMR spektrumait. A 18.l. és 18.m. ábrán (37. old.) láthatók a ligandumok képletei. A 4-Metil-1H-imidazol esetében, hasonlóan az Ac-His-NHMe ligandumhoz lehetőség van koordinációs izomerek kialakulására.

Viszont az 1-Metil-1H-imidazolban az egyik nitrogéndonor blokkolva van egy metilcsoporttal, ami meggátolja az izomerképződést. Valóban, ez utóbbi esetben tízszeres ligandumfelesleg mellett (a hidrolízis visszaszorítása miatt) egyetlen komplexhez tartozó három rezonanciacsúcsot találunk az izomerek képződésének pH tartományában, melyek a ligandum három CH csoportjának protonjaitól származnak, míg a másik ligandum esetében megjelennek a koordinációs izomerekhez tartozó jelek.

Visszatérve az Ac-His-NHMe rendszerhez, egy-egy izomerhez tartozó NMR jelek száma és intenzitása is eltérő. Az 45. ábra vázlatosan mutatja be, mely komplexeiktől hány jel származik.



45. ábra. A Pd(II) –Ac-His-NHMe rendszer PdL_4 komplexeinek izomereihez tartozó 1H NMR jelek száma és elméletileg várt intenzitása (A, B vagy C az egyforma kémiai környezetben lévő protonok száma alapján)

Mind a C(2)H, mind a C(5)H protonokhoz 12-12 jel tartozik. Ezen jelpárokat, nevezetesen az ugyanazon ligandumhoz tartozó C(2)H és C(5)H protonok rezonanciajeleit sikerült beazonosítanunk 2D NMR technikák segítségével: normál COSY valamint fázisérzékeny DQF-COSY (double-quantum filtered correlation spectroscopy) méréseket végeztünk, a 44. ábrán az egyik ilyen kétdimenziós spektrum látható. A 2D COSY spektrum fölötti 1D spektrumon betűjellel vannak jelölve a párok. Ezek után szerettük volna az ugyanazon izomerhez tartozó jel/jelcsoportok azonosítását is megvalósítani. Ehhez egy számolást végeztünk, melyben figyelembe vettük az adott komplexben jelenlévő N(1), illetve N(3) nitrogének összetalálkozásának valószínűségét, illetve egy-egy komplexhez tartozó jelek elméleti intenzitását (egyforma kémiai környezetben lévő protonok számát). A számolás azt mutatta, hogy elméletileg 8 pár szimpla intenzitású és 4 pár dupla intenzitású jelet várunk. A spektrumot nézve, aligha mondható el, hogy kétféle intenzitású rezonanciacsúcsokat látunk. Ez azt jelenti, hogy az izomerek eloszlása nem a statisztikusnak felel meg, azáltal, hogy kémiai preferenciák (egy-egy ligandum palládiumhoz való koordinálódása után különböző elektroneloszlást eredményez) valamint szterikus tényezők is beleszólnak az izomerek

képződésébe.^[67] Mindezt figyelembe véve csak annyi feltételezhető, hogy a nagy intenzitású jelek közül egy pár az (1113) komplexhez (az izomer három jele közül a legnagyobb intenzitású), és egy pár a (1333)-hoz (az izomer három jele közül a legnagyobb intenzitású) tartozik. NOE (Nuclear Overhauser Effect) differencia NMR technika alkalmazásával is próbáltunk információt nyerni az egy komplexhez tartozó jelekről, ám a ligandum túlságosan kis méretűnek bizonyult ahhoz, hogy e módszer segítségével érdemleges információhoz jussunk.

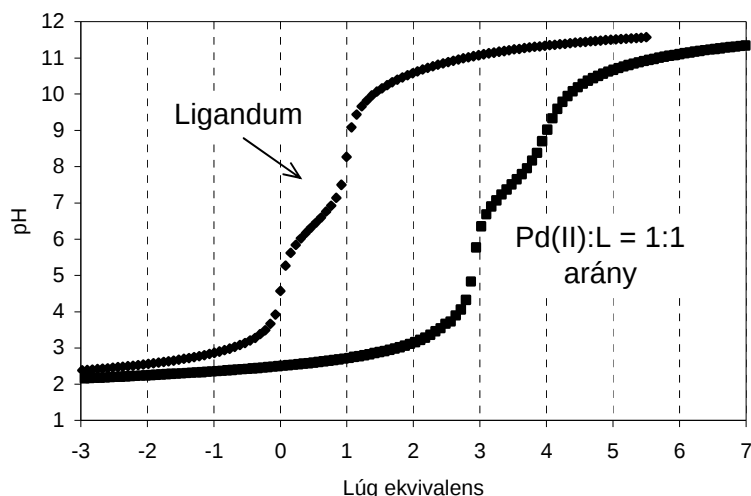
Összegzőként elmondható, hogy négyszeres ligandumfelesleg alatti aránynál a Pd(II) – Ac-His-NHMe rendszerben a komplexképződési folyamatok lassú kinetikával és rosszul oldódó részecskék képződésével jellemezhetők. Ebben az esetben a ligandum egyfogú koordinálódása az N(1)/N(3) donoratomokon keresztül nem telíti a központi fémion koordinációs szféráját, ezért a palládium többféle úton „próbálja” ezt elérni. Az egyik ilyen az amidnitrogének deprotonálódása mind az N-, mind a C-terminus irányába. A másik – a pirrol típusú nitrogén deprotonálódása, mely két- illetve többmagvú polimerrészecskék képződését eredményezi, ami nagyobb koncentrációknál csapadékképződést eredményez. Ezenkívül a palládium hidrolízishez való jelentős hajlama miatt nem zárható ki a vegyes-hidroxokomplexek képződése sem. Nagy ligandumfelesleg mellett (legalább négyszeres) az imidazolnitrogének keresztüli koordináció telíti a fémion koordinációs szféráját, így a komplexképződés viszonylag egyszerűnek mondható.

A bemutatott palládiumos rendszer alapján, levonható néhány előzetes következtetés a prion proteinnel és modelljeivel kapcsolatban is. A $[PdL_n]$ típusú komplexek képződése gyakorlatilag kizárható a peptidferagmensek és méginkább a prion esetében, ugyanis a sztérikus tényezők megakadályozzák négy nagyméretű peptid ugyanazon fémionhoz való egyidejű koordinálódását. Ebből adódóan az imidazolnitrogénhez való koordinálódás után a fémion az amidnitrogének deprotonálódását segítheti elő, ám pH-tól és fém/ligandum aránytól függően előidézheti a pirrol csoport deprotonálódását, mi több a lágy karakterű donorcsoportok a peptid oldalláncaiban tovább növelhetik a lehetséges komplexek képződésének változatosságát. Ezért a továbbiakban csak a két egyhisztidin-tartalmú tetrapeptid kölcsönhatását vizsgáltuk a palládiumionnal.

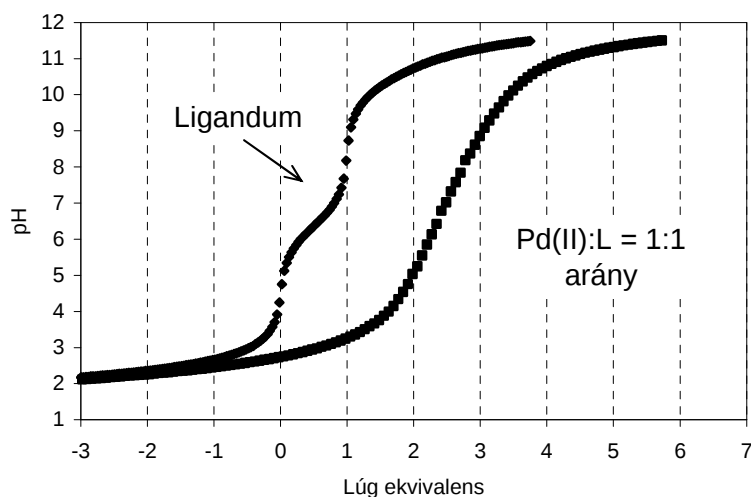
4.2.2.2. A Pd(II) – Ac-FKHV-NH₂ rendszer komplexképződési folyamatai

Az egyik előző fejezettel ellentétben, melyben az Ac-PheLysHisVal-NH₂ (ChPrP(Ac122-125NH₂)) és az Ac-MetLysHisMet-NH₂ (HuPrP(Ac109-112NH₂))

rézkomplex-képződési folyamatait együtt tárgyaltuk, palládium-komplexeiket külön-külön mutatjuk be, mivel ebben az esetben jelentős különbség mutatkozik a két rendszer között. A 46.,47. ábrán a két rendszer titrálási görbéje látható, melyek összehasonlítása már első ránézésre is alátámasztja a fent említetteket.

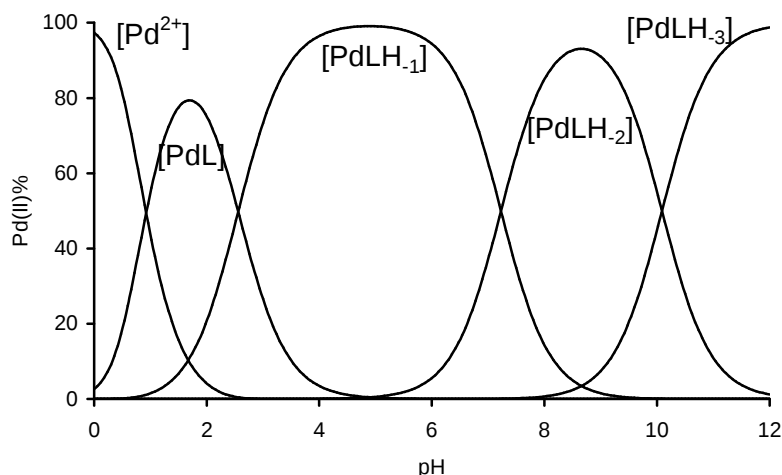


46. ábra. A Pd(II) – ChPrP(Ac122-125NH₂) (L: Ac-FKHV-NH₂) rendszer titrálási görbéi
($C_{\text{Pd}^{2+}} = C_L = 1,7 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)



47. ábra. A Pd(II) – HuPrP(Ac109-112NH₂) (L: Ac-MKHM-NH₂) rendszer titrálási görbéi
($C_{\text{Pd}^{2+}} = C_L = 2,7 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

A 46. ábra, illetve a rendszer komplexeinek eloszlását bemutató 48. ábra valamelyest emlékeztet a rézzel kapott görbére illetve koncentrációeloszlásra, ám azzal a különbséggel, hogy a palládium esetében a komplexképződés már jóval

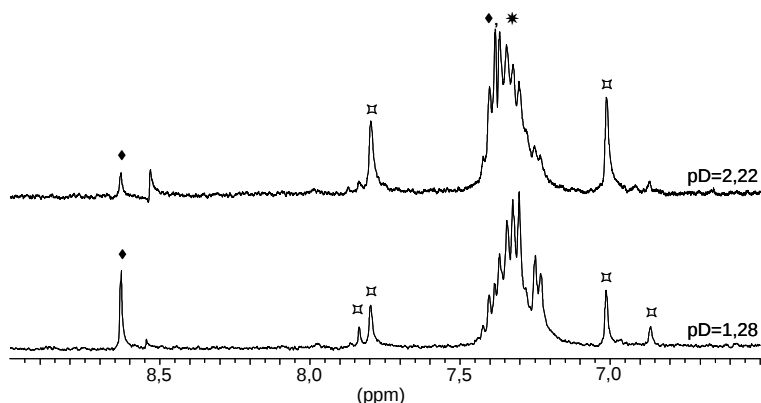


48. ábra. A Pd(II) – ChPrP(Ac122-125NH₂) (L: Ac-FKHV-NH₂) rendszer komplexek koncentrációeloszlási görbéi ($C_{\text{Pd}^{2+}} = C_L = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

11. táblázat. A ChPrP(Ac122-125NH₂): Ac-PheLysHisVal-NH₂ peptid deprotonálódási állandói és palládium(II)komplexei stabilitási állandói ($t=25^\circ\text{C}$, $I=0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KCl}$)

pK(His)	6,29(3)
pK(Lys)	10,28(2)
Komplex	log β
[PdL]	17,42(8)
[PdLH ₁]	14,86(9)
[PdLH ₂]	7,63(9)
[PdLH ₃]	-2,46(12)

savasabb pH-n megkezdődik, és komplexei termodinamikai stabilitása jóval nagyobb értéket mutatnak (11. táblázat, réz(II)-re: 4. táblázat, 60. old.). A rendszer pD-függő NMR spektrumai azt mutatják, hogy a lizin aminocsoportja, a szabad ligandummal hasonló módon deprotonálódik, ami alátámasztja azt a feltevésünket, mely szerint az nem vesz részt a koordinációban, csakúgy, ahogy azt a réz esetében is tapasztaltuk. Ezenkívül az NMR spektrumok bizonyítéku szolgálnak arra is, hogy a komplexképződés már igen savas pH-n megindul. A 49. ábrából látható, hogy már 1,28 pD-n a szabad ligandum imidazol-gyűrűjéhez tartozó C(2)H és C(5)H jelek mellett már ott vannak a komplexek jelei is. A koncentrációeloszlás szerint ezen a pH-n már a [PdL] komplex van jelen illetve a [PdLH₁] képződése is megindul (48. ábra). Feltételezésünk szerint a két komplexhez tartozó koordinációs mód a következő: [N_{im}, N⁻], illetve [N_{im}, N⁻, N⁻], és a nagyobb intenzitású jelpár rendelhető hozzájuk(⌘). A kis intenzitású jelpár (⌘), amely nagyobb pD-n eltűnik, nagy valószínűséggel az egyfogú imidazol-koordinációval jellemezhető [PdLH]

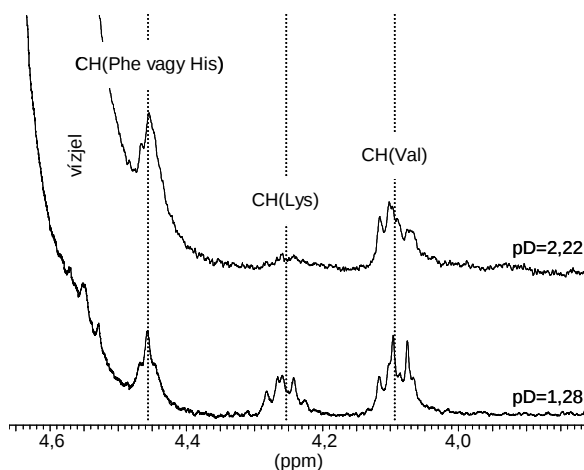


- ◆ a protonált szabad ligandum C(2)H és C(5)H protonok jelei
- * a Phe 5 aromás CH protonjának jelei
- ◻ a komplexek jelei

49. ábra. A Pd(II) – ChPrP(Ac122-125NH₂) (L: Ac-FKHV-NH₂) rendszer pD-függő ¹H NMR spektrumai: aromás tartomány ($C_{\text{Pd}^{2+}} = 1,8 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $C_L = 1,9 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

komplex, amelyet nem ábrázol a koncentrációeloszlás, mivel képződése olyannyira savas tartományban van, hogy a pH-metria alkalmatlan stabilitási állandójának meghatározására. A His alifás CH protonjának jelei a vízjel “lábánál” helyezkednek el, mivel nem lehet biztonsággal megállapítani, hogy az ábrán látható jelek Phe CH vagy a His CH-hoz tartoznak, ezért nehéz az első amidnitrogén deprotonálódására bizonyítékot nyerni. A második amidnitrogén deprotonálódására a Lys CH (α szénatom) protonjai érzékenyek, a két feltüntetett spektrumon (50. ábra) e jelek számottevő változáson mennek keresztül, nevezetesen a CH_{Lys} jelek jelentősen ellaposodnak, míg a mellette lévő CH_{Val} jelek nem, ebből az amidnitrogén koordinációjára lehet következtetni. Ez egyidejűleg azt is alátámasztja, hogy a deprotonálódás valóban az N-terminus irányába halad, nagyobb pD-n sem tűnnek el a CH_{Val} jelei. E komplexben megvalósuló koordinációs mód nagyon hasonló a rézkomplex esetében bemutatotthoz (32.b. ábra, 64. oldal). Az aromás tartományban 2,22 pD-re a szabad ligandum jelei gyakorlatilag eltűnnek (a kis jel a kismértékű ligandumfeleslegből (6%) fakadhat). Ez azt jelenti, hogy e pH fölött a komplexekben az imidazolnitrogén koordinálva van, és egyben azt is jelenti, hogy e pH fölött történő következő deprotonálódási folyamat (pH 7 körül) nem származhat az imidazolgyűrű piridinnitrogénjétől, azaz amidnitrogén deprotonálódás feltételezhető. Ezáltal a $[\text{PdLH}_2]$ összetételű részecske képződik, melyben a kötésmód $[\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-]$. Ezt követően a $[\text{PdLH}_3]$ komplex alakul ki, melyben azonos koordinációs módot

találunk az előzőhöz, a két részecske a lizin ε -aminocsoportja protonáltságát tekintve különbözik egymástól. Ugyanezen koordinációs módok kialakulását tapasztaltuk a réz(II)komplexek esetében is, azzal a különbséggel, hogy a palládium esetében nem történik kooperatív amidnitrogén deprotonálódás, és ahogy az már említésre került, az azonos koordinációjú részecskék képződése a rézkomplexekhez viszonyítva jóval savasabb pH-n megy végbe. A palládium(II)ion amidnitrogénhez való nagymértékű affinitását már korábban is leírták,^[66,69] ám a vizsgált ligandumok sok esetben az erős horgonydonor tulajdonsággal rendelkező terminális aminocsoportot tartalmazták. Az esetünkben kapott eredmények azt mutatják, hogy aminocsoport hiányában is hatékony horgonynak bizonyult a hisztidinoldallác imidazolnitrogénje a palládium számára, ezáltal az képes volt indukálni az amidnitrogének deprotonálódását.



