

1949

#### Tau peptidfragmensek átmenetifémkomplexeinek koordinációs kémiai sajátságai

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

**Balogh Bettina Diána** 

Témavezető: Prof. Dr. Várnagy Katalin, egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács Kémia Tudományok Doktori Iskola Debrecen, 2023. Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács **Kémia Tudományok Doktori Iskola K/2 programja** keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2023.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy **Balogh Bettina Diána** doktorjelölt **2018-2022** között a fent megnevezett Doktori Iskola **K**/2 programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult.

Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2023.

a témavezető aláírása

### Tau peptidfragmensek átmenetifémkomplexeinek koordinációs kémiai sajátságai

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a Kémia tudományágban

Írta: Balogh Bettina Diána okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémia Tudományok doktori iskolája (Koordinációs és analitikai kémiai programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Várnagy Katalin, egyetemi tanár

Az értekezés bírálói:

Dr	
Dr	

#### A bírálóbizottság:

elnök:	Dr	
tagok:	Dr	
	Dr	
	Dr	
	Dr	

Az értekezés védésének időpontja: 2023. .....

#### KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm *Prof. Dr. Gáspár Attila* egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette, hogy doktori értekezésemet az általa vezetett Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken készítsem el.

Öszinte hálával tartozom témavezetőmnek, *Prof. Dr. Várnagy Katalin* egyetemi tanárnak, aki bevezetett a bioszervetlen és koordinációs kémia világába. Hálás vagyok a rengeteg szakmai és emberi támogatásért, amit tőle kaptam nemcsak a doktori képzés négy éve alatt, de a megelőző BSc-s és MSc-s tanulmányaim során is.

Köszönet illeti *Dr. Farkas Etelka* professor emeritát, *Dr. Sóvágó Imre* professor emeritust és *Prof. Dr. Buglyó Péter* egyetemi tanárt, akik szívesen segítettek a felmerülő kérdéseim megválaszolásában és munkámat tanácsaikkal támogatták.

Köszönettel tartozom a *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport* egykori és jelenlegi tagjainak, akiknek hála a munka kellemes és baráti hangulatban telt. Hálával tartozom *Dr. Csire Gizellának*, aki BSc-s hallgatóként megismertetett a különféle készülékek működésével és *Hőgyéné Dr. Grenács Ágnes Juditnak*, akitől rengeteget tanultam a szilárdfázisú peptidszintézis fortélyairól. Köszönöm *Dr. Lukács Mártonnak* az oldószerelegyben végzett vizsgálatoknál nyújtott segítségét és tanácsait. Szeretném megköszönni *Bodnár Nikolett* és *Székely Enikő* doktorandusz társaimnak a közös beszélgetéseket, a vidám perceket, a szakmai és baráti támogatást.

Köszönettel tartozom *Török Cintia Klaudia*, *Piskolti Noémi* és *Keczán Petra Anna* hallgatóknak a közös munkáért és a mérésekben nyújtott segítségért.

Köszönöm Dr. Csire Gizellának és Dr. Nagy Lajos egyetemi docensnek a tömegspektrumok felvételét.

Köszönöm *Bogdányi-Fekete Orsolyának* és *Dancs Grétának* a műszaki segítséget, valamint gyakorlati tanácsaikat. Köszönet illeti *Nagyné Dombi Gizella* tanszéki ügyintézőt a hivatalos ügyek intésében nyújtott segítségéért.

Hálával tartozom *Dr. Giuseppe Pappalardonak* és kutatócsoportjának az ESRspektrumok felvételéért és kiértékeléséért. Köszönöm, hogy a cataniai tanulmányútjaim során szívesen fogadtak és mindenben segítettek, hogy a kint töltött idő a lehető leggyümölcsözőbben teljen. Köszönöm *Dr. Giuseppe Di Natalenak*, a tömegspektrometriás vizsgálatok során nyújtott segítségét, valamint a spektrumok kiértékelését. Köszönettel tartozom *Michele F.M. Sciaccanak* az inhibíciós vizsgálatok eredményeinek értelmezéséért.

Végül, de nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak, külön kiemelve *szüleimet* és *testvéremet*, akik tanulmányaim alatt végig mellettem álltak, támogattak és hittek bennem.

A kutatások anyagi támogatásáért az NKFIH K115480, valamint a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 számú pályázatának tartozom köszönettel. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg. A kutatómunkát a Tudományos Mecenatúra MEC\_R 141019 számú és az NKFIH 2019-2.1.11-TÉT-2019-00055 számú pályázata is támogatta.

### Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	1
2.	Célkitűzés	2
3.	Irodalmi áttekintés	4
	3.1. A vizsgált átmenetifémionok biológiai jelentősége	4
	3.1.1. A réz(II)ion élettani hatása	4
	3.1.2. A nikkel(II)ion élettani hatása	6
	3.1.3. A cink(II)ion élettani hatása	8
	3.2. A peptidek koordinációs kémiája	9
	3.2.1. Hisztidintartalmú peptidek komplexképződési folyamatai	. 11
	3.2.2. Ciszteinil-oldalláncot tartalmazó peptidek komplexképződési folyamatai .	. 18
	3.2.3. Vegyes kötőhelyű, hisztidil- és ciszteinil-oldalláncot tartalmazó peptidek komplexképződési folyamatai	. 19
	3.3. A neurodegeneratív betegségek áttekintése, taupátiák	. 20
	3.3.1. Az Alzheimer-kór kialakulásáért felelős tényezők	. 21
	3.3.2. A tau fehérje jellemzése, szerepe az Alzheimer-kór lefolyásában	. 23
	3.3.3. A fémionok szerepe a neurodegeneratív megbetegedésekben	. 26
4.	Kísérleti módszerek és alkalmazott technikák	. 30
	4.1. Felhasznált vegyszerek, vizsgált ligandumok	. 30
	4.2 Szilárdfázisú peptidszintézis	. 33
	4.4. UV-látható (UV-Vis) spektrofotometria	. 41
	4.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia	. 43
	4.6. Elektronspin rezonancia (ESR) spektroszkópia	. 45
	4.7. Tömegspektrometria (ESI-MS)	. 46
	4.8. Thioflavin T (ThT) assay	. 47
5.	Kísérleti eredmények és értékelésük	. 49
	5.1. A tau(326-333) fragmens és mutánsai komplexképződési folyamatai	. 49
	5.1.1. A natív tau(326-333) fragmens és mutánsai réz(II)komplexei	. 50
	5.1.2. A natív <i>tau</i> (326-333) fragmens és mutánsai nikkel(II)komplexei	. 56
	5.1.3. A natív <i>tau</i> (326-333) fragmens és mutánsai cink(II)komplexei	. 60
	5.2. A natív tau(320-333) ligandum és mutánsa komplexképződési folyamatai	. 63
	5.2.1. A natív <i>tau</i> (320-333) ligandum és mutánsa nikkel(II)komplexei	. 64
	5.2.2. A natív <i>tau</i> (320-333) ligandum és mutánsa cink(II)komplexei	. 69
	5.2.3. A natív tau(320-333) ligandum vegyes nikkel(II)/cink(II)-komplexei	. 72