50. ábra. A Pd(II) – ChPrP(Ac122-125NH₂) (L: Ac-FKHV-NH₂) rendszer pD-függő ¹H NMR spektrumai: alifás tartomány ($C_{Pd^{2+}} = 1,8 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $C_L = 1,9 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

4.2.2.3. A Pd(II) – Ac-MKHM-NH₂ rendszer komplexképződési folyamatai

A rendszerre kapott titrálási görbéből is látszik (47. ábra, 83. old.), hogy a komplexképződés ebben az esetben nem egyensúlyi folyamat, ezenkívül pH 9 fölött (1:1 arány) csapadékképződés volt tapasztalható. Ez a görbe nagyon emlékeztet a Pd(II) – Ac-His-NHMe rendszer 1:1 arányú titrálási görbéjére (41. ábra, 77. old.). Így a rendszer termodinamikai paramétereinek meghatározása nem valósulhatott meg. A komplexek képződési kinetikája lassúnak mondható, ezt más rendszerekben is megfigyelték már.^[66] Esetünkben az egyensúly beállta egy-

egy pontban napokban mérhető, de mivel a palládium(II) a legaktívabb katalizátora a peptidkötés hasításának, így ez ráépülhet a komplexképződési folyamatra. Azt is leírták már, hogy a palládium nagy affinitással rendelkezik a tioéterkén felé, és koordinációja a fémhez a pH-tól független.^[186] Ezzel összhangban, esetünkben az elsődleges horgony a palládiumion számára a tioétercsoport. A Pd – S kötés már erősen savas közegben kialakul (pH 2 alatt), ám a pH növelése a Pd – N_{im} és a Pd – N⁻ kötések kialakulását eredményezi. Korábbi termodinamikai és kinetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a Pd – N kötést tartalmazó részecskék nagy termodinamikai stabilitással rendelkeznek, viszont jóval lassabban képződnek, mint a Pd – S kötést tartalmazó részecskék.^[67] Ebből következik, hogy viszonylag hosszú életű (metastabilis) intermedierek képződnek a 2 – 10 pH tartományban, ami meg is mutatkozik a pH instabilitásában, valamint a ¹H NMR jelek jelentős szélesedésében. Ráadásul az NMR jelek kiértékelését az is nehezítette, hogy a töményebb minta (a potenciometriás méréshez képest) következményeként a csapadék megjelenését már kisebb pH-n tapasztaltuk (koncentrációtól függően pH 4 és 7 között). Érdekes azonban megemlíteni, hogy a mérések során tapasztalt pH instabilitás nem a ligandum bomlásából ered, ennek bizonyítéka, hogy a minták visszavasanyítása a kiindulási spektrumot eredményezi. A lassú képződési kinetika és a csapadékképződés valószínűleg a palládiumkomplexek a pH növelésével végbemenő szerkezeti átrendeződéséből fakad. Nevezetesen az imidazol- és amidnitrogének fokozatosan kiszorítják a tioéterket az eredeti komplexből, ami lassú folyamat, mindemellett a hisztidin oldallánca képes hídként viselkedni a koordinatív telítetlen komplexek között, így egy másik komplex központi ionjához is koordinálódva, rosszul oldódó többmagvú polimerkomplexek képződését eredményezi.^[187] A fentiekben leírtakat alátámasztandó, az aromás tartomány C(2)H és C(5)H szabad ligandum jelei 3,5 pD-re eltűnnek, ami megerősíti, hogy az imidazolnitrogén koordinálva van e pD fölött. Mindemellett a tioétercsoport koordinációjára érzékeny S – CH₃ metil protonjainak jele már igen savas pH-n sem egyezik a szabad ligandum esetén felvett jellel (a koordináció miatt átfedésbe kerül a CH₃ (Ac) és a CH₂ (Met) protonok jeleivel). Nagyobb pH-n (3,5 pD körül), ezek különválnak, és megkapjuk a szabad ligandumra jellemző CH₃(Met) jelet, ami alátámasztja fentiekben leírtakat, miszerint a nitrogéndonorok kiszorítják a tioéterkén-donort a palládium koordinációs szférájából.

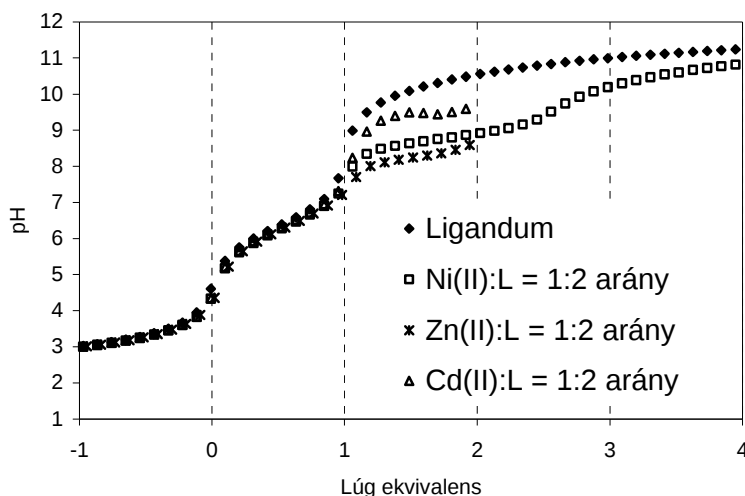
A palládiumos rendszerek vizsgálatából és az irodalomból már ismert adatokat egybevéve, levonható néhány általános következtetés: (i) A palládium(II) – peptid rendszerek esetén a teljes egyensúlyi illetve szerkezeti jellemzés akkor látszik

kivitelezhetőnek, ha csak egyetlen koordinálódó oldalláncot tartalmaz a ligandum (az Ac-FK₂HV-NH₂ hisztidinjéé, illetve az irodalomból már ismert oligoglicinek esetében a terminális aminocsoport); (ii) a palládiumnak van a peptidek irányába a legnagyobb affinitása és ez a prion fragmenseire is igaz; (iii) a prionfragmensek már erősen savas pH-n megkötik a palládiumot ($\text{pH} \leq 2$). Az elsődleges kötőhely vagy a His (N(1)/N(3)) vagy még inkább a Met tioétercsoportja. Ezek indukálják a környező amidnitrogének koordinációját, de a konkrét folyamat a szekvenciától és a palládiumkomplex szabad koordinációs helyeinek számától is függ; (iiii) a pH növelésével szerkezeti átrendeződések játszódnak le, amelyek időskálája változó és akár a ligandumbomlással is egybeeshet.

A Pd(II) – prionmodellek kölcsönhatás további vizsgálata nem látszik indokoltnak, ugyanis: egyrészt nem alkalmas modell a rezes illetve cinkes rendszerek jellemzésére (eltérő a hisztidinhez és a tioéterhez való affinitásuk), másrészt a palládium nem létfontosságú és ritka elem, ezért nincs közvetlen biológiai szerepe. A kölcsönhatás erőssége azonban jelzi más toxikus nehézfémek (platinafémek, higany) erős kölcsönhatását a prion fehérjékkel (egyéb fehérjékkel is), és ez lehet ezen fémionok toxicitásának elsődleges oka.

4.2.3. A tetrapeptid-prionmodellek egyéb fémionokkal (Ni(II), Zn(II), Cd(II), Co(II), Mn(II)) való kölcsönhatása

Mindamellet, hogy a réznek tulajdonítanak kiemelkedő szerepet a prion proteinnel kapcsolatosan, az irodalmi adatok azt mutatják, hogy egyéb fémionok (pl. Zn(II), Mn(II)) is összefüggésbe hozhatók a proteinnel, illetve kóros konformációjának kialakulásával. A rézzel is vizsgált tetrapeptidek ezen fémekkel való kölcsönhatásait tanulmányoztuk, illetve néhány újabb fémmel bővítettük a kört (*részletesebben lásd 34, 59 old.*). E fémekre vonatkozó irodalmi részt áttekintve, látható, hogy ezekkel való vizsgálatokat javarészt csak szabad terminusú peptidekkel végeztek és két horgony jelenléte mellett sem valósul meg mindig az amidnitrogének deprotonálódása. Ez arra enged következtetni, hogy a vizsgált peptidek és a fémek közötti kölcsönhatás túlnyomórészt imidazol-koordinációval lesz leírható. Összehasonlítás miatt az Ac-His-NHMe kölcsönhatását is megvizsgáltuk e fémionokkal, mivel az imidazolnitrogénhez való egyfogú koordinálódáshoz ez a ligandum a legmegfelelőbb modell. Ugyanis tartalmaz amidszerű csoportokat mindkét terminuson, ám azok deprotonálódása kevésbé kedvezményezett a peptidcsoportokhoz képest. A M(II) – Ac-FK₂HV-NH₂ rendszerek titrálási görbéi az 51. ábrán láthatók.



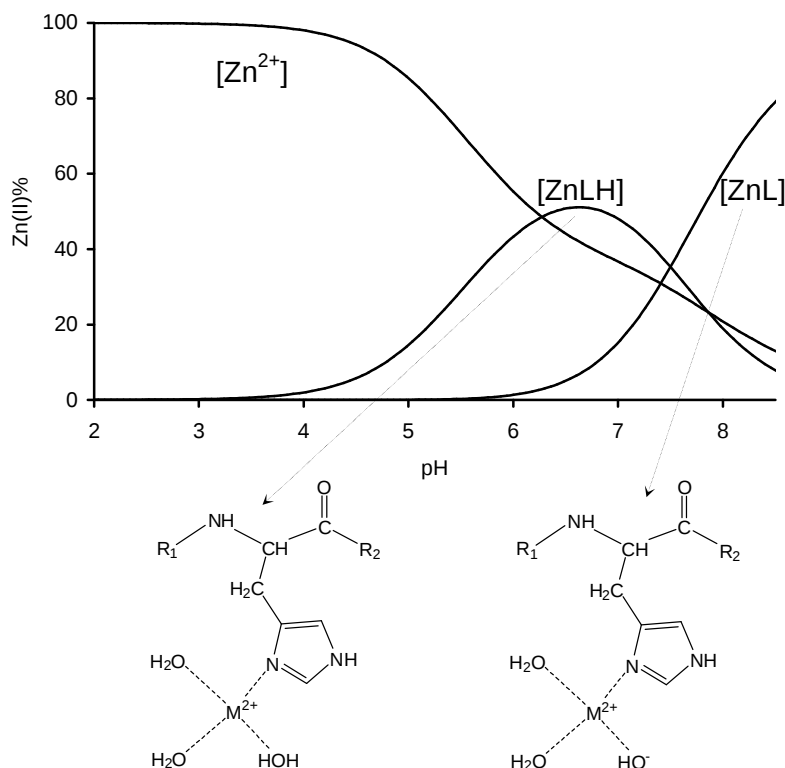
51. ábra. A ChPrP(Ac122-125NH₂) (L: Ac-FKHV-NH₂) Zn(II)-vel, Ni(II)-vel, Cd(II)-vel alkotott rendszerek titrálási görbéi ($C_{M^{2+}} = 1,2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $C_L = 2,4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

A Mn(II) és a Co(II) kölcsönhatását csak az Ac-GTHS-NH₂ ligandummal vizsgáltuk, mivel kötődésük a legkisebb értéket mutatta. Titrálási görbéik nagyon hasonlóak a kadmiuméhoz. A rendszerek kiértékeléséből nyert stabilitási állandók értékei a 12. táblázatban vannak összefoglalva. Mindegyik rendszer titrálási görbéjén egy töréspontot láthatunk pH 7,5 - 9 között. Ezek az adott fémhidroxid csapadék kiválásához rendelkeznek. A táblázatban szereplő állandók értékeinek számolásához a csapadékképződést megelőző adatpontokat használtuk. Már a titrálási görbék is mutatják, hogy e fémionok kölcsönhatása a tetrapeptidekkel jóval gyengébb a palládium és a réz esetében tapasztaltaktól. Az is látszik, hogy nincs vagy elhanyagolható mértékű a komplexképződés az imidazol deprotonálódásának tartományában (pH < 6). A táblázatban feltüntetett $\log K (M + N_{im})$ értékek hasonlósága arra utal, hogy a komplexekben megvalósuló koordinációs mód minden esetben ugyanaz, mégpedig a ligandum egyfogú kötődése az imidazolnitrogénen keresztül (52. ábra). Megjegyzendő, hogy messze nem teljes a komplexképződés, a komplex mellett szabad fémiont is találunk nem kis mennyiségben. A képződő komplexek összetételbeli különbségei abból erednek, hogy a Lys-t tartalmazó tetrapeptidekben annak oldalláncbeli ε-aminocsoportja protonálva van ($pK = 10,2$) és nem vesz részt a koordinációban, így ezen ligandumok komplexei egy protonnal többet tartalmaznak.

12. táblázat. A human és csirke prion proteint modellező tetrapeptidek illetve Ac-His–NHMe átmenetifém-komplexeinek stabilitási állandói (t=25 °C, I=0,2 mol·dm⁻³ KCl/KNO₃).