5.3 A tau(30-34)(327-332) kiméra peptid komplexképződési folyamatai
5.3.1. A <i>tau</i> (30-34)(327-332) kiméra peptid réz(II)komplexei
5.3.2. A <i>tau</i> (30-34)(327-332) kiméra peptid cink(II)komplexei
5.3.3. A tau(30-34)(327-332) kiméra peptid vegyes réz(II)/cink(II)-komplexei 84
5.4. A két különböző kötőhelyet tartalmazó modellpeptid, a HAVAHHH-NH2 komplexképződési folyamatai
5.4.1. A HAVAHHH-NH2 ligandum réz(II)komplexei
5.4.2. A HAVAHHH-NH2 ligandum nikkel(II)komplexei
5.4.3. A HAVAHHH-NH <sub>2</sub> ligandum cink(II)komplexei
5.4.4. A HAVAHHH-NH2 ligandum vegyes réz(II)/nikkel(II)-komplexei
5.5. A különböző kötőhelyek fémionkötő-affinitása
5.6. A <i>tau(326-333) KL</i> ligandum komplexképződési és potenciális inhibíciós sajátságai
5.6.1. A <i>tau</i> (326-333) KL ligandum réz(II)komplexei
5.6.2. A <i>tau</i> (326-333) KL peptid potenciális aggregációt gátló tulajdonságának vizsgálata
5.7. A -TMH- szekvenciát tartalmazó peptidek mint potenciális réz(II)kelátorok 103
6. Összefoglalás
7. Summary
8. Irodalomjegyzék115
9. Függelék 129

Az értekezésben elő	forduló rövidítések	jegyzéke

A, Ala	alanin
C, Cys	cisztein
D, Asp	aszparaginsav
F, Phe	fenilalanin
G, Gly	glicin
H, His	hisztidin
I, Ile	izoleucin
K, Lys	lizin
L, Leu	leucin
M, Met	metionin
N, Asn	aszparagin
P, Pro	prolin
Q, Gln	glutamin
S, Ser	szerin
T, Thr	treonin
V, Val	valin
	amiloid-β
$A\beta(8-16)$ mAH	Ac-SGAEGAHQK-NH <sub>2</sub>
$A\beta(8-16)$ mHA	Ac-SGAEGHAQK-NH <sub>2</sub>
Aβ(8-16)mHH	Ac-SGAEGHHQK-NH <sub>2</sub>
Αβ(1-42)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDV
	GSNKGAIIGLMVGGVVIA
Ac-	acetil (védőcsoport)
ACN	acetonitril
AcOH	ecetsav
$Ac_2O$	ecetsavanhidrid
AK	Alzheimer-kór
APP	amiloid prekurzor protein
ATCUN	aminoterminális réz- és nikkelkötőhely
	(Amino Terminal Cu and Ni binding
	site)
Boc	terc-butoxi-karbonil (védőcsoport)
CD	cirkuláris dikroizmus
CNR-IBB	Consiglio Nazionale Delle Ricerche -
	Instituto Di Biostrutture e Bioimmagini
DIPEA	N,N-diizopropil-etilamin
DMF	<i>N</i> , <i>N</i> -dimetil-formamid

DMSO	dimetil-szulfoxid
DODT	2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol
ESI	elektroporlasztásos ionizáció
	(electrospray ionization)
ESR (EPR)	elektronspin rezonancia spektroszkópia
	(elektron paramágneses rezonancia
	spektroszkópia)
Et <sub>2</sub> O	dietiléter
fiziológiás pH	a pH ~ 6,8-7,4 tartományt értem alatta
Fmoc	9-fluorenil-metoxi-karbonil
	(védőcsoport)
HOBt·H <sub>2</sub> O	N-hidroxi-benztriazol hidrát
HPLC	nagyhatékonyságú
	folyadékkromatográfia
H. pylori	Helicobacter pylori
Hsp	hősokkfehérje (Heat shock protein)
HuPrP(76-91)	Ac-PHGGGWGQPHGGGWGQ-NH <sub>2</sub>
HuPrP(76-114)	Ac-PHGGGWGQPHGGGWGQGGG
× /	THQWNKPSKPKTNMKHMAG-NH <sub>2</sub>
HuPrP(84-114)	Ac-PHGGGWGOGGGTHOWNKPSKP
× /	KTNMKHMAG-NH <sub>2</sub>
HuPrP(84-114)His85Ala	Ac-PAGGGWGQGGGTHQWNKPSKP
	KTNMKHMAG-NH <sub>2</sub>
HuPrP(84-114)His96Ala	Ac-PHGGGWGQGGGTAQWNKPSKP
× /	KTNMKHMAG-NH <sub>2</sub>
HuPrP(84-114)His111Ala	Ac-PHGGGWGQGGGTHQWNKPSKP
× /	KTNMKAMAG-NH <sub>2</sub>
HuPrP(91-115)	Ac-GOGGGTHOWNKPSKPKTNMK
	HAGA-NH <sub>2</sub>
L	ligandum
$\log \beta [M_p H_q L_r]$	bruttó képződési / stabilitási állandó
$\log K(M+N_{Im})$	az oldalláncbeli imidazolilcsoportok
	koordinálódásával képződő makrokelát
	szerkezetű komplexek stabilitását
	jellemző állandó
М	mol/dm <sup>3</sup> egységben kifejezett
	koncentráció
MALDI	mátrix által segített lézer
	deszorpció/ionizáció (Matrix Assisted
	Laser Desorption/Ionization)

MAPT	mikrotubulushoz kötött tau fehérje (Microtubule Associated Tau Protein)
m/z	tömeg/töltés
N <sup>-</sup>	deprotonálódott amidnitrogán
NEK	neurofibrilláris köteg
	amin anitra gén
-INE12	
N(IM)	nisztidin imidazolnitrogen
	N-metil-2-pirrolidon
pCu(II)	a ligandumhoz nem kotott rez(11)ion
	egyensúlyi koncentrációjának tízes alapú
	negativ logaritmusa ( $c_{lig} = 1 \cdot 10^{-9} M$ ,
	$c_{Cu(II)} = 1 \cdot 10^{-6} M$
p <i>K</i>	deprotonálódási állandó
R(VCS)	oldalláncbeli védőcsoport
$S^{-}$	tiolátkénatom
SH	tiolcsoport
SOD	szuperoxid-dizmutáz
tau(9-16)	Ac-EVMEDHAG-NH <sub>2</sub>
tau(26-33)	Ac-QGGYTMHQ-NH <sub>2</sub>
tau(26-33)m	Ac-KGGYTMHK-NH <sub>2</sub>
tau(326-333)	Ac-GNIHHKPG-NH <sub>2</sub>
tau(326-333)mA	Ac-GNIHHKAG-NH <sub>2</sub>
tau(326-333)mG	Ac-GNGHHKPG-NH <sub>2</sub>
tau(326-333)mGA	Ac-GNGAHKPG-NH <sub>2</sub>
tau(326-333)mGH	Ac-GNGHAKPG-NH <sub>2</sub>
tau(326-333) KL	Ac-GNIHHKPGKLVFF-NH <sub>2</sub>
tau(320-333)	Ac-SKCGSLGNIHHKPG-NH2
tau(320-333)mH	Ac-SKCGSLGNIHHHKPG-NH <sub>2</sub>
tau(30-34)(327-332)	Ac-TMHQDNIHHKP-NH <sub>2</sub>
tau(243-274)(305-324)(337-	Ac-LQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTE
347) vagy K19	NLKHQPGGGKKVQIVYKPVDLSKV
,	TSKCGSVEVKSEKLDFK-NH2
tau(256-273)	Ac-VKSKIGSTENLKHOPGGG-NH2
tau(305-324)	Ac-KVOIVYKPVDLSKVTSKCGS-
×	NH <sub>2</sub>
tau(323-335)	Ac-GSLGNIHHKPGGG-NH <sub>2</sub>
TBTU	2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1.1.3.3-
	tetrametilammónium-tetrafluoroborát
tBu	<i>terc</i> -butil (védőcsoport)
TFA	trifluorecetsav
ThT	Thioflavin T

TIS	triizopropil-szilán
TOF	repülési idő ( <b>t</b> ime <b>o</b> f <b>f</b> light)
Trt	tritil (védőcsoport)
UV-Vis	ultraibolya-látható
ZnT3	cinktranszporter 3 fehérje

#### 1. Bevezetés

Napjainkban világszerte rohamosan növekszik az összefoglaló néven neurodegeneratív elváltozásoknak nevezett betegségekben szenvedők száma. Ezen kórképek egyike az Alzheimer-kór (AK), mely főként a 65 év feletti korosztály körében gyakori, és mára a fejlett országok elöregedő társadalmának egyik vezető halálokává vált. A – jelenlegi ismereteink szerint – gyógyíthatatlan kórral való küzdelem akár 10-12 évig is elhúzódhat, mely idő alatt a beteg mentális és fizikai állapota fokozatosan leépül, míg végül állandó felügyeletre és ellátásra szorul. Ebből adódóan az AK-ban szenvedők életminőségének javítása nemcsak az egészségügyi, de a szociális ellátó rendszerre is jelentős terhet ró, melynek költsége meghaladja az évi 200-300 milliárd dollárt [1].

A betegség kialakulásának pontos mechanizmusa a mai napig nem ismert, de a feltételezések szerint két fehérje, az amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) és a tau protein kóros konformációváltozása, majd ezt követő aggregációja kulcsszerepet játszik az idegsejtek pusztulásában. A szerkezetváltozás okait illetően számos elmélet született. Ezek egyike az átmenetifémionok – elsősorban a réz(II)-, vas(II/III)- és cink(II)ionok – szerepét emeli ki, melyek amellett, hogy megnövekedett koncentrációban vannak jelen az agyi szövetekben az egészséges szinthez képest, a fehérjeaggregátumokban is megtalálhatók. Mindkét említett protein rendelkezik a fémionok megkötésére alkalmas, nagy affinitású kötőhelyekkel, ami alátámasztja, hogy a fehérjék és a fémionok közötti kölcsönhatások hozzájárulhatnak az  $A\beta$  és a tau hibás feltekeredéséhez, ezen keresztül pedig a kór kialakulásához.

A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén működő Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportban évtizedek óta folynak olyan kutatások, melyek az idegrendszert érintő neurodegeneratív elváltozásokban szerepet játszó fehérjék, peptidfragmensek és a biogén fémionok között kialakuló kölcsönhatások megértését célozzák. A prion protein és az  $A\beta$ átmenetifémionokkal alkotott komplexeinek szisztematikus vizsgálatát követően a Kutatócsoportban jelenleg a tau fehérje fémionkötő-képességének tanulmányozása folyik. PhD munkám során ezekbe a kutatásokba kapcsolódtam be.

#### 2. Célkitűzés

Az utóbbi néhány évtizedben ugyan számos közlemény született, melyek az amiloid-β Alzheimer-kórban betöltött szerepét kutatták, a tau fehérje vizsgálata kevesebb figyelmet kapott. Az eddigi eredmények alapján a vas(II/III)-, réz(II)- és cink(II)ionok taupátiákban betöltött szerepe ellentmondásos, továbbá az egyes fémionok molekulán belüli elsődleges kötőhelye is tisztázásra vár.

Az értekezés középpontjában a tau fehérje R3 mikrotubuluskötő régiójának két szomszédos hisztidil-oldalláncát (His329-His330) tartalmazó peptidfragmensek komplexképződési folyamatainak vizsgálata áll. A biomolekulákkal – így a tau fehérjével – foglalkozó kutatások sok esetben csak a fiziológiás pH-tartományban lejátszódó folyamatokra és az egymagvú fémkomplexek jellemzésére koncentrálnak. Munkám során így célul tűztem ki az Ac-GNIHHKPG-NH2 szekvenciájú *tau(326-333)* ligandum teljeskörű oldate-gyensúlyi vizsgálatát, valamint a kialakuló koordinációs izomerszerkezetek kötésmódjának leírását. Ennek érdekében a natív fragmens több pontmutánsának (Ac-GNGHHKPG-NH2: *tau(326-333)mG*, Ac-GNGAHKPG-NH2: *tau(326-333)mGA*, Ac-GNGHAKPG-NH2: *tau(326-333)mGH* és Ac-GNIHHKAG-NH2: *tau(326-333)mA*) vizsgálatát is terveztem.

A hisztidin imidazolnitrogének mellett a cisztein tiolátcsoportja is kitűnő kötőhelyet jelent – a tanulmányozott átmentifémionok közül elsősorban – a cink(II)ionok számára, így a vizsgálatok folytatásaként a szomszédos hisztidinek mellett ciszteinil-oldalláncot is tartalmazó *tau(320-333)* ligandum (Ac-SKCGSLGNIHHKPG-NH<sub>2</sub>) oldategyensúlyi viselkedésének megismerése volt a célom. A két potenciális kötőhelyet tartalmazó, hosszabb fragmens vizsgálata a valóshoz közelebbi képet adhat a cink(II) és a tau fehérje között lejátszódó komplexképződési folyamatokról. Mivel a biológiai rendszerekben a fémion gyakran tetraéderes koordinációs környezetben található, a három szomszédos hisztidil-oldalláncot tartalmazó Ac-SKCGSLGNIHHHKPG-NH<sub>2</sub> szekvenciájú mutáns peptid (*tau(320-333)mH*) vizsgálatát is terveztem.