Komplex	ChPrP(Ac122-125NH ₂) Ac-PheLysHisVal-NH ₂	HuPrP(Ac109-112NH ₂) Ac-MetLysHisMet-NH ₂	HuPrP(Ac94-97NH ₂) Ac-GlyThrHisSer-NH ₂	Ac-His–NHMe
[ZnLH]	13,29(6)	12,99(7)	*	–
[ZnL]	5,79(8)	5,47(14)		2,51(2)
[ZnLH ₋₁]	–	–		-5,77(3)
log K(Zn + N _{im})	3,01	2,71		2,15
pK(ZnL)	7,50	7,52		7,92
[NiLH]	13,20(6)	13,09(5)		
[NiL]	5,43(12)	5,08(9)	2,82(5)	2,48(8)
[NiLH ₋₁]	–	–	–	-6,54(4)
log K(Ni + N _{im})	2,92	2,81	2,82	2,48
pK(NiL)	7,77	8,01	–	9,02
[CdLH]	12,92(9)	12,71(3)	*	
[CdL]	4,53(13)	4,20(9)		2,22(5)
[CdLH ₋₁]	–	–		-7,09(2)
log K(Cd + N _{im})	2,64	2,43		2,22
pK(CdL)	8,39	8,51		9,31
[CoL]	*	*	2,41(5)	*
[CoLH ₋₁]			-5,95(5)	
log K(Co + N _{im})			2,41	
pK(CoL)			8,36	
[MnL]	*	*	2,05(7)	*
[MnLH ₋₁]			-7,16(10)	
log K(Mn + N _{im})			2,05	
pK(MnL)			9,21	

* az adott rendszerre vonatkozólag nem történtek mérések



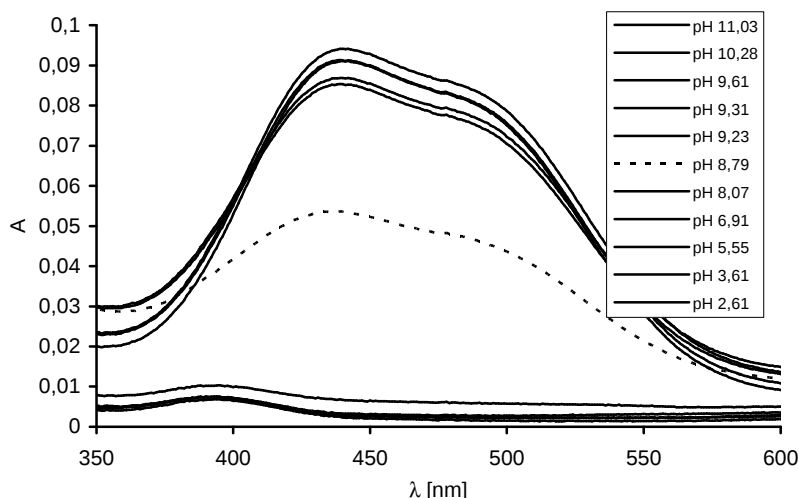
52. ábra. A Zn(II) – ChPrP(Ac122-125NH₂) (L: Ac-FKHV-NH₂) rendszer komplexekének koncentrációeloszlási görbéi ($C_{\text{Zn}^{2+}} = C_L = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), illetve szerkezetei

Annak ellenére, hogy a stabilitási állandók értékei nagyon hasonlóak, a kismértékű eltérés alapján azért levonható néhány következtetés. Az értékek alapján a fémkomplexek stabilitása a következő sorrendet követi: $\text{Ni(II)} \geq \text{Zn(II)} > \text{Cd(II)} \sim \text{Co(II)} > \text{Mn(II)}$. Az is megfigyelhető, hogy a tetrapeptidok valamivel erősebben kötik a fémionokat, mint a kis méretű Ac-His-NHMe. Ez valószínűleg a tetrapeptidok esetében a több karbonilcsoport stabilizáló hatására vezethető vissza, mindamellett, hogy hidrofób illetve egyéb másodlagos kölcsönhatások is hatással vannak a stabilitási állandók értékeire. A HuPrP(Ac109-112NH₂) és a ChPrP(Ac122-125NH₂) fragmensek fémkomplexei stabilitási állandóinak különbségei túlságosan kicsik ahhoz, hogy kötésmódbeli különbségre következtessünk, ám a kicsivel nagyobb érték a csirke fragmens esetében kizárja a tioéterkén koordinációjának lehetőségét a humán tetrapeptid esetében.

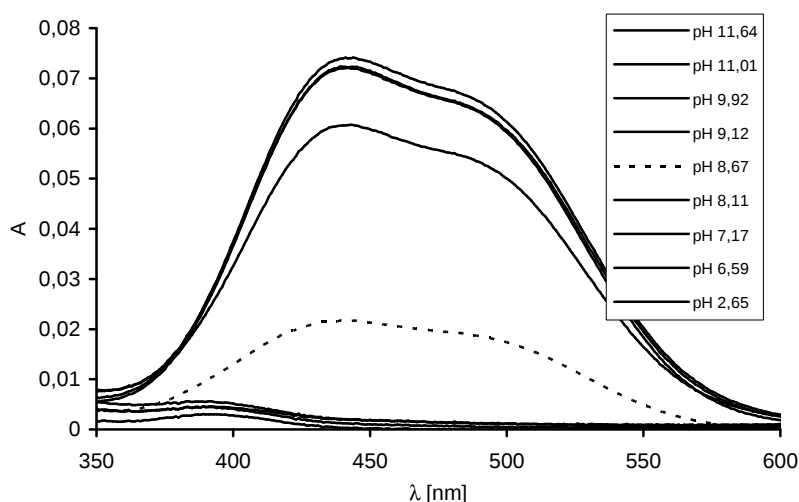
Terminális aminocsoport távollétében tehát nem meglepő a komplexek kis stabilitása. Az irodalomban találunk utalást arra, hogy egy imidazol-oldallánc nem elegendő horgony, két vagy annál több horgony szükséges a cinkion stabil megkötéséhez.^[76,179]

Az egyetlen számottevő különbség az öt fémion komplexképződési folyamataiban az, hogy a nikkell – tetrapeptid rendszerek esetében lúgosabb tartományban (pH 8,5 fölött) megindul a nikkell(II)hidroxid csapadék visszaoldódása. Ezzel együtt a rendszer spektrális paraméterei is megváltoznak. Teljes mértékű visszaoldódást még jóval lúgosabb tartományban sem sikerült elérni. Így egyensúlyi állandókat nem tudtunk meghatározni a rendszerre. Az oldat narancssárga színe arra utal, hogy megindul az amidnitrogének deprotonálódása, melyek kiszorítják a hidroxidionokat a nikkell koordinációs szférájából. A CD spektrumokban Cotton-effektus növekedést tapasztalunk 8,5 pH fölött. Az UV-Vis spektrumban abszorpciós sáv jelenik meg, melynek abszorpciós maximuma 430-440 nm-re tehető (rendszerrel függően), a spektrumalakban egy vállat láthatunk 500 nm környékén található $\lambda_{\max}$ értékkel. Ezek a paraméterek a síknégyzetes térbeli szerkezetű diamágneses tulajdonságú nikkellkomplexekre jellemzőek, és az irodalomban mások is leírták képződésüket.^[5,6] Mindemellett ezek az adatok jó egyezésben vannak a prion protein nagyobb fragmenseire kapott eredményekkel,^[155] ezekben szintén kimutatták a nikkell diamágneses komplexeinek képződését, és mivel hasonló koordinációs mód alakul ki, mint a réznél, így arról számolnak be, hogy a nikkell felhasználható a réz prionhoz való kapcsolódásának mélyebb megismerésére, kihasználva a komplexek diamágneses tulajdonságát (pl. NMR mérések).

92



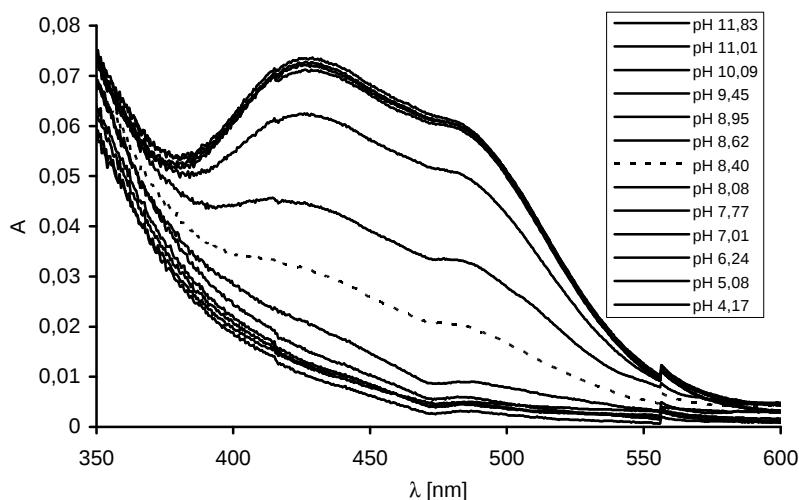
53. ábra. A Ni(II) – ChPrP(Ac122-125NH₂) (L: Ac-FKHV-NH₂) rendszer elektrongerjesztési abszorpciós spektrumai ($C_{\text{Ni}^{2+}} = C_L = 0,9 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)



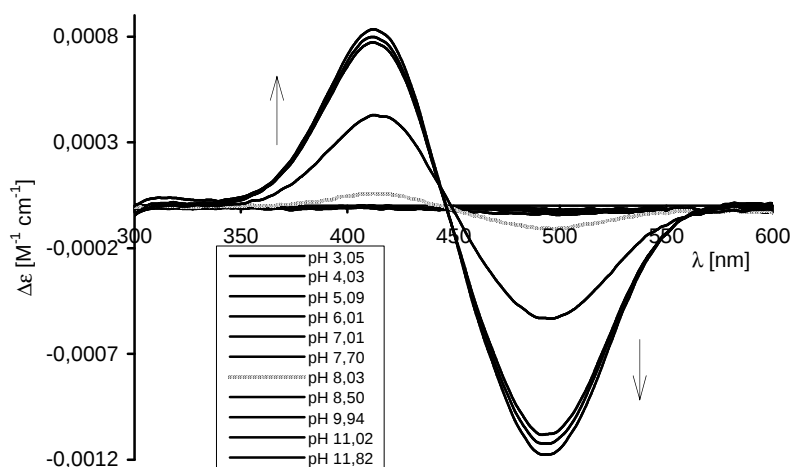
54. ábra. A Ni(II) – ChPrP(Ac122-125NH₂) (L: Ac-FKHV-NH₂) rendszer elektrongerjesztési abszorpciós spektrumai ($C_{\text{Ni}^{2+}} = 0,6 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $C_L = 1,1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

A következő próbálkozásunk nagyobb méretű és többhisztidin-tartalmú ligandum alkalmazása volt. A tetrapeptidek és a kisebb méretű Ac-His-NHMe fémmegkötő-képességének összehasonlításából kiderült, hogy a nagyobb méretű molekula nagyobb stabilitást biztosít a komplexnek (igaz, egy bizonyos méretnél már nem). Ezenkívül az eredmények első fejezetében a két- illetve háromhisztidin-tartalmú komplexek összehasonlításából kiderült, hogy a többhisztidines komplex

nagyobb stabilitású. Külföldi tanulmányutam (Wroclaw, Lengyelország) során volt rá lehetőségem, hogy a 24 aminosavat tartalmazó Ac-QGGGTHSQWNKPSKKPKTNMKHMAG-NH₂ prionfragmens nikkellel komplexeit tanulmányozzam. Ez a ligandum mindkét korábban vizsgált humán tetrapeptidet, tehát a His(96)- és a His(111)-et is magában foglalja és a PrP(91-114) tartományát modellezi. Mind a spektrofotometriás (55. ábra), mind a CD mérések (56. ábra),



55. ábra. A Ni(II) – HuPrP(Ac91-114NH₂) rendszer elektrongerjesztési abszorpciós spektrumai ($C_{\text{Ni}^{2+}} = 3,9 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $C_L = 4,6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)



56. ábra. A Ni(II) – HuPrP(Ac91-114NH₂) rendszer CD spektrumai ($C_{\text{Ni}^{2+}} = 3,9 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $C_L = 4,6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

alátámasztották a síknégyszetes komplex képződését. A számolások során kapott állandók valamint az illesztés nagy hibája azonban arra utalnak, hogy százszázalékosan még sem sikerült visszaszorítani a hidrolízist.

A jelen prionfragmensekről szóló fejezetet áttekintve, összevethetők a különböző átmenetifémekkel alkotott tetrapeptidkomplexek stabilitásai. Ezek alapján a fémek a prionmodellekhez való affinitásukat tekintve három csoportra oszthatók. A legnagyobb stabilitású komplexeket a palládium(II)ion alkotja a vizsgált tetrapeptidekkel. Míg a HuPrP His(111) modell esetében ezekben a nagy stabilitású komplexekben a metioninoldallánc elsődleges koordinálódása miatt az amidnitrogénekre való átrendeződés rendkívül lassú, addig a fragmens csirkében megtalálható analógja esetében azok az imidazol és az amidnitrogének szukcesszív deprotonálódásával és koordinálódásával alakulnak ki. Külön sorolhatók a réz(II)ion komplexei. Esetükben szintén nagy stabilitású komplexek képződnek, és bár kisebb stabilitásúak, mint a palládiumkomplexek, élettani vonatkozásban mégis a réz(II)komplexeknek van nagyobb jelentősége. A fiziológiás pH-ra kialakuló koordinációs mód az $[N_{im}, N^-, N^-]$, a metionintartalmú humán fragmens esetében emellett sikerült kimutatni a Met(109) tioétercsoportjának a koordinációját is, mely valamelyest megnöveli a komplex stabilitását. Ennek a koordinációnak biológiai környezetben lehetséges védő hatást tulajdonítanak a káros rézionkatalizált oxidációval szemben, mely a protein hasadásához vezet.^[188,189] A humán fragmensek stabilitásainak összehasonlításából kiderült, hogy a His(111) környéke kicsivel erősebben köti a réziont, mint a His(96). Ezenkívül élettani vonatkozása lehet annak is, hogy az első két amidnitrogén deprotonálódása kooperatív módon megy végbe, mivel a pH kismértékű változása a szabad és a kötött rézionok arányában jelentős változást eredményez. A harmadik csoportot a cink(II)-, a nikkel(II)-, a kobalt(II)-, a mangán(II)- és a kadmium(II)ionok alkotják abból a szempontból, hogy jóval kisebb stabilitású komplexeket alkotnak a prionfragmensekkel, ezekben az imidazolgyűrű egyfogú kötődése valósul meg és a komplexképződés csak a szabad ligandum imidazol-nitrogénjének deprotonálódási tartományában kezdődik. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az irodalomban nagy hangsúlyt kapott mangánindukált prionkonformáció-változás nem ugyanazon mechanizmus szerint zajlik, mint a réz esetében, azaz a hisztidinoldallánc jelenléte nem elégséges a mangán megkötéséhez.

Egy másik megközelítés szerint három fémiont emelhetünk ki. A vizsgált fémionok közül csak a palládium(II)-, a réz(II)- és a nikkel(II)ionok esetében tapasztaltunk amidnitrogénekhez való koordinálódást az imidazolnitrogén mellett. Míg az elsőként említett Pd(II)- és Cu(II)ionok körében ez a folyamat már savas

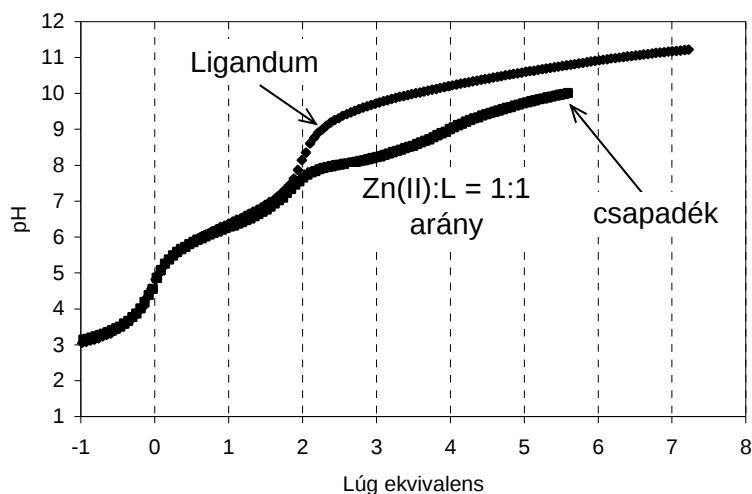
pH-n megindul, addig a Ni(II) esetében csak erősen lúgos pH-n kerül rá sor. Ezért a nikkal nem igazán alkalmas a rézion folyamatainak modellezésére.

Végezetül, ezek alapján elmondható, hogy a palládiumnak és a réznek van a legnagyobb affinitása a tanulmányozott prionfragmensekhez. Élettani jelentősége a rézionnak lévén, a kis peptidfragmensek is alátámasztják a réz kiemelt szerepét a prionnal szemben. Érdekes azonban megemlíteni, hogy a kis peptidfragmensek vizsgálatából nyert információk nem minden esetben vonatkoztathatók a nagy protein egészére.

A felsorolt fémionok közül külön említést érdemel a cink. Komplexei stabilitása ugyan kicsi, de a fémion koncentrációja az élő szervezetben nagyságrendekkel nagyobb, mint bármely más fémioné, így a nagyobb koncentráció és több hisztidin jelenléte már számottevő kölcsönhatást eredményezhet.

4.2.4. Nagytagszámú prionmodellek cink(II)ionnal való kölcsönhatása

Korábban volt róla szó, hogy az irodalomban találunk utalást arra, miszerint több mint egy imidazolhorgony szükséges a cinkion stabilis megkötéséhez.^[76,179] Az általunk vizsgált nagy ligandumok megfelelnek ennek a kritériumnak. Ugyanis az egyik a HuPrP(84-114) tartományának megfelelő aminosav-sorrendet tartalmazza, így három hisztidint is magában foglal: His(85), His(96), His(111). A másik kettő az előbbinek kéthisztidin-tartalmú mutánsai: HuPrP(Ac84-114NH₂)His(85)Ala, azaz a His(96)- és a His(111)-t tartalmazza, és HuPrP(Ac84-114NH₂)His(111)Ala, azaz a His(85)- és a His(96)-t tartalmazza. A három rendszer titrálási görbéi ránézésre nagyon hasonlóak, az egyik ilyen az 57. ábrán látható. Már ebből is látszik, hogy a többhisztidines nagy peptidek sem rendelkeznek nagy affinitással a cinkion felé. Ez egyezésben van a kisebb méretű prionmodellek vizsgálatakor nyert eredményekkel, melyek szerint a cinkion csak gyengén koordinálódik az említett ligandumokhoz. Az ábrán látható rendszerben (1:1 arány) csapadékképződést csak pH 10 környékén tapasztaltunk, ami meglepő volt ahhoz képest, hogy a másik két rendszer esetében (HuPrP(Ac84-114NH₂), HuPrP(Ac84-114NH₂)His(85)Ala) már pH 7,5 fölött megjelent a csapadék, ami vélhetően cink(II)-hidroxid. Ez okból az elsőként említett rendszer állandóinak számolásához szélesebb tartományt használtunk, ami azt eredményezi, hogy a táblázatban több részecske állandója szerepel a HuPrP(Ac84-114NH₂)His(111)Ala oszlopában. A ligandumok protonálódási állandóinak értékei és a cink(II)komplexek stabilitási állandói a 13. táblázatban vannak feltüntetve.



57. ábra. A Zn(II) – HuPrP(Ac84-114NH₂)His(111)Ala rendszer titrálási görbéi ($C_{\text{Zn}^{2+}} = C_L = 1,5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

13. táblázat. Nagyméretű prionmodellek protonálódási állandói és cink(II)komplexeik stabilitási állandói ($t=25^\circ\text{C}$, $I=0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KCl}$)

Részecske	PrP(84–114)His111Ala	PrP(84–114)His85Ala	PrP(84–114)
[LH]	10,66(2)	10,65(6)	10,68(3)
[LH ₂]	20,96(2)	21,06(2)	20,96(1)
[LH ₃]	30,95(2)	31,04(2)	30,94(1)
[LH ₄]	40,30(3)	40,35(2)	40,22(1)
[LH ₅]	46,97(3)	46,94(2)	46,99(1)
[LH ₆]	52,85(2)	52,72(2)	53,18(1)
[LH ₇]			58,82(1)
[ZnLH ₆]			–
[ZnLH ₅]	–	–	49,34(11)
[ZnLH ₄]	42,96(4)	42,30(9)	43,28(3)
[ZnLH ₃]	34,88(5)	35,09(2)	35,52(3)
[ZnLH ₂]	27,30(2)	–	–
[ZnLH]	17,91(4)	–	–
[ZnL]	7,78(14)	–	–

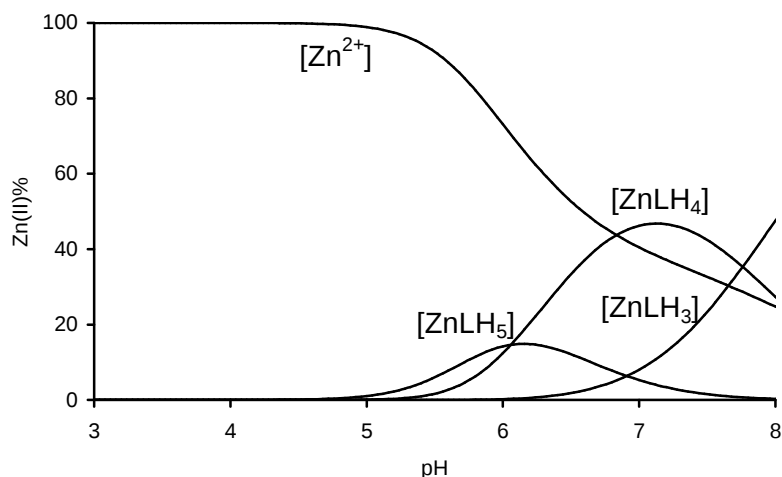
Ebből látszik, hogy két ligandumnak hat-hat protonálódási pontja van, melyekből négy a Lys-ekhez és kettő a His-ekhez rendelhető, a harmadik ligandumban egy harmadik His oldallánc protonja adja hetedik protont. Figyelembe véve, hogy a négy lizinoldallánc protonálva marad pH 8 alatt, az azokra vonatkozó protonálódási állandók értékeit kivonva a komplexek stabilitási állandóinak értékeiből, megkapjuk az adott koordinációra vonatkozó log K értékeket, ezek nagysága az első komplex esetében imidazol-koordinációra utal, ezek a 14. táblázat utolsó három oszlopában vannak feltüntetve.

14 táblázat. A nagyméretű prionmodellek cink(II)komplexeinek imidazolnitrogén koordinációjára vonatkozó stabilitási állandók értékei illetve néhány egyéb pK érték.

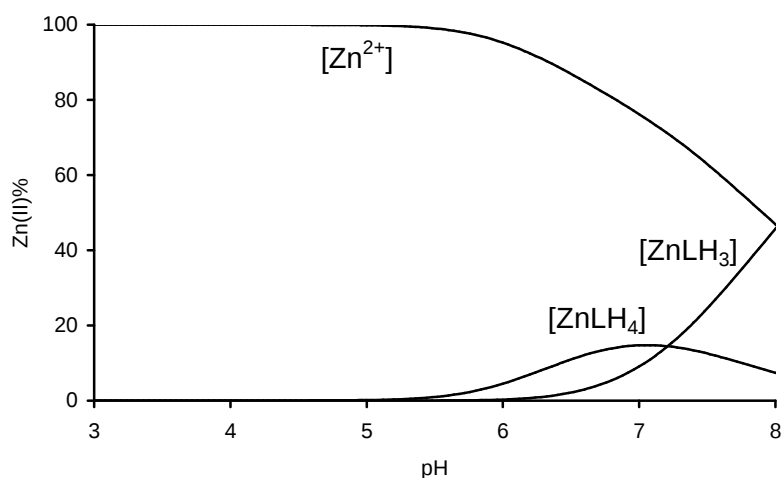
Állandó típusa	Ligandumok								
	Acetil-hisztamin	Ac-His-NHMe	Z-HisGly-OH	Ac-HGGG-NH ₂	Ac-MKHM-NH ₂	Ac-FKHV-NH ₂	PrP(84–114)His111Ala	PrP(84–114)His85Ala	PrP(84–114)
log K (Zn+N _{im})	2,1	2,15	2,56	2,69	2,71	3,01	–	–	–
log K (Zn+2N _{im})							2,66	1,95	2,35
log K (Zn+3N _{im})									3,06
* pK $\frac{ZnLH_x}{ZnLH_{(x-1)}}$	7,87	7,92	6,66	8,09	7,52	7,5	8,08	7,21	7,76
	–	–	–	–	–	–	7,58	–	–
	–	–	–	–	–	–	9,39	–	–
	–	–	–	–	–	–	10,13	–	–
→ Ligandum mérete nő →									

$$*pK \frac{ZnLH_x}{ZnLH_{(x-1)}} = \log\beta(ZnLH_x) - \log\beta(ZnLH_{(x-1)})$$

A ligandum egyfogú imidazolnitrogénen keresztüli koordinációjára vonatkozó állandó nem szerepel az értékek között, ugyanis a $[ZnLH_5]$ és a $[ZnLH_6]$ (a két- illetve háromhisztidin-tartalmú ligandumokra vonatkozóan) komplexek nem számolhatók. Ez azt mutatja, hogy az egyfogú imidazolkoordináció nem biztosít megfelelő stabilitást a 31-tagú nagypeptid esetében. Ezért a komplexképződés a ligandumok kétfogú koordinációjával kezdődik a hisztidin-oldalláncokon keresztül (58., 59., 60. ábrák, utóbbi a 101. old.). A log $K(Zn + 2N_{im})$ értékek a 14. táblázatban makrokelát szerkezetű cinkkomplexek stabilitását tükrözik. Ezek közül a legnagyobb értéke a HuPrP(Ac84-114NH₂)His(111)Ala ligandum



58. ábra. A $\text{Zn(II)} - \text{HuPrP(Ac84-114NH}_2\text{)}$ rendszer komplexeinek koncentrációeloszlási görbéi ($C_{\text{Zn}^{2+}} = C_L = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)



59. ábra. A $\text{Zn(II)} - \text{HuPrP(Ac84-114NH}_2\text{)His85Ala}$ rendszer komplexeinek koncentrációeloszlási görbéi ($C_{\text{Zn}^{2+}} = C_L = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

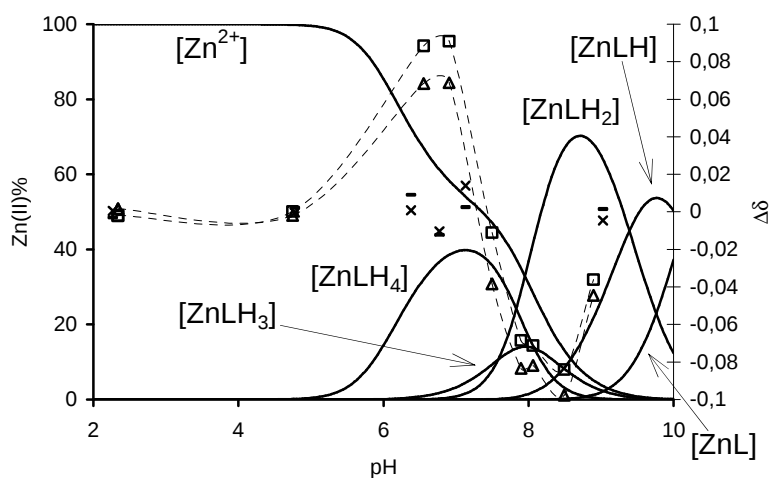
komplexének van, amelyben a His(85) és a His(96) képez makrokelátot. Kutatócsoportunkban méréseinkkel párhuzamosan vizsgálták e nagytagszámú ligandumok rézkomplexeit is. A rézzel kapott eredmények összhangban vannak a mi eredményeinkkel, hisz azt találták, hogy szintén a His(85) és a His(96) koordinálódásával képződik a legnagyobb stabilitású makrokelát.^[190] Valószínűleg a His(96) és a His(111) közötti nagyobb távolság az oka a kisebb stabilitású makrokelát képződésének a $\text{HuPrP(Ac84-114NH}_2\text{)His(85)Ala}$ esetében. A háromhisztidin-tartalmú $\text{HuPrP(Ac84-114NH}_2\text{)}$ ligandum esetében koordinációs

izomerek képződése feltételezhető. A harmadik imidazolgyűrű koordinálódása következtében a $[ZnLH_4]$ komplex képződése számolható, a $\log K(Zn + 3N_{im})$ érték azt mutatja, hogy a három imidazolgyűrű egyidejű koordinációja tovább növeli a komplex stabilitását a kéthisztidines koordinációhoz képest. Mindemellett, az eloszlásgörbékből látszik, hogy a komplexképződés egyik rendszerben sem teljes, viszonylag sok cink van szabadon az oldatban. Nagyobb pH-n egy újabb részecske számolható, mely a pK értékek alapján valószínűleg koordinált vízmolekula deprotonálódásából ered, azaz feltehetően vegyes-hidroxokomplexek képződnek, legalábbis a $HuPrP(Ac84-114NH_2)$ és a $HuPrP(Ac84-114NH_2)His(85)Ala$ esetében.

A 14. táblázatban feltüntettük az előző fejezetben tárgyalt ligandumok cinkkomplexeire vonatkozó $\log K(Zn + N_{im})$ értékeket. A sort kiegészítendő, néhány egyéb kisméretű ligandum cinkkomplex-képződési folyamatait is megvizsgáltuk ($Ac-Ha$, $Z-HisGly-OH$, $Ac-HisGlyGlyGly-NH_2$). Ezek értékeit is magában foglalja a táblázat, melyben a ligandumok méretük növekedésének sorrendjében vannak feltüntetve. Megfigyelhető, hogy a cinkkomplexek stabilitás-értékei maximumgörbét írnak le a ligandumméret függvényében. Nagyobb értékekkel jellemezhetők a tetrapeptidek, míg a kisméretű és a nagy 31-tagú peptidek kisebb stabilitást mutatnak, mindamellett, hogy ez utóbbiak esetében az összehasonlított komplexekben két imidazolgyűrű, míg a többiben csak egy koordinálódik a cinkionhoz. Valószínűsíthető, hogy a kisméretű ligandumok és a tetrapeptidek esetében a különbségek a töltésből, a karbonilcsoportok eltérő számából, illetve a nem koordinálódó részek hidrofób kölcsönhatásából erednek, míg a nagy ligandumok esetében a szterikus okok kapnak kiemelt szerepet.

A fentiekben említésre került, hogy a következő deprotonálódási lépcsőben feltehetően vegyes-hidroxokomplexek képződnek, legalábbis a $HuPrP(Ac84-114NH_2)$ és a $HuPrP(Ac84-114NH_2)His(85)Ala$ esetében. Ez a deprotonálódás elméletileg származhat amidnitrogéntől is, ám közvetlenül a kiszámolt pK érték fölött bekövetkező csapadékleválás ez ellen szól. Viszont a $HuPrP(Ac84-114NH_2)His(111)Ala$ hasonló komplexének kialakulását követően nem válik le csapadék csak pH 10 körül, így az újabb deprotonálódási lépcsőkre további komplexek számíthatók. Ez az eltérés esélyt ad arra, hogy amidnitrogén deprotonálódását feltételezzük. Felvettük a rendszer pD -függő NMR spektrumait. Ismert, hogy sok esetben a cinkkomplexekben kötött és a szabad ligandum között megvalósuló gyors (NMR időskáláján) ligandumcsere miatt a spektrumokban nem láthatjuk külön-külön a szabad és a fémhez kötött ligandum jeleit (átlagolt jelet kapunk mindkettőre). A PSEQUAD program segítségével kiszámoltuk, a szabad

ligandum imidazol-C(2)H protonok kémiai eltolódását azokon a pD értéken, melyeken felvettük a cinket is tartalmazó rendszer spektrumait. A C(5)H protonok jelei együtt jönnek a Trp aromás CH protonok jeleivel, így csak a C(2)H protonok (mindkét, 85. és 96. hisztidin (AHis és BHis) C(2)H protonok) jeleinek eltolódását tudjuk összevetni a fémes és nemfémes rendszerekre. A szabad ligandum jelének kémiai eltolódás értékéből kivonva a komplex rezonanciacsúcsát is tartalmazó jel (a továbbiakban komplex jele) kémiai eltolódás értékét, megkapjuk a $\Delta\delta$ értéket. Ezt az értéket a pH függvényében ábrázolva a rendszer koncentrációeloszlásával közös pH skálán (60. ábra) érdekes megfigyeléseket tehetünk.