A tau származékok komplexképződési folyamatait elsősorban az élettani szempontból fontos réz(II) és cink(II) jelenlétében terveztem tanulmányozni, mely fémionok feltehetően az AK kialakulásában is szerepet játszanak. Ezek mellett, a réz(II)komplexek szerkezeti leírását megkönnyítendő, a nikkel(II)ionnal alkotott részecskék vizsgálatát is terveztem. Továbbá, célom volt több fémiont tartalmazó rendszerek vizsgálata, melyek a valóshoz közelebbi képet festenek a biológiai rendszerekről.

Mivel a natív szekvenciák fémionkötőhelyeinek kémiai környezete eltér, terveim között szerepelt olyan modellpeptidek vizsgálata, melyek egy molekulán belül tartalmaznak elkülönült kötőhelyeket. Ezek a molekulák lehetőséget biztosítanak a különböző kémiai környezetben található horgonycsoportok fémionmegkötő-képességének összehasonlítására, illetve az egyes kötőhelyek szelektivitásának tanulmányozására. A *Kutatócsoportban* végzett korábbi vizsgálatok a –TMH– szekvencia kiemelkedő réz(II)kötő képességére utaltak [2], így választásom egy olyan ligandumra esett, mely a His329-His330 imidazolil-oldalláncok mellett a His32 hisztidint is tartalmazza. A különböző kémiai környezetű hisztidinek komplexképződési folyamatait az Ac-TMHQDNIHHKP-NH<sub>2</sub> szekvenciájú (*tau*(30-34)(327-332)), úgynevezett kiméra peptiden keresztül terveztem vizsgálni.

A terminális funkciós csoportok, különösen az aminocsoport hozzáférhetősége jelentős hatást gyakorol a komplexképződési folyamatokra. Terveim között szerepelt a három hisztidil-oldallánc mellett a "hisztaminszerű" kötésmódra lehetőséget biztosító horgonycsoportokat ([NH<sub>2</sub>, N(Im)]) tartalmazó, HAVAHHH-NH<sub>2</sub> ligandum fémionkötő-képességének tanulmányozása. A peptid fémionkötő-affinitásának összehasonlítása a terminálisan védett tau fragmensek eredményeivel koordinációs kémiai szempontból egy teljesebb kép kialakítását teszi lehetővé.

A tau fragmensek oldategyensúlyi viselkedésének és koordinációs kémiai sajátságainak feltárása mellett további célom volt a tau(326-333) KL (Ac-GNIHHKPGKLVFF-NH<sub>2</sub>) ligandum potenciális aggregációt gátló viselkedésének tanulmányozása egy nemzetközi együttműködés keretében. A peptid és az  $A\beta(1-42)$  közötti kölcsönhatások jobb megismerése lehetőséget teremt annak megértésére, hogy a tau fehérje miként befolyásolja az amiloid- $\beta$  aggregációs folyamatait.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. A vizsgált átmenetifémionok biológiai jelentősége

#### **3.1.1.** A réz(II)ion élettani hatása [3,4]

A rézkarpereceket és réztartalmú kenőcsöket hosszú ideje alkalmazzák a népi gyógyászatban izom- és ízületi fájdalmak enyhítésére, az elem biokémiai szerepét azonban csak a XX. században ismerték fel. Mára nyilvánvalóvá vált, hogy a réz elengedhetetlen a növekedéshez és az egészséges fejlődéshez, nyomnyi mennyiségben szinte valamennyi élőlény számára létfontosságú. Ebből adódóan a fémion igen elterjedt mind a növény-, mind az állatvilágban, de különféle enzimek és fehériék alkotójaként az emberi szervezet megfelelő működésében is fontos szerepet játszik. A szervezetbe jutott réz döntően a bélből szívódik fel aktív transzport révén, szállításában elsődlegesen két fehérje, az albumin és a ceruloplazmin játszik szerepet. Az albumin nagy stabilitással képes kötni a rezet az ún. ATCUN motivumon<sup>1</sup> keresztül, [NH<sub>2</sub>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] kötésmóddal. Míg az albuminhoz kötött réz mobilis, a ceruloplazmin inertebb komplexet képez a fémionnal [5,6]. A protein maximálisan hat réz(II)ion koordinálására képes, továbbá egy hárommagvú rézcentrumot is tartalmaz, mely a fehérje ferroxidáz funkcióját biztosítja. Ezáltal a ceruloplazminnak a rézszállításon kívül egy másik fontos szerepe is van: a vas(II)  $\rightarrow$  vas(III) átalakulást katalizálja. A ceruloplazmin ferroxidáz szerepéből fakadóan a réz közvetetten a másik fémion anyagcseréjében is érintett. Ebből adódóan hiánya, valószínűleg a szervezet ferroxidáz-aktivitásának csökkenése révén, akár vérszegénységhez is vezethet [7]. A fémionnal összefüggésben jól ismert hiánybetegség a Menkes-kór vagy göndör haj szindróma [8], amit a réztranszportban szerepet játszó ATP7a fehérjét kódoló gén mutációja okoz. Míg a Menkes-kór jellemző tünete a réz hiánya, a Wilson-kórban [9] szenvedők máj- és agyszöveteiben a fémion feleslege halmozódik fel. A betegség a szervezet réztároló képességének örökletes zavara, kialakulásáért az ATP7b fehérjét kódoló gén mutációja a felelős. A réziont kapcsolatba hozzák az oxidatív stressz kialakulásával is, hiszen a Fenton- vagy Haber-Weiss-reakción keresztül képes reaktív oxigén származékok (pl. hidroxilgyökök) képződését katalizálni. Sőt, jelenlegi ismereteink szerint a fémion érintett lehet egyes neurodegeneratív betegségek kialakulásában is [10].

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Az *ATCUN motívum* elnevezés az angol "Amino Terminal Cu and Ni binding site" kifejezésből származik, jelentése: aminoterminális réz- és nikkelkötőhely. A terminális amino-, két deprotonálódott amid- és a hisztidin imidazol-nitrogénatomjának koordinálódásával kialakuló [NH<sub>2</sub>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] típusú kötésmódot "albuminszerű" koordinációnak is nevezi a szakirodalom.