--□-- $\Delta\delta = \delta(\text{AHis}) - \delta(\text{AHis} + \text{Zn})$

--△-- $\Delta\delta = \delta(\text{BHis}) - \delta(\text{BHis} + \text{Zn})$

— hiba a ligandum AHis C(2)H proton jel eltolódásértékének visszaszámolásából

× hiba a ligandum BHis C(2)H proton jel eltolódásértékének visszaszámolásából

60. ábra. A baloldali y tengelyhez tartozó ábra:

a Zn(II) – HuPrP(Ac84-114NH₂)His111Ala rendszer komplexjeinek

koncentrációeloszlási görbéi ($C_{\text{Zn}^{2+}} = C_L = 4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$);

A jobboldali y tengelyhez tartozó ábra:

a hisztidinek (AHis, BHis) C(2)H protonjainak jeleltolódása a komplex jeleihez képest;

a számolás hibáját szemléltető pontok: ×, – (eltérésük a nullától mutatja a visszaszámolt érték eltérését a mért értéktől)

Azt láthatjuk, hogy a savas pH tartományban ahol még nincs komplexképződés a $\Delta\delta$ érték gyakorlatilag nulla, azaz a fémes és nemfémes rendszerek spektrumai nem térnek el. Az imidazol-koordináció pH tartományába érve a komplex jele a szabad liganduméhoz viszonyítva a kisebb ppm-ek felé tolódik (upfield shift), igazolva az oldallánc koordinációját.^[78] Nagyobb pH-n, a következő részecske megjelenésével

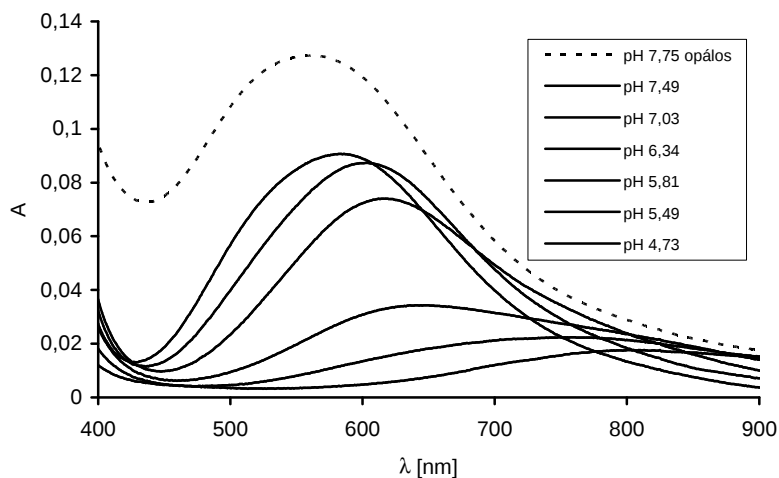
párhuzamosan viszont ellentétes eltolódást (downfield shift) tapasztalunk a szabad ligandum jeléhez képest. Ez az eltolódás alátámaszthatja akár az oldható vegyes-hidroxokomplex képződését akár az amidnitrogén koordinálódását. Kétség kívül, az alifás tartomány CH protonjainak jelei sokkal jobban érzékelik az amidnitrogén deprotonálódását, ám a spektrumok jelentős szélesedése miatt az alifás tartomány nem használható érdemben az amidnitrogén deprotonálódásának megállapítására. Ezért a jelen eredmények fényében nem dönthető el, hogy hidrolízis avagy amid-deprotonálódás okozza az aromás tartományban a jeleltolódást. Tekintettel arra, hogy az irodalomban nincs megbízható példa a cinkionindulkált amid-deprotonálódásra semleges pH környékén védett hisztidintartalmú peptidekre, az oldható hidroxokomplex képződését tartjuk valószínűbbnek. A $\Delta\delta$ értékek abszolút értéküket tekintve nem nagyok, ám biztos, hogy nem a számolás hibájából erednek. Ugyanis az ábrán „-” és „x”-el vannak jelölve a szabad ligandumra visszaszámolt és a mért értékek különbsége, melyek a számolás hibáját mutatják, és ezek jóval kisebbek, mint a komplexképződés során tapasztalt eltolódás.

Nagyobb pH-n ebben a rendszerben is cink-hidroxid csapadék képződését tapasztaltuk.

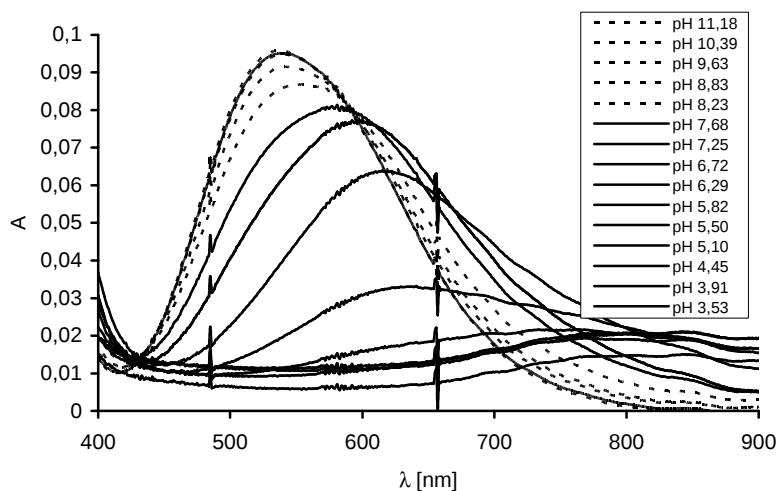
4.2.5. Nagytagszámú prionmodellek – réz(II)/cink(II) vegyes-fémiontartalmú rendszerek vizsgálata.

Ezen mérések elvégzése azért volt indokolt, mert biológiai rendszerekben ez a két nyomelem viszonylag nagy koncentrációban van jelen a többihez képest (még a vasion mellett), ezen belül is a cinkion van nagyobb mennyiségben. A prion rézionhoz való nagyfokú affinitása már ismert, így érdekes volt megvizsgálni, vajon a rézion jelenléte eredményez-e valamilyen változást a cinkion-prionhoz való koordinálódásában.

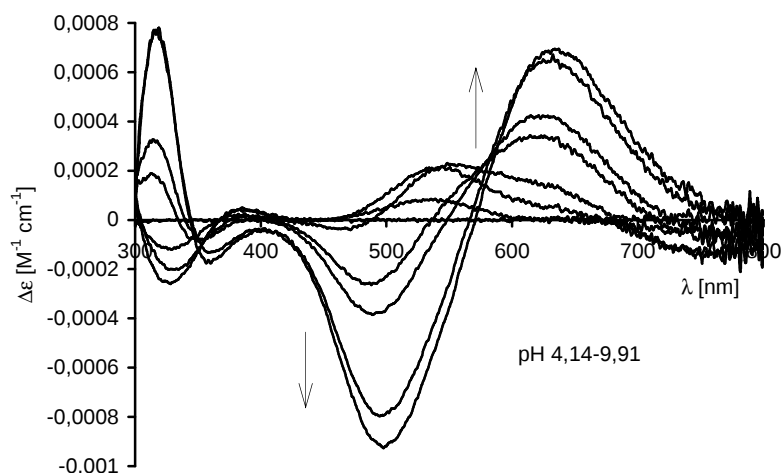
A HuPrP(Ac84-114NH₂)His(85)Ala, illetve HuPrP(Ac84-114NH₂)His(96)Ala kéthisztidines ligandumok vegyes-fémiontartalmú (Cu(II)/Zn(II)) 1:1:1 arányú rendszerek vizsgálatát potenciometriás, spektrofotometriás és CD spektroszkópiás módszerekkel végeztük. A potenciometriás adatok azt mutatják, hogy a görbék a rézkomplexek állandóival jól illeszthetők, tehát a cink nem képes a rézzel versengeni a kötőhelyekért a prionban és vegyes komplex is csak kevés lehet. Ebből következik, hogy elérve a cink hidrolízisének pH tartományát az hidrolizál, ami csapadékkiválással jár együtt. A csapadékképződés pH tartománya alatt mind az UV-Vis (61. ábra), mind a CD spektrumok (63. ábra) jól egyeznek a kizárólag rézzel felvett spektrumokkal (62. illetve 64. ábrák).



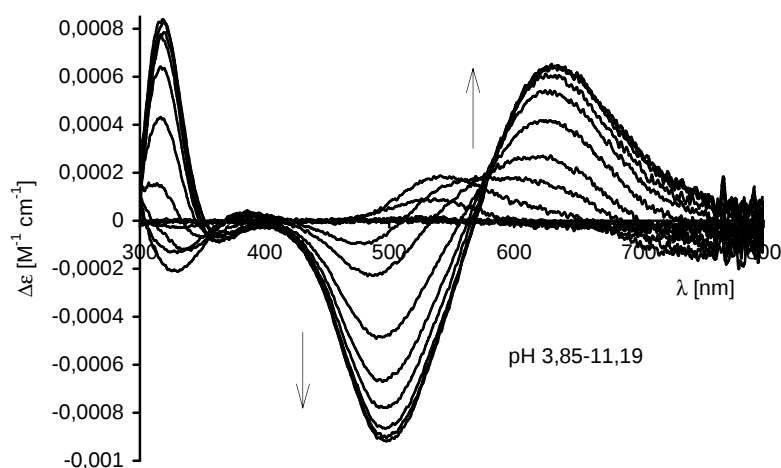
61. ábra. A Cu(II) – Zn(II) – HuPrP(Ac84-114NH₂)His(85)Ala rendszer elektrongerjesztési abszorpciós spektrumai ($C_{\text{Cu}^{2+}} = C_{\text{Zn}^{2+}} = C_L = 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)



62. ábra. A Cu(II) – HuPrP(Ac84-114NH₂)His(85)Ala rendszer elektrongerjesztési abszorpciós spektrumai ($C_{\text{Cu}^{2+}} = C_L = 0,9 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)



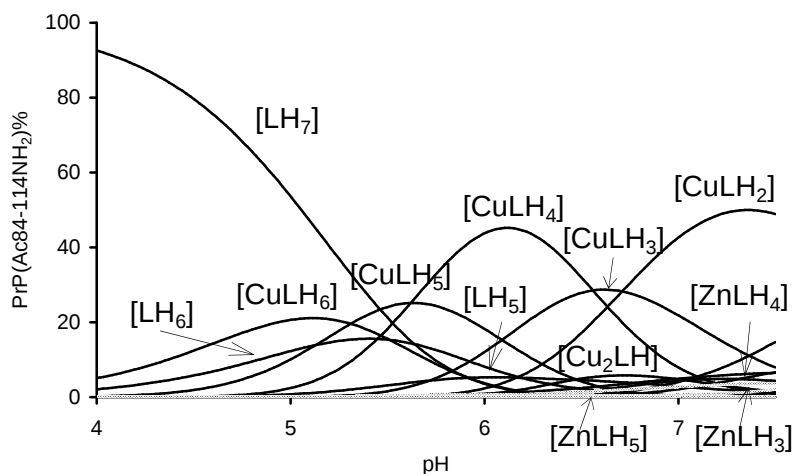
63. ábra. A Cu(II) – Zn(II) – HuPrP(Ac84-114NH₂)His(96)Ala rendszer CD spektrumai
($C_{\text{Cu}^{2+}} = C_{\text{Zn}^{2+}} = C_L = 0,8 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)



64. ábra. A Cu(II) – HuPrP(Ac84-114NH₂)His(96)Ala rendszer CD spektrumai
($C_{\text{Cu}^{2+}} = C_L = 0,9 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

A CD spektrumokbeli kismértékű eltérés a kizárólag réz tartalmazó rendszerek spektrumától abból ered, hogy az arányok nem voltak pontosan azonosak, ugyanis eltérő rézion-koncentrációnál a képződő rézkomplexek aránya megváltozik, így a kis eltérést a vegyesfémtartalmú rendszerekben nem a cink okozza. A fentiek alapján megállapítható, hogy a réz jelenléte nem növeli meg a cinkion prion proteinhez való affinitását.

Mivel 1:1:1 arányú rendszerekről van szó, így feltételezhető, hogy a rézion koordinálódása után fennmaradó szabad hisztidinekhez koordinálódik a cinkion, de ez utóbbi hisztidinek csak kis részére értendő. Minden ligandum két-két hisztidint tartalmaz, így valószínű, hogy a rézion a ligandum egyik hisztidinjéhez koordinálódik $[N_{im}, 2N^-]$, miközben a másik hisztidinhez lehetősége van a cinkionnak koordinálódni (egyfogú imidazol-koordináció). Az előző alfejezetben láthattuk, hogy a nagytagszámú ligandumok esetén meg sem jelenik az egyfogú imidazol-koordinációt tartalmazó cinkkomplex, ami annak igen csekély stabilitására utal. Ez utóbbi magyarázatot ad arra is, hogy a titrálási görbék jól illeszthetők a rézkomplexek állandóival, ugyanis ez esetben a rézion koordináción kívül megvalósuló cinkion koordinálódás csak kismértékű stabilitásnövekedést eredményez, ezenkívül mennyisége is elenyésző, ezért a vegyes komplex állandója csak igen nagy hibával számítható. Ez összhangban van azon eredményeinkkel, melyek szerint az egyhisztidin-tartalmú peptideknek csekély a cinkionhoz való affinitása (jelen esetben a ligandum másik hisztidinjét a rézion foglalja el).



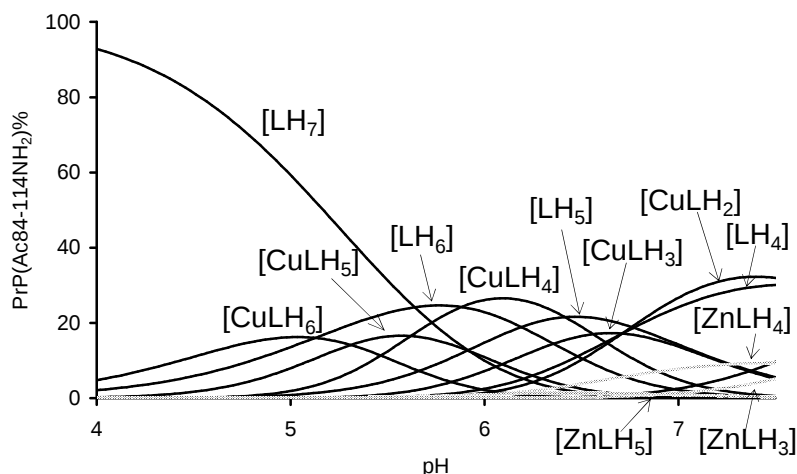
65. ábra. Az L: HuPrP(Ac84-114NH₂) réz(II)- és cink(II)komplexei stabilitásának összehasonlítása többszörös cink(II) felesleg mellett ($C_{Zn^{2+}} = 5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $C_{Cu^{2+}} = C_L = 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) (cink(II)komplexek világosabb vonallal vannak jelölve)

Végezetül elmondható, hogy a kéthisztidin-tartalmú nagytagszámú prionfragmensek, melyek a protein 84-114 tartományát modellezzik kis mértékben koordinálódnak csak a cink(II)ionhoz. Másrészt elmondható, hogy még nagy cinkionfelesleg mellett sem képes a cinkion versengeni a rézkötőhelyekért. A 65. ábra egy ilyen modellszámítást mutat be, melyben a cink(II)ion ötszörös feleslegben van a réz(II)ion koncentrációhoz képest. Ebből látható, hogy a nagy

cinkionfelesleg ellenére sem jelennek meg számottevő koncentrációban a cinktartalmú komplexek.

A jelen értekezés megírásának végső szakaszában megjelent egy közlemény, melyben szintén arra a következtetésre jutottak, amire mi is, miszerint még nagy cinkionfelesleg esetén sem képes a cinkion helyettesíteni a réziont a prionban.^[191] A cinkion kötődését csak az octarepeat tartomány négy hisztidinjéhez tudták kimutatni réz távollétében, az azon kívül eső tartományokban nem találtak cinkkoordinálódást. Azt is kimutatták, hogy a cinkion jelenléte megváltoztatja a rézion eloszlását a különböző komplexekben, ami felveti annak a lehetőségét, hogy redoxinaktív fémionként a cinkion mégis képes beleszólni a rézkomplexek képződésébe, azaz eltolja az egyensúlyt a multihisztidines komplex képződéséről (octarepeat tartomány négy hisztidinje) az egyhisztidinesek felé, ezek redoxaktivitása viszont különbözik. Mindazonáltal ez azt is jelenti, hogy abban az esetben, ha van elegendő ligandum mindkét fémion számára, akkor megvalósulhat a cinkion koordinációja is.

A 66. ábra is ezt szemlélteti. A koncentrációeloszlás szerkesztéséhez az általunk meghatározott egyensúlyi állandókat használtuk a cinkkomplexekre vonatkozólag. Ebben a modellrendszerben a réz és a cink koncentrációját az agyban is megtalálható arányra és koncentrációra állítottuk be, mindamellett, hogy a ligandum mennyiségét a rézkoncentráció duplájára növeltük. Azt láthatjuk, hogy a cinkkomplexek valóban számottevőbb (a 65. ábrához képest) mennyiségben képződnek az adott körülmények között, azonban még mindig a rézion kötődése az uralkodó.



66. ábra. Az L: HuPrP(Ac84-114NH₂) réz(II)- és cink(II)komplexei stabilitásának összehasonlítása ($C_{Zn^{2+}} = 3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $C_{Cu^{2+}} = 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $C_L = 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) (cink(II)komplexek világosabb vonallal vannak jelölve)

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkám során hisztidintartalmú peptidek komplexképződési folyamatainak tanulmányozásával foglalkoztunk. A dolgozat eredményeinek témakörét tekintve két részre bontható.