Ebből a rövid áttekintésből is kitűnhet mennyire fontos a rézszint szigorú szabályozása: az egészséges idegi működéshez szükség van rézionokra, de a sejteken belül a szabad fémion koncentrációját nagyon alacsony szinten kell tartani. Egy átlagos testsúlyú felnőtt szervezete mintegy 80-120 mg rezet tartalmaz, mennyiségét az átmenetifémionok közül csak a vas- és a cinktartalom haladja meg. Különböző fehérjék és enzimek alkotójaként a réz – a vashoz hasonlóan – rendkívül változatos biokémiai folyamatokban vesz részt [11]. A bioligandumokhoz mind redukált Cu(I), mind pedig oxidált Cu(II) formában kötődhet; az enzimek működése során e két oxidációs állapot közötti reverzibilis átmenet valósul meg. A rézion mindkét oxidációs állapotú formája nagy affinitással koordinálódik N- és S-donoratomot tartalmazó ligandumokhoz, így a fémion számára a hisztidil-oldalláncok imidazolnitrogénje, a cisztein tiolát-, illetve a metionin tioéterkénatomja jelenti az elsődleges horgonycsoportot.

A biológiai szempontból aktív rézközpontok szerkezeti és spektroszkópiai jellemzőik alapján három fő típusba sorolhatók: megkülönböztetünk "kék", "nemkék" és ESR-inaktív rézfehérjéket [12].

Az I. típusú avagy "kék" rézfehérjék nevüket az oxidált forma intenzív, mélykék színéről kapták, ami a ~ 600 nm hullámhossznál jelentkező S<sup>-</sup>  $\rightarrow$ Cu(II) töltésátviteli sávtól származik. A proteinek aktív centrumában egyetlen réz(II)ion található erősen torzult koordinációs környezetben. A fémionhoz két hisztidil-oldallánc imidazol-nitrogénatomja és egy cisztein tiolátcsoportja koordinálódik közel síkháromszöges elrendeződésben. A réz(II) koordinációs szféráját egy metionin tioétercsoportja, illetve bizonyos esetekben egy nagyon gyengén kötődő peptidoxigén axiális koordinációja egészíti ki. A fémion körül kialakuló trigonális piramisos vagy trigonális bipiramisos szerkezet átmenetet jelent a réz(I)ionra jellemző, négy kénatom által meghatározott tetraéderes és a réz(II)ion által preferált, négy nitrogéndonoratom által meghatározott síknégyzetes geometria között. Ezek a fémcentrumok elsősorban növényekben találhatók és a fotoszintézisben vesznek részt mint elektronszállító fehérjék. A "kék" rézfehérjékre példaként említhetjük a növények és zöldalgák fotokémiai rendszerének alkotóját, a plasztocianint.

A *II. típusú vagy "nemkék" rézfehérjékben* a fémion a szabályos monomer réz(II)komplexeknél megfigyelhető, kissé torzult síknégyzetes környezetben található. A réz(II) elsősorban hisztidil-oldalláncokhoz koordinálódik, de O-donoratomok is részt vehetnek a megkötésében. A "nemkék" rézfehérjék paramágneses, jellemző ESR-paraméterekkel rendelkező molekulák. Egyik legfontosabb képviselőjük a szuperoxid-dizmutázok közé tartozó **Cu,ZnSOD** [13]. Az enzimcsalád tagjai a toxikus szuperoxid-gyökanion oxigénné és hidrogén-peroxiddá történő diszproporcionálódását katalizálják.

A *III. típusú, azaz ESR-inaktív rézproteinek* kétmagvú fémközpontot tartalmaznak két antiferromágnesesen csatolt réz(II)ion vagy két, egymástól 360 pm távolságra található réz(I)ion formájában. A beszédes ESR-inaktív elnevezés arra utal, hogy a réz(I)ion d<sup>10</sup> elektronkonfigurációja miatt ESR-csendes, ahogy a réz(II)ionok közötti antiferromágneses kölcsönhatás is ESR-inaktivitást eredményez. A rézionok három-három hisztidin imidazolnitrogénhez koordinálódnak, a negyedik helyre pedig szubsztrát vagy oxigénmolekula kötődik. Ilyen rézcentrumot találunk egyes oxidázokban (pl. tirozináz), valamint az ESR-inaktív rézfehérjék csoportjába tartozik az ízeltlábúak, puhatestűek és egyéb alacsonyabb rendű tengeri élőlények oxigénszállító proteinje, a **hemocianin** is. Az oxihemocianin a szubsztrátot peroxo-típusú kötésmóddal koordinálja. A képződő komplex kisebb stabilitású, mint a hemoglobinban kialakuló vas(III)-O2<sup>-</sup> részecske, vagyis a réztartalmú fehérje kevésbé hatékony oxigénszállító protein, mint vasat tartalmazó analógja [14].

Ismertek olyan enzimek is, melyekben nem csak egyfajta rézcentrum található. Példaként említhetjük a  $Cu_A$  és  $Cu_B$  alegységeket tartalmazó **citokróm-c-oxidázt** [15], mely a mitokondriális légzési lánc egyik elektronszállító molekulája és a molekuláris oxigén két vízmolekulává törté-nő redukcióját katalizálja. A dimer  $Cu_A$  egy vegyesvegyértékű (Cu(I) + Cu(II)) rézközpontot tartalmaz torzult tetraéderes környezetben, a fémionokat két cisztein tiolátcsoportja köti össze hídként. Feltételezik, hogy ez az alegység elektronakceptor szerepet tölt be, majd továbbítja a felvett elektront a hemhez. A  $Cu_B$  monomer réz(II)centrumot tartalmaz, melyhez három hisztidil-oldallánc koordinálódik trigonális piramisos elrendeződésben.

A rézcentrumok egyik legújabban azonosított képviselője a denitrifikálásban szerepet játszó **dinitrogén-monoxid reduktáz** enzimben felfedezett, úgynevezett Cu<sub>Z</sub> centrum, amely négy réziont tartalmaz torzult tetraéderes geometriájú környezetben. A fémionokat összesen hét imidazolilcsoport koordinálja és egy szervetlen kénatom köti össze hídként [16].

#### 3.1.2. A nikkel(II)ion élettani hatása [3,17,18]

A nikkel a huszonnegyedik leggyakoribb elem a Földön [19], legnagyobb mennyiségben a bolygó magjában található. Biológiai rendszerekben betöltött szerepének felfedezése egészen az 1970-es évek közepéig váratott magára, kimutatása ugyanis nem egyszerű, hiszen bioligandumok jelenlétében nincs jellegzetes fényelnyelése és a képződő nikkelkomplexek spektruma kis intenzitású. A kihívások ellenére, a technika fejlődésének köszönhetően, az utóbbi évtizedekben számos biológiai rendszerben fedezték fel paramágneses nikkelközpontok jelenlétét [20,21], ami hatalmas lendületet adott a fémion redoxireakcióinak vizsgálatát célzó kutatásoknak. Habár a magasabb rendű élőlények szervezetében mindezidáig egyetlen nikkeltartalmú enzimet vagy koenzimet sem azonosítottak, nagyszámú növényi és bakteriális enzim tartalmaz nikkelt [22-26]. Ezek közül nem egyről feltételezik, hogy az enzimműködést a fémion oxidációs állapotának megváltozása kíséri [22,27].

A nikkel jelenlétét elsőként egy metallohidrolázban, a kardbabból izolált jack bean urease enzimben igazolták [28]. Az enzim a karbamid karbaminsavon keresztüli hidrolízisét katalizálja szén-dioxiddá és ammóniává. Az aktív centrumban található nikkel(II)ionokhoz két-két imidazolgyűrű és egyegy vízmolekula koordinálódik. A két fémiont egy aminocsoportján karbamilált lizin köti össze hídként, valamint az egyik nikkel(II) koordinációs szféráját egy aszpartát karboxilátcsoportja egészíti ki oktaéderessé [29]. Az enzim létfontosságú egyes mikroorganizmusok, többek között a Helicobacter pylori<sup>2</sup> számára, hiszen a karbamid hidrolízise során felszabaduló ammónia segít közömbösíteni a baktérium környezetében a gyomor erősen savas pHját, biztosítva a kórokozó túlélését [30]. Az ureáz mellett a H. pylori számára nélkülözhetetlen egy másik, szintén nikkeltartalmú enzim: a membránhoz kötött [NiFe]-hidrogenáz a molekuláris hidrogén két elektronos, reverzibilis oxidációját katalizálja és a baktérium energiatermelésében játszik szerepet [31]. Az enzimben a nikkel koordinációs száma öt vagy hat és valószínűleg kén-, nitrogén- és oxigéndonoratomok is részt vesznek а fémion megkötésében. A [NiFe]-klasztereket a cisztein tiolátcsoportjának kétfogú koordinációja stabilizálja.

Ugyancsak a vas- és nikkeltartalmú enzimek közé tartozik a **szén-monoxiddehidrogenáz**. Az enzim a szén-monoxid szén-dioxiddá történő oxidációját katalizálja; a reakció során a szubsztrát és a négy kénatom által koordinált fémion közvetlen kölcsönhatását feltételezik [32].

A metanogén archeák és a metanotróf baktériumok szervezetében megtalálható **metil-koenzim M-reduktáz** a szén-dioxid metánná való átalakításában vesz részt [33]. Működéséhez nélkülözhetetlen egy nikkeltartalmú prosztetikus csoport, a sárga színű F430 koenzim, mely nevét a fényelnyelés maximumának hullámhosszáról kapta. A nikkelion egy tetrapirrol hidrokorfin vázban található, az enzim működése során hatos koordináció valósul meg [34]. Ez a szerkezet nagy flexibilitást biztosít, így a metil-koenzim Mreduktáz mind a két-, mind pedig az egyvegyértékű nikkelionokat képes koordinálni. Ugyanakkor a katalitikus szerepet csak az enzim +1-es oxidációs állapotú fémiont tartalmazó formája tudja ellátni [35].

A nikkeltartalmú enzimek legújabban felfedezett képviselője a kizárólag mikroorganizmusokban található **NiSOD**. A katalitikus reakció során nikkel(II)  $\rightarrow$  nikkel(III) átmenet valósul meg [36,37]. A nikkel(II)ion a peptid terminális aminocsoportjához, egy deprotonálódott peptidnitrogénhez és két tiolátkénatomhoz kötődik, melynek eredményeként diamágneses,

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> A *H. pylori* a Gram-negatív baktériumok családjába tartozó kórokozó, amit számos betegség kialakulásával összefüggésbe hoznak: többek között akut és krónikus gyomorhurutot, gyomorrákot és gyomor limfómát okozhat.

síknégyzetes komplex jön létre. Az oxidációt követően a fémion oxidációs állapota mellett annak koordinációs környezete is megváltozik: a paramágneses nikkel(III)ionhoz axiális pozícióban egy hisztidin imidazolnitrogén koordinálódik, négyzetes piramisos szerkezetet kialakítva [38].

#### **3.1.3.** A cink(II)ion élettani hatása [3,39]

A cink biológiai szempontból az egyik legfontosabb fémion, a vas után a második legnagyobb mennyiségben előforduló – és egyúttal az egyik legkevésbé toxikus – d-mezőbeli nyomelem, mely az élet valamennyi formája számára nélkülözhetetlen [40,41]. Az emberi szervezetben is megtalálható, mennyisége megközelítőleg 2 g/70 kg testsúly. 300-nál is több enzim és több mint 2000 transzkripciós faktor működésében játszik szerepet. Enzimek alkotójaként szinte valamennyi sejtben előfordul, vagyis átlagos koncentrációja nagyon kicsi – megközelítőleg 1-10 nM –, ami megnehezítette a fémion életfolyamatokban betöltött szerepének felismerését.

A cink(II) a biológiai rendszerekben kétféle funkciót tölthet be: egyes cinktartalmú enzimek különböző fehérjék, nukleinsavak, szénhidrátok és lipidek metabolikus folyamatait, valamint a bioligandumok lebontását katalizálják, de számos példát ismerünk a fémion szerkezetalakító vagy szabályozó szerepére is. Sokrétű szerepéből következően a cink számos különböző biokémiai folyamatban érintett, hiánya súlyos elváltozásokat okozhat.

A cink katalitikus szerepére példaként említhetjük a szén-dioxid és a vízmolekula közötti reverzibilis reakciót katalizáló **szénsav-anhidrázt**, az első enzimet, amelyben igazolták a cink(II) jelenlétét [42]. Képviselőik nem csak az emberi szervezetben, de a növény- és állatvilágban is megtalálhatók. Az egyes fajokból izolált szénsav-anhidrázok a szerkezetüket tekintve hasonlóak, de a katalízis hatásfokát és az enzimműködés pH-tartományát tekintve különbözhetnek egymástól. Az enzim alapvető szerepet játszik a fotoszintézisben és a légzésben, valamint nélkülözhetetlen a vér pH-értékének szabályozásához is. A legismertebb formája az emberi szervezetben a humán szénsav-anhidráz II, ami molekulánként egy cink(II)-iont tartalmaz. A fémion a fehérje egy mélyen benyúló üregében helyezkedik el, három hisztidin imidazol-nitrogénatom és a katalitikus folyamatban szerepet játszó vízmolekula koordinálja tetraéderes geometriát kialakítva.