Az *első részben* célkitűzéseinknek megfelelően a hisztidinoldallánc szerepét vizsgáltuk terminálisan védett két-, illetve háromhisztidin-tartalmú peptidekben. Munkánk során az N-terminálisan védett Ac-HisGlyHis-OH, Ac-HisGlyHis-NHMe tripeptidek, illetve az Ac-HisHisGlyHis-OH, Ac-HisHisGlyHis-NHMe tetrapeptidek rézkomplexeit tanulmányoztuk. Eredményeink azt mutatták, hogy

- minden esetben jó horgonydonornak bizonyultak a hisztidin-oldalláncok imidazol-nitrogénjei;
- megvalósul a tripeptidek mindkét imidazol-gyűrűjének és a tetrapeptidek mindhárom imidazol-gyűrűjének egyidejű koordinációja, amely makrokelát szerkezeteket eredményez;
- ezáltal a réz(II)ion képes volt elősegíteni az amidnitrogének deprotonálódását, és létrejöhetett az azokhoz való koordinálódás;
- az első két amidnitrogén deprotonálódása a tripeptidek esetében közel kooperatív módon megy végbe, míg a tetrapeptideknél ez a folyamat lépcsőzetes;
- az amidnitrogének koordinálódását tekintve fiziológiás pH környékén az egy-, illetve két deprotonálódott amidnitrogén koordinálódása a meghatározó, míg lúgosabb tartományban egy újabb amidnitrogén kötődését is kimutattuk;
- a tripeptidek két hisztidinjéhez képest a tetrapeptidek harmadik hisztidinje tovább növeli a peptid fémmegkötő-képességét;
- a ligandumban lévő terminális karboxilátcsoport szintén növeli a peptid fémmegkötő-képességét.

A dolgozat *második*, és egyben nagyobbik része javarészt a prion protein His(96), és His(111) fémkötőhelyeinek modellezésével kapcsolatos, illetve azok fémion-komplexeivel. A főbb eredmények fémionok szerint csoportosítva foglalhatók össze.

A *réz(II)ionnal* való kölcsönhatásnál a következő megállapítások tehetők:

- a komplexképződési folyamat minden esetben az imidazolhorgony egyfogú kötődésével kezdődik;

- az első két amidnitrogén deprotonálódása kooperatív módon megy végbe, aminek biológiai vonatkozása is lehet: kis pH ingadozás nagymértékben változtatja a szabad és kötött rézionok arányát;
- az irodalmi adatok ellentmondásosságát eloszlatandó, kimutattuk a Met(109) oldalláncának gyenge koordinálódását, melynek szintén élettani funkcióját feltételezzük: védő hatása lehet a káros rézionkatalizált oxidációval szemben;
- a Lys oldalláncok ϵ -aminocsoportjainak koordinációját egyik esetben sem lehetett kimutatni;
- fiziológiás pH-ra kialakuló koordinációs mód az $[N_{im}, N^-, N^-]$, míg a metionintartalmú komplex esetében $[N_{im}, N^-, N^-, S]$ kötésmódot mutattunk ki;
- az octarepeat tartománnyal ellentétben az amid-deprotonálódás az N-terminus irányába halad;
- a komplexek stabilitásának összehasonlításával megállapítható, hogy fiziológiás pH-n a His(111) környéke valamivel jobb fémmegkötő, mint a His(96) körüli rézkötőhely, és mindkettő jobb, mint az ocrepeat monomer;
- nagyobb modellek eredményeivel összehasonlítva megállapítható, hogy a tetrapeptidmodellek megbízható modelljei a fémmegkötő-helyeknek.

A *palládium(II)ion* alkotja az összes vizsgált fémion közül a legnagyobb stabilitású komplexeket. A kisméretű, peptidben kötött hisztidinmodell (Ac-His-NHMe) vizsgálatából kiderült, hogy a palládiummal való komplexképződés nagymértékben függ a fém/ligandum aránytól. Az 1:1 arányú Pd(II) – Ac-FKHV-NH₂ rendszerben:

- a komplexképződés már erősen savas pH-n megindul;
- mind az imidazolnitrogén, mind az amidnitrogén részt vesz a koordinációban;
- a komplexekben megtalálható kötésmód rézkomplexekhez hasonló, azzal a különbséggel, hogy a komplexek stabilitása jóval nagyobb értéket mutat a palládium esetében;
- az amidnitrogének deprotonálódása lépcsőzetes a réznél tapasztalt kooperativitással szemben.

Az oldalláncban jelen lévő lágy karakterű donoratomok jelentősen befolyásolják a komplexképződési folyamatot. A Pd(II) – Ac-MKHM-NH₂ 1:1 arányú rendszerben:

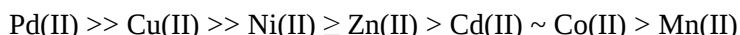
- a komplexképződés szintén igen savas pH-n indul meg a tioétercsoport elsődleges koordinációjával;

- nagyobb pH-n megindul az átrendeződés az imidazol-, illetve amidnitrogénekre, mivel a képződő komplex termodinamikai stabilitása nagyobb az előző komplex stabilitásánál;
- az átrendeződési folyamat igen lassú, ugyanis a Pd – N kötés képződési kinetikája lassabb, mint a Pd – S kötésé;
- nagyobb pH-n (9 fölött) oligo-, illetve polimerrészecskék képződésével magyarázható a csapadék megjelenése, ez a hisztidin oldallánc olyan koordinációjával lehetséges, amikor az hidat képez koordinatíve telítetlen részecskékhez való koordinálódás által.

Az *egyéb fémionok* (Ni(II), Zn(II), Co(II), Cd(II), Mn(II)) körében megállapítható, hogy

- igen kis affinitással rendelkeznek a prionmodellek felé;
- a ligandum fémhez való egyfogú (imidazol-nitrogénen keresztül) koordinációját követően az nem tudja oldatban tartani az adott fémiont, így elérve a fémion hidrolízisének tartományát, a fémion hidrolizál;
- egyedül a nikkel esetében tapasztaltuk a csapadék visszaoldódását lúgosabb pH-n, amikor az megindítja az amidnitrogének deprotonálódását;
- a vizsgált fémionok körében a mangán bizonyult a leggyengébben koordinálódónak a prion peptidfragmenseihez. Ez a gyenge kölcsönhatás azt mutatja, hogy a hisztidin oldallánca nem elégséges horgony a mangánion számára. Ez alapján valószínűsíthető, hogy a mangánion-indukált konformációváltozás kialakulásában nem a hisztidinkörnyéki kötődés a döntő.

Mindent egybevéve a fémkomplexek stabilitása alapján a prionmodellekhez való affinitás a következő sorrendet mutatja:



Figyelembe véve, hogy a palládiumnak biológiai szempontból nincs jelentősége, a réz kap meghatározó szerepet. Ez alátámasztja azt a megállapítást, mely szerint a réz kiugró affinitással rendelkezik a prion protein felé, azaz a prion protein biológiai szerepe kapcsolódik a réz(II) anyagcsere folyamataihoz.

Végezetül nagyobb, többhisztidin-tartalmú prionmodellek (PrP(84-114)) segítségével vizsgáltuk azok cinkionhoz való kötődését. Eredményeink az mutatják, hogy a nagymodellek esetén is igen csekély mértékben kötődik a cink a prionhoz (imidazol-koordináció). A Cu/Zn vegyes-fémiontartalmú rendszerek vizsgálatából kiderült, hogy a cink nem képes versengeni a rézkötőhelyekért a prionban, ami abban az esetben is érvényes, ha a cinkion nagy feleslegben van, azonban ligandumfelesleg esetén megvalósulhat a cinkion koordinációja is.

6. SUMMARY

During my Ph.D. work, I have studied complex formation reactions of histidine containing peptides. The results obtained can be divided into two parts.

The *first part*, included a study of the role of histidine side chain in the complex formation reactions of N-terminally protected tri- and tetra-peptides containing two or three histidyl residues. The interaction of Ac-HisGlyHis-OH, Ac-HisGlyHis-NHMe, Ac-HisHisGlyHis-OH and Ac-HisHisGlyHis-NHMe with copper(II)ion have been investigated by potentiometric, UV-Vis spectrophotometric, CD, ^1H NMR and ESR spectroscopic methods. The major conclusions obtained from the results are as follows:

- the macrochelates could form with the simultaneous coordination of two and three histidine side chains for tri- and tetrapeptides, respectively;
- the imidazole nitrogen donor atom is an efficient anchor and is able to induce deprotonation and coordination of amide nitrogens in all cases;
- the deprotonation of the first two amide nitrogens occurs almost in a cooperative manner for tripeptides, while this process takes place in a stepwise deprotonation in the case of tetrapeptides;
- the domination of $[\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}]$ and $[\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}]$ coordinated species was observed in the physiological pH-range. It is interesting that the latter contains an unusual (7,5,6)-membered joined chelate. The deprotonation of the third amide function was detected at higher pH;
- the presence of the third imidazole side chain in tetrapeptides results in higher copper binding ability as compared with the two histidine residues of tripeptides;
- the presence of the carboxylate group gives higher metal binding ability as well.

The *second part* of the thesis deals with the histidine containing peptide fragments of prion proteins (especially His(96) and His(111)) and their transition metal complexes. The main findings are best discussed by forming three groups of metal ions.

With *copper(II) ion*:

- the complex formation reaction starts with the monodentate coordination of imidazole moiety as an anchor in all of these cases;
- the deprotonation of the first two amide functions takes place in a cooperative manner and consequently small changes in pH can result in significant changes in the ratio of free and complexed copper(II) ions;

- we have confirmed the weak coordination of Met(109) side chain at physiological pH. In biological systems, this may have possible protective role as an endogenous antioxidant toward copper-catalysed oxidation;
- the ϵ -amino groups of Lys residues are not metal-binding sites at any pH values;
- at physiological pH, we have found the $[N_{im}, N^-, N^-]$ coordination mode, while the binding sites can be given as $[N_{im}, N^-, N^-, S]$ in the case of Met containing peptide;
- in contrast with the octarepeat region, the deprotonation and coordination of amide nitrogens goes toward the N-termini;
- at physiological pH, the His(111) containing peptide has higher copper binding ability than the His(96) containing peptide and all of them have higher binding ability than the octarepeat monomer;
- small tetrapeptide fragments are reliable models of metal binding sites. The complex formation processes of the tetra- and nona-peptide fragments are almost the same.

The complexes of *palladium(II)* ion are the most stable among the studied metal ions. The investigation of small model ligand Ac-His-NHMe shows that complex formation reactions with palladium(II) depends on the metal to ligand ratio to a great extent. In equimolar solution of palladium(II) and Ac-FKHV-NH₂:

- the complex formation reaction starts even under strongly acidic conditions;
- the imidazole nitrogens and also the amide nitrogens coordinate to the palladium(II) ion;
- the coordination mode is very similar to that found for the copper(II) complexes, but the formation of analogous complexes is shifted toward more acidic pH in the case of palladium;
- the deprotonation and coordination of amide nitrogens is successive in contrast with the cooperativity observed in the case of copper(II) complexes.

The presence of soft donor functions in the side chains of peptides significantly influences the complexation with palladium. In equimolar solution of palladium(II) and Ac-MKHM-NH₂:

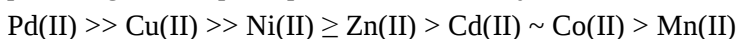
- the complexation starts even under strongly acidic pH, but via the primary coordination of thioether sulfur atom (Met(109)) in contrast with the previous system;

- the increase of pH results in the formation of $\text{Pd} - \text{N}_{\text{im}}$ and $\text{Pd} - \text{N}_{\text{amide}}^-$ bonded species because these species have high thermodynamic stability;
- the structural rearrangement of palladium(II) complexes is a very slow process. This can be explained by the different formation kinetics of $\text{Pd} - \text{S}$ and $\text{Pd} - \text{N}$ bonded species, the latter one formed in much slower reactions;
- the formation of precipitate at alkaline pH ($\text{pH} > 9$) can be explained by the formation of polynuclear species in which the imidazole moieties can act as bridging residues between coordinatively unsaturated species.

For the *other metal ions* (Ni(II) , Zn(II) , Co(II) , Cd(II) , Mn(II)) the major conclusions can be drawn as follows:

- they have only low affinity to bind to the short peptide fragments of prion proteins;
- after the monodentate imidazole coordination of the ligand, it cannot prevent the hydrolysis of the metal ions in slightly alkaline solutions;
- amide coordination can occur only with nickel(II) at alkaline pH values;
- the weakest interaction with the peptide fragments of prion protein among the studied metal ions have been observed in the case of manganese. This suggest that histidines are not sufficient anchors for manganese and the pivotal role in the structural conformation caused by Mn(II) is not the coordination to histidine residue.

The stabilities of studied complexes show different affinity towards the binding of peptide fragment of prion proteins, this affinity follows the order:



Taking into account, that palladium(II) ions have no biological role, we can conclude that peptide fragments of prion protein have an outstanding selectivity to bind copper among the essential transition elements.

Finally, we studied the *zinc(II)* binding ability of large 31-mer peptides which contain two or three histidine residues (PrP(84-114)). It has been found that the affinity toward zinc(II) ion was also low despite the higher number of histidines, the imidazole moieties are the exclusive binding sites. On the other hand, peptides have high affinity for copper(II) binding even in the presence of high excess of zinc(II) ions.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. N.N. Greenwood, A. Ernschaw: *Az elemek kémiája*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (1999)
2. Kiss T., Gajda T., Gyurcsik B.: *Bevezetés a Bioszervetlen Kémiába*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2007)
3. I. Sóvágó, K. Ösz: *Dalton Trans.*, 3841 (2006)
4. H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska: *Coord. Chem. Rev.*: **184**, 319 (1999)
5. H. Sigel, R.B. Martin: *Chem. Rev.*, **82**, 385 (1982)
6. I. Sóvágó, in: *Biocoordination Chemistry: Metal Complexes of Peptides and Their Derivatives* (ed.: K. Burger), Ellis Horwood, Chichester, New York, p. 135-184 (1990)
7. T. Kowalik-Jankowska, H. Kozłowski, E. Farkas, I. Sóvágó: *Metal Ions in Life Sciences* (ed.: A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel), (Nickel and its Surprising Impact in Nature), **2**, p. 63-107 (2007)
8. M.R. Udupa, B. Krebs: *Inorg. Chim. Acta*, **31**, 251 (1978)
9. I. Sóvágó, B. Harman, A. Gergely, B. Radomska: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 235 (1986)
10. A. Gergely, I. Nagypál: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1104 (1977)
11. H. Kozłowski, T. Kowalik-Jankowska, M. Jezowska-Bojczuk: *Coord. Chem. Rev.*: **249**, 2323 (2005)
12. I. Sóvágó, E. Farkas, A. Gergely: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2159 (1982)
13. E. Farkas, I. Sóvágó, A. Gergely: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1545 (1983)
14. G. Brookes, L.D. Pettit: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2112 (1975)
15. P. Daniele, O. Zerbinati, R. Aruga, G. Ostacoli: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1115 (1988)
16. 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*, **355**, 408 (2003)
17. G.F. Bryce, R.W. Roeske, F.R.N. Gurd: *J. Biol. Chem.*, **240**, 3837 (1965)
18. I. Sóvágó, G. Petocz: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1717 (1987)
19. R. Agarwal, D. Perrin: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 268 (1975)
20. B. Radomska, T. Kiss, I. Sóvágó: *J. Chem. Soc., Chem. Res. (S)*, 156 (1987)
21. N.I. Jakab, B. Gyurcsik, T. Körtvélyesi, I. Vosekalna, J. Jensen, E. Larsen: *J. Inorg. Biochem.*, **101**, 1376 (2007)
22. A. Myari, G. Malandrinos, J. Plakatouras, N. Hadjiliadis, I. Sóvágó: *Bioinorg. Chem. and Applic.*, **1**, 99 (2003)
23. R.B. Martin, J.T. Edsall: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1107 (1960)
24. S. Bruni, F. Cariati, P.G. Daniele, E. Prenesti: *Spectrochim. Acta, Part A* **56**, 815 (2000)
25. Ch. Conato, R. Gavioli, R. Guerrini, H. Kozłowski, P. Mlynarz, C. Pasti, F. Pulidori, M. Remelli: *Biochim. Biophys. Acta* **1526**, 199 (2001)
26. E. Farkas, I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 611 (1984)