Szintén katalitikus fémközpontot tartalmaz a **karboxipeptidáz-A**. Az enzim a peptidek és fehérjék C-terminális peptidkötésének hidrolízisét katalizálja az emésztés során, valamint képes elősegíteni bizonyos észterek kötéseinek hidrolízisét is. Az aktív centrumban egyetlen cink(II)ion található két hisztidin imidazolnitrogén, egy glutamát karboxilátoxigén, valamint egy vízmolekula által meghatározott tetraéderes környezetben [43].

A fémion szerkezetalakító szerepét elsőként a lómájból izolált **alkoholdehidrogenázban** azonosították. Az enzim a primer alkoholok metabolizmusának első lépését, vagyis azok aldehiddé történő oxidációját katalizálja. Szerkezetét tekintve két azonos alegységből álló dimer, mely alegységenként két különböző funkciójú cink(II)iont tartalmaz. Az egyik cink katalitikus, míg a másik fémion szerkezetalakító szerepet tölt be. A katalitikus aktivitással bíró fémközpontot két tiolát-oldallánc és egy hisztidin imidazolnitrogénatom kapcsolja a fehérjéhez, a negyedik koordinációs helyen vízmolekula található. A másik fémiont négy cisztein tiolátkénatom kordinálja és nem vesz részt a katalitikus folyamatban; elsősorban az alkohol megkötésében, orientációjában és elektrosztatikus aktiválásában játszik szerepet. Mivel a cink(II) nem tartozik a redoxiaktív fémionok közé, az oxidációs reakció lejátszódásához szükség van egy koenzimre a NAD<sup>+</sup>/NADH rendszer formájában [44].

A cink szerkezetalakító szerepe kapcsán említést kell tennünk az úgynevezett **"cink-ujj" fehérjékről** is, melyek DNS-kötő transzkripciós faktorokként fontos szerepet játszanak a genetikai információ átadásában [45]. Ezek a proteinek mintegy 3-15 cink(II)iont tartalmaznak két-két cisztein és két-két hisztidin által kialakított tetraéderes elrendeződésben. Ez a koordináció stabilizálja a fehérje "ujjszerű" konformációját, és egyúttal biztosítja a DNS bázisszekvenciájának pontos felismerését [46].

#### 3.2. A peptidek koordinációs kémiája

Az élő szervezetek leghatékonyabb fémionkötőhelyei az aminosavakból felépülő fehérjék. Mivel az egyszerű aminosavak terminális funkciós csoportjainak jelenléte alapvetően határozza meg a komplexképződési folyamatokat, az akár több száz aminosavból felépülő proteinek fémionkötőhelyeiről pontosabb képet adhatnak az oligopeptidek, melyekben a terminális funkciók jól elkülönülnek egymástól. Vizsgálatuk további előnyös vonása, hogy az előállítható peptidmolekulák száma közel végtelen, ami megkönnyíti az egyes oldalláncok komplexképződésre gyakorolt hatásának szisztematikus tanulmányozását. A több évtizedes kutatómunka eredményeként napjainkra nagyszámú, a peptidek koordinációs kémiai viszonyait összegző tanulmány és összefoglaló közlemény született [47-51].

A peptidek szerkezetére voltaképpen az aminosavak és a fehérjék struktúrája közötti egyfajta átmenetként tekinthetünk. Az egyszerű aminosavaktól eltérően az oligopeptidekben a terminális amino- és karboxilátcsoport túlságosan távol helyezkedik el egymástól ahhoz, hogy ugyanannak a kelátgyűrűnek a tagjai lehessenek, így háttérbe szorul a láncvégi csoportok együttes koordinációja. A fémionok megkötésében résztvevő fő funkciós csoportok a következők lehetnek: a terminális amino- és karboxilátcsoport, a peptidkötés karboniloxigénje és amidnitrogénje, valamint az oldalláncbeli donoratomok. A fémionoknak kizárólag a láncvégi amino- vagy karboxilátcsoporton keresztüli koordinációjával kialakuló peptidkomplexek kis

stabilitásúak, így ez a kötésmód viszonylag ritka. Azonban az aminoterminus kelátképző pozícióban van a karboniloxigénnel, így a fémion a két funkciós csoporthoz koordinálódva öttagú kelátgyűrűs szerkezetet alakíthat ki. Mivel az ilyen koordinációs módú részecskék képződése nem jár töltéskiegyenlítődéssel, ezeknek a komplexeknek a stabilitása általában kisebb, mint az kötésmódot aminosavszerű tartalmazó ([NH<sub>2</sub>,COO<sup>-</sup>]) aminosavfémkomplexeké. Ugyanakkor az aminocsoport nem csak a peptidkötés oxigénjével, de nitrogénjével is kelátképző helyzetben található. Az amidnitrogén nagyon gyenge bázisként és még annál is gyengébb savként viselkedik; protonját csak erősen bázikus közegben adja le ( $pK_s \sim 15$ ), vagyis a mérhető pH-tartományban (2 < pH < 14) kizárhatjuk sav-bázis reakciókban való részvételét [47,52]. Azonban nem egy olyan fémiont ismerünk, amely képes a peptidnitrogén protonjával eredményesen versengeni és azt – akár savas közegben - kiszorítani és helyettesíteni. A palládium(II)ionok például kifejezetten hatékonynak bizonyultak az amidnitrogének deprotonálódásának

kiváltásában [53] (pK < 1), a réz(II)ionok enyhén savas közegben (pH 4-5 körül), nikkel(II)ionok míg a а bázikus pH-tartományban (pH ~ 8-9) idézik elő a protonvesztést. A peptidnitrogén(ek) deprotonálódásának és koordinálódásának eredményeként nagy stabilitású, csatolt, öttagú kelátgyűrűs komplexek jönnek létre: dipeptidek esetén a terminális aminoés а deprotonálódott amidnitrogén, illetve a karboxilátcsoport részvételével, míg



hosszabb oligopeptidek fémkomplexeiben (*1. ábra*) további deprotonálódott peptidnitrogének telítik a fémion koordinációs szféráját [50,51].

A fentebb leírt koordinációs viszonyokat jelentősen megváltoztathatja a ligandumok oldalláncbeli funkciós csoportjainak jelenléte [54,55]. A biológiai rendszerekben a fémionok pontosan ezen oldalláncok N-, O- és S-donoratomjain keresztül kötődnek, ezért elengedhetetlen, hogy megismerjük és megértsük ezen funkciós csoportok komplexképződésre gyakorolt hatását. Az erősen, illetve gyengén koordinálódó oldalláncok minősége, száma és peptidszekvenciában elfoglalt helyzete rendkívül változatos sztöchiometriájú és termodinamikai stabilitású komplexek kialakulását eredményezi. A

biológiai szempontból releváns átmenetifémionok többségével a hisztidin imidazolnitrogénje és a cisztein tiolátkénatomja alakítja ki a legerősebb kölcsönhatást, és ezekkel az aminosavakkal számos metalloenzim aktív centrumában találkozhatunk. *Munkám során egy és több hisztidil-oldalláncot tartalmazó, terminálisan védett és szabad aminoterminussal rendelkező ligandumokat, valamint a hisztidin mellett ciszteint tartalmazó peptideket vizsgáltam*, így a következő alfejezetekben a hisztidin- és ciszteintartalmú peptidek komplexkémia viselkedését mutatom be.