27. K. Takehara, Y. Ide: *Inorg. Chim. Acta*, **183**, 195 (1991)
28. T. Gajda, B. Henry, J.J. Delpuech: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1301 (1993)
29. Zs. Árkosi, Z. Paksi, L. Korecz, T. Gajda, B. Henry, A. Rockenbauer: *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 1995 (2004)
30. J.F. Blount, K.A. Fraser, H.L. Freeman, J.T. Szymanski, C.H. Wong: *Acta Crystallogr.*, **22**, 396 (1967)
31. R. Osterberg, B. Sjöberg, R. Söderqvist: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 983 (1972)
32. C.M. Perkins, N.J. Rose, B. Weinstein, R.E. Stenkamp, L.H. Jensen, L. Pickart: *Inorg. Chim. Acta*, **82**, 93 (1984)
33. I. Sóvágó, E. Farkas, Cs. Bertalan, A. Lebkiri, T. Kowalik-Jankowska, H. Kozłowski: *J. Inorg. Biochem.*, **51**, 715 (1993)
34. J.P. Laussac, B. Sarkar: *Biochem.*, **23**, 2832 (1984)
35. W. Bal, M. Jezowska-Bojczuk, K.S. Kasprzak: *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 906 (1997)
36. Ch. Conato, H. Kozłowski, P. Młynarz, F. Pulidori, M. Remelli: *Polyhedron*, **21**, 1469 (2002)
37. Y. Fang, B.D. Ray, C.A. Claussen, K.B. Lipkowitz, E.C. Long: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 5403 (2004)
38. G.F. Bryce, R.W. Roeske, F.R.N. Gurd: *J. Biol. Chem.*, **241**, 1072 (1966)
39. S.J. Lau, T.P.A. Kruck, B. Sarkar: *J. Biol. Chem.*, **249**, 5878 (1974)
40. T.P.A. Kruck, S.J. Lau, B. Sarkar: *Can. J. Chem.*, **54**, 1300 (1976)
41. T. Gajda, B. Henry, A. Aubry, J.-J. Delpuech: *Inorg. Chem.*, **35**, 586 (1996)
42. E.K. Quagrainie, H.-B. Kraatz, R.S. Reid: *J. Inorg. Biochem.*, **85**, 23 (2001)
43. Y. Zhang, D.E. Wilcox: *J. Biol. Inorg. Chem.*, **7**, 327 (2002)
44. P. Młynarz, D. Valensin, K. Kociolek, J. Zabrocki, J. Olejnik, H. Kozłowski: *New J. Chem.*, **26**, 264 (2002)
45. P. Gizzi, B. Henry, P. Rubini, S. Giroux, E. Wenger: *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 1182 (2005)
46. R. Sankararamakrishnan, S. Verma, S. Kumar: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatic*, **58**, 211 (2005)
47. K. Várnagy, J. Szabó, I. Sóvágó, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, G. Micera: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 467 (2000)
48. W. Bal, H. Kozłowski, R. Robbins, L.D. Pettit: *Inorg. Chim. Acta*, **231**, 7 (1995)
49. L.D. Pettit, S. Pyburn, W. Bal, H. Kozłowski, M. Bataille: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3565 (1990)
50. B. Jezowska-Trzebiatowska, L. Latos-Grazynski, H. Kozłowski: *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **39**, 1269 (1977)
51. J. Ueda, A. Hanaki, N. Yoshida, T. Nakajima: *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 2042 (1995)
52. D.L. Rabenstein, S.A. Daignault, A.A. Isab, A.P. Arnold, M.M. Shoukry: *J. Am Chem Soc.*, **107**, 6435 (1985)
53. M. Förster, H. Vahrenkamp: *Chem. Ber.*, **128**, 541 (1995)
54. P. Młynarz, T. Kowalik-Jankowska, M. Stasiak, M.T. Leplawy, H. Kozłowski: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3673 (1999)
55. J. Ueda, A. Hanaki, N. Yoshida, T. Nakajima: *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3096 (1985)

56. J. Ueda, A. Hanaki, N. Yoshida, T. Nakajima: *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1315 (1986)
57. A. Myari, G. Malandrinos, Y. Deligiannakis, J.C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, Z. Nagy, I. Sóvágó: *J. Inorg. Biochem.*, **85**, 253 (2001)
58. T. Gajda, B. Henry, A. Aubry, J.-J. Delpuech: *Inorg. Chem.*, **35**, 586 (1996)
59. I. Sóvágó, T. Kiss, K. Várnagy, B. Decock-Le Reverend: *Polyhedron*, **7**, 1089 (1988)
60. K. Cherifi, B. Decock-Le Reverend, C. Loucheux, K. Várnagy, T. Kiss, I. Sóvágó: *J. Inorg. Biochem.*, **38**, 69 (1990)
61. J. Reedijk: *Chem. Commun.*, 801 (1996)
62. M.J. Bloemnik, J. Reedijk: *Met. Ions in Biol. Syst.*, ed. H. Sigel, A. Siegel, **10**, 11 (1980)
63. R.M. Izatt, D. Eatough, J.J. Christensen: *J. Chem. Soc., (A)*, 1301 (1967)
64. J. Kragten: *Atlas of Metal-Lig. Equilib. in Aqueous Sol.*, Wiley, New York, 576 (1978)
65. B.I. Nabivanets, L.V. Kalabina: *Russ. J. Inorg. Chem.*, **15**, 812 (1970)
66. Cs.G. Ágoston, T. Kowalik-Jankowska, I. Sóvágó: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3295 (1999)
67. Z. Nagy, I. Fábián, A. Bényei, I. Sóvágó: *J. Inorg. Biochem.*, **94**, 291 (2003)
68. Z. Nagy, I. Sóvágó: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2467 (2001)
69. P. Tsiveriotis, N. Hadjiliadis: *Coord. Chem. Rev.*, **190-192**, 171 (1999)
70. P. Tsiveriotis, N. Hadjiliadis, G. Stavropoulos: *Inorg. Chim. Acta*, **261**, 83 (1997)
71. P. Tsiveriotis, N. Hadjiliadis, I. Sóvágó: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 4267 (1997)
72. P. Tsiveriotis, N. Hadjiliadis: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 459 (1999)
73. C. Livera, L.D. Pettit, M. Bataille, H. Kozłowski, B. Radomska: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 661 (1987)
74. J. Ueda, N. Ikota, A. Hanaki, K. Koga: *Inorg. Chim. Acta*, **135**, 43 (1987)
75. R.P. Agarwal, D.D. Perrin: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 89 (1976)
76. R. Vogler, H. Vahrenkamp: *Eur. J. Inorg. Chem.*, 761 (2002)
77. M. Casolaro, M. Chelli, M. Ginanneschi, F. Laschi, M. Muniz-Miranda, A. M. Papini, G. Sbrana: *Spectrochim. Acta Part A*, **55**, 1675 (1999)
78. J. Ueda, A. Hanaki, N. Yoshida, T. Nakajima: *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1108 (1997)
79. R. Bonomo, F. Bonsignore, E. Conte, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, R. Purello, E. Rizzaralli: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1295 (1993)
80. T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta-Dolejsz, K. Wisniewska, L. Lankiewicz, H. Kozłowski: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 4511 (2000)
81. T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta-Dolejsz, K. Wisniewska, L. Lankiewicz: *J. Inorg. Biochem.*, **92**, 1 (2002)
82. R. Bonomo, L. Casella, L. De Gioia, H. Molinari, G. Impellizzeri, T. Jordan, G. Pappalardo, R. Purello, E. Rizzarelli: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2387 (1997)
83. F.W. Sunderman Jr., A.H. Varghese, O.S. Kroftova, S. Grbac-Ivankovic, J. Kotyza, A.K. Datta, M. Davis, W. Bal, K.S. Kasprzak: *Mol. Reprod. Dev.*, **44**, 507 (1996)
84. W. Bal, J. Lukszo, K. Bialkowski, K.S. Kasprzak: *Chem Res. Toxicol.*, **11**, 1014 (1998)
85. G. Pappalardo, G. Impellizzeri, R.P. Bonomo, T. Campagna, G. Grasso, M.G. Saita: *New J. Chem.*, **26**, 593 (2002)

86. Ch. Conato, W. Kamysz, H. Kozłowski, M. Luczkowski, Z. Mackiewicz, F. Mancini, P. Młynarz, M. Remelli, D. Valensin, G. Valensin: *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1694 (2003)
87. G. Bormans, O.M. Peeters, H. Vanbilloen, N. Blaton, A. Verbruggen: *Inorg. Chem.*, **35**, 6240 (1996)
88. D. Sanna, Cs.G. Ágoston, I. Sóvágó, G. Micera: *Polyhedron*, **20**, 937 (2001)
89. M. Orfei, M.C. Alcaro, G. Marcon, M. Chelli, M. Ginanneschi, H. Kozłowski, J. Brasun, L. Messori: *J. Inorg. Biochem.*, **97**, 299 (2003)
90. T. Karavelas, M. Mylonas, G. Malandrinou, J.C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, P. Młynarz, H. Kozłowski: *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 606 (2005)
91. D. Valensin, F.M. Mancini, M. Luczkowski, A. Janicka, K. Wisniewska, E. Gaggelli, G. Valensin, L. Lankiewicz, H. Kozłowski: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 16 (2004)
92. M. Luczkowski, K. Wisniewska, L. Lankiewicz, H. Kozłowski: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2266 (2002)
93. G. Arena, R.P. Bonomo, G. Impellizzeri, R.M. Izatt, J.D. Lamb, E. Rizzarelli: *Inorg. Chem.*, **26**, 795 (1987)
94. J.-P. Laussac, A. Robert, R. Haran, B. Sarkar: *Inorg. Chem.*, **25**, 2760 (1986)
95. J. Brasun, Ch. Gabbiani, M. Ginanneschi, L. Messori, M. Orfei, J. Swiatek-Kozłowska: *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 2016 (2004)
96. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge: *Biochem. J.*, **219**, 1 (1984)
97. T.A. Jacson, J. Xie, E. Yikilmaz, A.-F. Miller, T.C. Brunold: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10833 (2002)
98. B. Palenik, B. Brahamsha, F.W. Larimer, M. Land, L. Hauser, P. Chain, J. Lamerdin, W. Regala, E.E. Allen, J. McCarren, I. Paulsen, A. Dufresne, F. Partensky, E.A. Webb, J. Waterbury: *Nature*, **424**, 1037 (2003)
99. J.A. Tainer, E.D. Getzoff, K.M. Beem, J.S. Richardson, D.C. Richardson: *J. Mol. Biol.*, **160**, 181 (1982)
100. J.A. Tainer, E.D. Getzoff, J.S. Richardson, D.C. Richardson: *Nature*, **306**, 284 (1983)
101. J.-L. Pierre, P. Chautemps, S. Refaif, C. Beguin, A.E. Marzouki, G. Serratrice, E. Saint-Aman, P. Rey: *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 1965 (1995)
102. H.L. Zhu, L.M. Zheng, D.G. Fu, X.Y. Huang, M.F. Wu, W.X. Tang: *J. Inorg. Biochem.*, **70**, 211 (1998)
103. D. Li, S. Li, D. Yang, J. Yu, J. Huang, Y. Li, W. Tang: *Inorg. Chem.*, **42**, 6071 (2003)
104. S. Li, D. Li, D. Yang, Y. Li, J. Huang, K. Yub, W. Tang: *Chem. Commun.*, 880 (2003)
105. C.J. Feng, Q.H. Luo, Z.L. Wang, M.C. Shen, H.W. Wang, M.H. Zhao: *J. Inorg. Biochem.*, **75**, 1 (1999)
106. C.M. Liu, R.G. Xiong, X.Z. You, Y.J. Liu: *Polyhedron*, **15**, 4565 (1996)
107. J. Müller, K. Felix, C. Maichle, E. Lengfelder, J. Strahle, U. Weser: *Inorg. Chim. Acta*, **233**, 11 (1995)
108. J. Müller, D. Schübl, C. Maichle-Mössmer, J. Strahle, U. Weser: *J. Inorg. Biochem.*, **75**, 63 (1999)

109. M. Casolaro, M. Chelli, M. Ginanneschi, F. Laschi, L. Messori, M. Muniz-Miranda, A.M. Papini, T. Kowalik-Jankowska, H. Kozlowski: *J. Inorg. Biochem.*, **89**, 181 (2002)
110. B. Bóka, A. Myari, I. Sóvágó, N. Hadjiliadis: *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 113 (2004)
111. P. Tompa: *Természet világa*, 131 évf., 7. sz. (2000)
112. S.B. Prusiner: *N. Engl. J. Med.*, **344**, 1516 (2001)
113. T. Scheibel, J. Buchner: *Handbook of Experimental Pharmacology*, **172**, 199 (2006)
114. W. Rachidi, J. Riondel, H.M. McMahon, A. Favier: *Pathol. Biol.*, **53**, 244 (2005)
115. D.R. Brown: *Folia Neuropathol.*, **43**, 229 (2005)
116. S.B. Prusiner: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13363 (1998)
117. S.B. Prusiner: *Science*, **278**, 245 (1997)
118. M. Caramelli, G. Ru, P. Acutis, G. Forloni: *CNS Drugs*, **20**, 15 (2006)
119. D.R. Brown, H. Kozlowski: *Dalton Trans.*, 1907, (2004)
120. G.L. Millhauser: *Accounts of Chem. Res.*, **37**, 79 (2004)
121. D.J. Waggoner, T.B. Bartnikas, J.D. Gitlin: *Neurobiol. of Disease*, **6**, 221, (1999)
122. R. Zahn: *J. Mol. Biol.*, **334**, 477, (2003)
123. D.R. Brown, A. Besinger: *Biochem. J.*, **334**, 423 (1998)
124. A.I. Bush: *Chem. Biol.*, **4**, 184 (2000)
125. L.M. Sayre, G. Perry, M.A. Smith: *Chem. Biol.*, **3**, 220 (1999)
126. J.R. Requena, D. Groth, G. Legname, E.R. Stadtman, S.B. Prusiner, R.L. Levine: *PNAS*, **98**, 7171, (2001)
127. K. Barnham, C.L. Masters, A.I. Bush: *Nature Rev.*, **3**, 205, (2004)
128. A. Campbell, M.A. Smith, L.M. Sayre, S.C. Bondy, G. Perry: *Brain Res. Bull.*, **55**, 125, (2001)
129. E.M. Sigurdsson, D.R. Brown, M.A. Alim, H. Scholtzova, R. Carp, H.C. Meeker, F. Prelli, B. Frangione, T. Wisniewski: *J. Biol. Chem.*, **278**, 46199, (2003)
130. R.P. Bonomo, D. Grasso, G. Grasso, V. Guantieri, G. Impellizzeri, C. La Rosa, D. Milardi, G. Pappalardo, G. Tabbi, E. Rizzarelli: Metal Binding to Prion Protein; In: *Metal-Ligand Interactions in Molecular-, Nano-, and Macro-Systems in Complex Environments*, Eds.: N. Russo, D.R. Salahub, M. Witko; Kluwer, Dordrecht, pp. 19-36
131. N. Vassalo, J. Herms, Ch. Behrens, B. Krebs, K. Saeki, T. Onodera, O. Windl, H.A. Kretschmar: *Biochem. and Biophys. Res. Com.*, **332**, 75, (2005)
132. C.S. Burns, E. Aronoff-Spencer, G. Legname, S.B. Prusiner, W.E. Antholine, G.J. Gerfen, J. Peisach, G.L. Millhauser: *Biochem.*, **42**, 6794, (2003)
133. A.R. Thompson, S.R. Abdelraheim, M. Daniels, D.R. Brown: *J. Biol. Chem.*, **280**, 42750, (2005)
134. J.H. Viles, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, D.B. Goodin, P.E. Wright, H.J. Dyson: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2042, (1999)
135. R.P. Bonomo, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, G. Tabbi: *Chem. Eur. J.*, **6**, 4195, (2000)
136. M. Luczkowski, H. Kozlowski, M. Stawikowski, K. Rolka, E. Gaggelli, D. Valensin, G. Valensin: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2269, (2002)

137. C.S. Burns, E. Arnoff-Spencer, Ch.M. Dunham, P. Lario, N.I. Avdievich, W.E. Antholine, M.M. Olmstead, A. Vrieling, G.J. Gerfen, J. Peisach, W.G. Scott, G.L. Millhauser: *Biochem.*, **41**, 3991, (2002)
138. D. Valensin, M. Luczkowski, F.M. Mancini, A. Legowska, E. Gaggelli, G. Valensin, K. Rolka, H. Kozlowski: *Dalton Trans.*, 1284, (2004)
139. M. Chattopadhyay, E.D. Walter, D.J. Newell, P.J. Jackson, E. Arnoff-Spencer, J. Peisach, G.J. Gerfen, B. Bennett, W.E. Antholine, G. Millhauser: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12647, (2005)
140. M. Luczkowski, H. Kozlowski, A. Legowska, K. Rolka, M. Remelli: *Dalton Trans.*, 619, (2003)
141. P. Stanczak, M. Luczkowski, P. Juszczak, Z. Grzonka, H. Kozlowski: *Dalton Trans.*, 2102, (2004)
142. D. La Mendola, R.P. Bonomo, G. Impellizzeri, G. Maccarrone, G. Pappalardo, A. Pietropaolo, E. Rizzarelli, V. Zito: *J. Biol. Inorg. Chem.*, **10**, 463, (2005)
143. P. Stanczak, D. Valensin, P. Juszczak, Z. Grzonka, C. Migliorini, E. Molteni, G. Valensin, E. Gaggelli, H. Kozlowski: *Biochem.*, **44**, 12940, (2005)
144. Ch.E. Jones, S.R. Abdelraheim, D.R. Brown, J.H. Viles: *J. Biol. Chem.*, **279**, 32018, (2004)
145. M.F. Jobling, X. Huang, L.R. Stewart, K.J. Barnham, C. Curtain, I. Volitakis, M. Perugini, A.R. White, R.A. Cherny, C.L. Masters, C.J. Barrow, S.J. Collins, A.I. Bush, R. Cappai: *Biochem.*, **40**, 8073, (2001)
146. B. Belosi, E. Gaggelli, R. Guerrini, H. Kozlowski, M. Luczkowski, F.M. Mancini, M. Remelli, D. Valensin, G. Valensin: *Chem. Bio. Chem.*, **5**, 349, (2004)
147. M. Remelli, M. Donatoni, R. Guerrini, A. Janicka, P. Pretelegiani, H. Kozlowski: *Dalton Trans.*, 2876, (2005)
148. G. Di Natale, G. Grasso, G. Impellizzeri, D. La Mendola, G. Micera, N. Mihala, Z. Nagy, K. Ősz, G. Pappalardo, V. Rigó, E. Rizzarelli, D. Sanna, I. Sívágó: *Inorg. Chem.*, **44**, 7214, (2005)
149. M. Klewpatinond, J.H. Viles: *Biochem. J.*, **404**, 393, (2007)
150. I. Dupiereux, W. Zorzi, L. Lins, R. Brasseur, P. Colson, E. Heinen, B. Elmoualij: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **331**, 894, (2005)
151. D. Grasso, G. Grasso, V. Guantieri, G. Impellizzeri, C. La Rosa, D. Milardi, G. Micera, K. Ősz, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, D. Sanna, I. Sívágó: *Chem. Eur. J.*, **12**, 537, (2006)
152. D.R. Brown, V. Guantieri, G. Grasso, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, E. Rizzarelli: *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 133, (2004)
153. S. Lehmann: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **6**, 187, (2002)
154. G.S. Jackson, I. Murray, L.L.P. Hosszu, N. Gibbs, J.P. Waltho, A.R. Clarke, J. Collinge: *PNAS.*, **98**, 8531, (2001)
155. Ch.E. Jones, M. Klewpatinond, S.R. Abdelraheim, D.R. Brown, J.H. Viles: *J. Mol. Biol.*, **346**, 1393, (2005)
156. B.-S. Wong, S.G. Chen, M. Colucci, Z. Xie, T. Pan, T. Liu, R. Li, P. Gambetti, M.-S. Sy, D.R. Brown: *J. Neurochem.*, **78**, 1400, (2001)

157. N.-H. Kim, J.-K. Choi, B.-H. Jeong, J.-I. Kim, M.-S. Kwon, R. I. Carp, Y.-S. Kim: *FASEB J.*, **19**, 783, (2005)
158. Y. Nishida: *Z. Naturforsch.*, **58c**, 752, (2003)
159. D.R. Brown, F. Hafiz, L.L. Glasssmith, B.-S. Wong, I.M. Jones, Ch. Clive, S.J. Haswell: *Eur. Mol. Biol. Org. J.*, **19**, 1180, (2000)
160. R.N. Tsenkova, I.K. Iordanova, K. Toyoda, D.R. Brown: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **325**, 1005, (2004)
161. J. Levin, U. Bertsch, H. Kretzschmar, A. Giese: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **329**, 1200, (2005)
162. A. Giese, J. Levin, U. Bertsch, H. Kretzschmar: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **320**, 1240, (2004)
163. E. Gaggelli, F. Bernardi, E. Molteni, R. Pogni, D. Valensin, G. Valensin, M. Remelli, M. Luczkowski, H. Kozlowski: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 996, (2005)
164. A.P. Garnett, Ch.E. Jones, J.H. Viles: *Dalton Trans.*, 509, (2006)
165. L. Zékány, I. Nagypál: *Computation Methods for the Determination of Formation Constants*, ed.: D.J. Legget, Plenum Press, New York, p. 291 (1985)
166. H.M. Irving, M.G. Miles, L.D. Pettit: *Anal. Chim. Acta*, **38**, 475 (1967)
167. G. Gran: *Acta Chem. Scand.*, **4**, 559 (1950)
168. R.B. Martin: *Metal Ions in Biological Systems*, ed. H. Sigel, Marcel Dekker, New York, **1**, Ch. 4, p. 129, (1974)
169. R.P. Bonomo, F. Bonsignore, E. Conte, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, R. Purrello, E. Rizzarelli: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1295 (1993)
170. E. Prenesti, P.G. Daniele, M. Prencipe, G. Ostacoli: *Polyhedron*, **18**, 3233 (1999)
171. M. Luczkowski, H. Kozlowski, M. Stawikowski, K. Rolka, F. Gaggeli, D. Valensin, G. Valensin: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2269 (2002)
172. M. Luczkowski, H. Kozlowski, A. Legowska, K. Rolka, M. Remelli: *Dalton Trans.*, 619 (2003)
173. G. Pappalardo, G. Impellizzeri, T. Campagna: *Inorg. Chim. Acta*, **357**, 185 (2004)
174. M.J. Pushic, A. Rauk: *J. Biol. Inorg. Chem.*, **8**, 53 (2003)
175. D. Sanna, C.G. Ágoston, G. Micera, I. Sóvágó: *Polyhedron*, **20**, 3079 (2001)
176. B.J. Hathaway: *Struct. Bond.*, **57**, 55 (1984)
177. A.Jancsó, Z. Paksi, N. Jakab, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, T. Gajda: *Dalton Trans.*, 3187 (2005)
178. D. Sanna, G. Micera: nem közölt eredmények
179. P. Gockel, M. Gelinsky, R. Vogler, H. Vahrenkamp: *Inorg. Chim. Acta*, **272**, 115 (1998)
180. K. Várnagy, B. Bóka, I. Sóvágó, D. Sanna, P. Marras, G. Micera: *Inorg. Chim. Acta*, **275-276**, 440 (1998)
181. K. Ősz, B. Bóka, K. Várnagy, I. Sóvágó, T. Kurtán, S. Antus: *Polyhedron*, **21**, 2149, (2002)
182. B. Noszál, in: *Biocoordination Chemistry: Coordination Equilibria in Biologically Active Systems*, (ed.: K. Burger), Ellis Horwood, Chichester, New York, p. 18-55 (1990)

183. I. Sóvágó, D. Sanna, A. Dessi, K. Várnagy, G. Micera: *J. Inorg. Biochem.*, **63**, 99 (1996)
184. M. Klewpatinond, J.H. Viles: *FEBS Letters*, **581**, 1430 (2007)
185. T.G. Appleton: *Coord. Chem. Rev.*, **166**, 313 (1997)
186. B. Bóka, Z. Nagy, K. Várnagy, I. Sóvágó: *J. Inorg. Biochem.*, **83**, 77 (2001)
187. I. Sóvágó, A. Kiss, B. Lippert: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 489 (1995)
188. J.R. Requena, M.N. Dimitrova, G. Legname, S. Teixeira, S.B. Prusiner, R.L. Levine: *Arch. Biochem. Biophys.*, **432**, 188, (2004)
189. H.E.M. McMahon, A. Mangé, N. Nishida, C. Creminon, D. Casanova. S. Lehmann: *J. Biol. Chem.*, **276**, 2286, (2001)
190. K. Ósz, Z. Nagy, G. Pappalardo, G. Di Natale, D. Sanna, G. Micera, E. Rizzarelli, I. Sóvágó: *Chem. Eur. J.*, **13**, 7129, (2007)
191. E.D. Walter, D.J. Stevens, M.P. Visconte, G.L. Millhauser: *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 15440 (2007)

8. FÜGGELÉK

Az értekezés alapját képező közlemények:

1. Daniele Sanna, Giovanni Micera, Csilla Kállay, Viktória Rigó and Imre Sóvágó

Copper(II) Complexes of N-terminal Protected Tri- and Tetrapeptides Containing Histidine Residues

Dalton Transactions, 2702-2707 (2004)

2. Imre Sóvágó, Katalin Ósz, Zoltán Nagy, Viktória Rigó, Daniele Sanna, Diego La Mendola, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo and Enrico Rizzarelli

Transition Metal Complexes of Peptide Fragments of Prion Proteins

Advances in Coordination, Bioinorganic and Inorganic Chemistry, 363-376 (2005)

3. Giuseppe Di Natale, Giulia Grasso, Giuseppe Impellizzeri, Diego La Mendola, Giovanni Micera, Nikoletta Mihala, Zoltán Nagy, Katalin Ósz, Giuseppe Pappalardo, Viktória Rigó, Enrico Rizzarelli, Daniele Sanna, Imre Sóvágó

Copper(II) Interaction with Unstructured Prion Domain Outside the Octarepeat Region: Speciation, Stability and Binding Details of Copper(II) Complexes with PrP106-126 Peptides

Inorganic Chemistry, **44**, 7214-7225 (2005)

4. Viktória Józai, Zoltán Nagy, Katalin Ósz, Daniele Sanna, Giuseppe Di Natale, Diego La Mendola, Giuseppe Pappalardo, Enrico Rizzarelli and Imre Sóvágó

Transition Metal Complexes of Terminally Protected Peptides Containing Histidyl Residues

Journal of Inorganic Biochemistry, **100**, 1399-1409 (2006)

5. Viktória Józai, Zoltán Nagy, Katalin Ósz, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo, Enrico Rizzarelli and Imre Sóvágó

Copper(II) and zinc(II) mixed metal complexes of large peptide fragments of prion protein

(előkészületben)

Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások és poszterek:

1. Sóvágó I., Ósz K., Nagy Z., Rigó V.
A prion protein peptidfragmenseinek komplexképződési folyamatai
XXXIX. Komplexkéimiai Kollokvium, 2004. május 26-28, Gárdony
2. Rigó V., Kállay Cs., Sóvágó I.
A Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumának modellezésére alkalmas hisztidintartalmú peptidek Cu(II)komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata
Fiatalkárpátaljai magyar kutatók a természettudományi kutatásban, 2004. október 30, Beregszász, Ukrajna
3. Rigó V., Kállay Cs., Sóvágó I.
A Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumának modellezésére alkalmas hisztidintartalmú peptidek Cu(II)komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata
X. Nemzetközi Vegyészkonferencia, 2004. november 12-14, Kolozsvár, Románia
4. Rigó Viktória, Ósz Katalin, Nagy Zoltán, Sóvágó Imre
A prion protein peptidfragmenseinek átmenetifém komplexei
XL. Komplexkéimiai Kollokvium, 2005. május 18-20, Dobogókő
5. Imre Sóvágó, Katalin Ósz, Zoltán Nagy, Viktória Rigó, Daniele Sanna, Diego La Mendola, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo, Enrico Rizzarelli
Transition Metal Complexes of Peptide Fragments of Prion Proteins
20th International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry, 2005. június 5-10, Smolenice, Szlovákia
6. Viktória Jósai, Zoltán Nagy, Katalin Ósz, Imre Sóvágó, Daniele Sanna, Giovanni Micera, Giuseppe Pappalardo, Diego La Mendola, Giuseppe Di Natale, Enrico Rizzarelli (poszter)
Transition metal complexes of peptide fragments of prion protein outside the octarepeat region
20th International Conference on Solution Chemistry, 2005. augusztus 21-25, Portoroz, Szlovénia
7. Viktória Jósai, Zoltán Nagy, Katalin Ósz, Imre Sóvágó, Daniele Sanna, Giovanni Micera, Giuseppe Pappalardo, Diego La Mendola, Giuseppe Di Natale, Enrico Rizzarelli (poszter)
Transition metal complexes of peptide fragments of prion protein outside the octarepeat region
X International Symposium on Bioinorganic Chemistry – Challenge for new generation, 2005. szeptember 20-25, Szklarska Poreba, Lengyelország

8. Imre Sóvágó, Katalin Ősz, Zoltán Nagy, Viktória Józai, Daniele Sanna, Giovanni Micera, Diego La Mendola, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo, Enrico Rizzarelli

Copper(II) Complexes of the (84-114) Peptide Fragment of Human Prion Protein

X International Symposium on Bioinorganic Chemistry – Challenge for new generation, 2005. szeptember 20-25, Szklarska Poreba, Lengyelország

Az értekezés anyagához szorosan nem kapcsolódó előadások és poszterek:

1. I. Sóvágó, K. Ősz, Z. Nagy, Cs. Kállay, V. Rigó, D. Sanna, G. Micera, G. Pappalardo, E. Rizzarelli

Copper(II) complexes of peptides of histidine. Models of the binding sites of the enzyme CuZn-SOD and prion proteins

EUROBIC 7, 2004. augusztus 29- szeptember 2, Garmisch-Partenkirchen, Németország

2. Katalin Ősz, Zoltán Nagy, Viktória Rigó, Imre Sóvágó, Daniele Sanna, Giovanni Micera, Diego La Mendola, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo, Enrico Rizzarelli

A possible mechanism for formation of prion diseases: copper(II) coordination to prion protein fragments containing histidines

Gordon Research Conferences in Inorganic Reaction Mechanisms, 2005. február 13-18, Ventura, CA, USA (poszter)

3. Ősz Katalin, Nagy Zoltán, Rigó Viktória, Sóvágó Imre

A HuPrP(84-114) protonálódási és réz(II)ionnal való komplexképződési makro- és mikrofolyamatai

XL. Komplexkémiiai Kollokvium, 2005. május 18-20, Dobogókő

4. Katalin Ősz, Zoltán Nagy, Viktória Józai, Imre Sóvágó, Daniele Sanna, Giovanni Micera, Diego La Mendola, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo, Enrico Rizzarelli (poszter)

Protonation and coordination macro- and microscopic equilibria in the copper(II) – Human Prion Protein (84-114) system

20th International Conference on Solution Chemistry, 2005. augusztus 21-25, Portoroz, Szlovénia

5. Katalin Ősz, Zoltán Nagy, Viktória Józai, Imre Sóvágó, Daniele Sanna, Giovanni Micera, Diego La Mendola, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo, Enrico Rizzarelli (poszter)

Protonation and coordination equilibria in the copper(II) – Human Prion Protein (84-114) system

X International Symposium on Bioinorganic Chemistry – Challenge for new generation, 2005. szeptember 20-25, Szklarska Poreba, Lengyelország

**HISZTIDINTARTALMÚ OLIGOPEPTIDEK
KOMPLEXXKÉPZŐ SAJÁTSÁGAI. A PRION PROTEIN
PEPTIDFRAGMENSEI FÉMION-SZELEKTIVITÁSÁNAK
VIZSGÁLATA.**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a kémia tudományban

Írta: Jószaik Viktória okleveles ökológus, tanár

Készült a Debreceni Egyetem kémia doktori programja
(koordinációs kémia alprogramja) keretében

Témavezető: Dr. Sóvágó Imre egyetemi tanár

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.

A doktori szigorlat időpontja: 200...

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 200...