#### 3.2.1. Hisztidintartalmú peptidek komplexképződési folyamatai

Általánosan elmondható, hogy a peptidszekvenciában a hisztidil-oldallánc jelenléte a komplexképződési folyamatok nagy változatosságát eredményezi; hatása a fémion-koordinációra elsősorban a keletkező komplexek megnöve-kedett termodinamikai stabilitásában nyilvánul meg.

A hisztidintartalmú peptidek réz(II)komplexei biológiai jelentőségük miatt kerültek a figyelem középpontjába, de ezen ligandumok nikkel(II)vegyületei is kutatások tárgyát képezik. Utóbbiak elsősorban nem az élő szervezetekben betöltött szerepük miatt keltették fel a koordinációs kémiával foglalkozó tudósok érdeklődését, hiszen a nikkel a legtöbb élőlény számára nem esszenciális nyomelem, ugyanakkor ezen vizsgálatok hozzájárulhatnak a bonyolultabb Cu(II)-peptid rendszerekben kialakuló kölcsönhatások megértéséhez. Az intenzív kutatómunka eredményeként nagyszámú közlemény született a hisztidintartalmú ligandumok réz(II)vegyületei mellett a peptidek nikkel(II)ionokkal alkotott komplexeiről is [50,56-58]. Nyilvánvalóvá vált, hogy a komplexképződési folyamatokra számos tényező hatással lehet: nevezetesen a koordinálódó fémion minősége; a szekvenciában található hisztidinek száma, pozíciója és a koordinációt befolyásoló, egyéb funkciós csoportokhoz viszonyított helyzete; továbbá az N- és C-terminális csoportok hozzáférhetősége (azaz, hogy a vizsgálatokat szabad vagy terminálisan védett ligandummal végezzük-e?).

## **3.2.1.1.** Egy hisztidil-oldalláncot tartalmazó peptidek komplexképződési folyamatai

A **szabad aminoterminussal rendelkező** hisztidintartalmú peptidekről általánosan elmondható, hogy a fémionok a terminális aminocsoport és az imidazolgyűrű nitrogénatomján keresztül koordinálódnak, azonban a hisztidint különböző pozíciókban tartalmazó ligandumok esetén a komplexképződés eltérő képet mutat. Az *N-terminális végen* hisztidint tartalmazó, nem védett peptidekben savas pH-n a fémion az imidazolgyűrű N(3)- és a terminális aminocsoport nitrogénatomján keresztül koordinálódik. Ennek eredményeként a savas (és semleges) pH-tartományban [NH<sub>2</sub>, N(Im)] donoratomokon keresztül koordinálódó, ún. "*hisztaminszerű"* kötésmódot tartalmazó komplexek

képződnek (2/1.ábra). А sztöchiometriáját részecskék а fémion:ligandum arány határozza ekvimoláris oldatban meg: míg elsősorban [ML], addig ligandumfelesleg alkalmazása esetén [ML2] összetételű komplexek alakulnak ki. А stabilis hattagú kelátgyűrűs szerkezet mind az egymagvú, mind pedig a biszkomplexek termodinamikai stabilitását ielentősen megnöveli és ezáltal az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját is gátolja [58,59]. Azonban ekvimoláris oldatban a kétfogú kötésmód nem képes telíteni a fémionok koordinációs szféráját: a pH növekedésével a komplex már nem képes oldatban tartani a kationt és leválik а megfelelő fémhidroxid csapadék

Ha a hisztidin a peptidszekvencia



*második pozíciójában* található, a deprotonálódott amidnitrogén már egymagvú komplexekben is kötődhet a fémionhoz, ami nagy stabilitású részecskék kialakulását eredményezi, és egyúttal a további peptidnitrogének protonvesztését is gátolja. A fiziológiás pH-tartományban a tridentát koordinációval képződő, [MH<sub>-1</sub>L] sztöchiometriájú (azaz "*GlyHis-szerű*" koordinációjú) komplexek az uralkodó részecskék, melyekben a fémion megkötésében az [NH<sub>2</sub>, N<sup>-</sup>, N(Im)] donoratomok vesznek részt. Ugyanakkor a ligandum háromfogú koordinációja sem képes telíteni a fémionok koordinációs szféráját és bázikus oldatban (pH ~ 9-10) lehetőség nyílik imidazolátohidas négymagvú komplexek képződésére [60]. Az NH<sub>2</sub>-X-His– … szekvenciájú peptidekben a réz(II)- és nikkel(II)ionok mellett a cink(II)és kobalt(II)kationok is képesek elősegíteni a peptidnitrogének deprotonálódását és koordinálódását [61,62].

A szabad aminoterminussal rendelkező és a *szekvencia harmadik helyén* hisztidint tartalmazó peptidek a réz(II)- és nikkel(II)ionokkal egyaránt kiugró

stabilitású komplexeket képeznek. A fiziológiás pH-tartományban a terminális amino-, két deprotonálódott peptid- és az imidazolnitrogén koordinálódásával szinte kizárólag [MH<sub>-2</sub>L] összetételű részecskék alakulnak ki [63,64]. A fémion megkötésében résztvevő [NH<sub>2</sub>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] donorcsoportok "*albuminszerű*" vagy más néven "*GlyGlyHis-szerű*" koordinációt (2/2. *ábra*) hoznak létre. Ezekben a ligandumokban a réz(II)- és nikkel(II)kationok mellett a palládium(II)- és arany(III)ionok is kiválthatják a peptidváz amidnitrogénjeinek deprotonálódását [65], ugyanakkor hasonló szerkezetű cink(II)- [66] és kobalt(II)komplexekre nem ismer példát a szakirodalom.

Ha a hisztidil-oldallánc a terminális aminocsoporttól legalább négy aminosav-távolságra található, a komplexképződés az eddig leírtaktól is változatosabb képet mutat. Mindkét donorcsoport horgonyként szolgálhat a fémionok kötődéséhez, de lehetőség nyílik makrokelát szerkezetek képződésére is [67,68]. A két funkciós csoport egyidejű koordinációjával a fiziológiás pH-tartományban [ML] összetételű részecskék alakulnak ki, majd a pH növelésével bekövetkezik a peptidnitrogének deprotonálódása és koordinálódása [67-69]. Az amidnitrogének deprotonálódása akár a terminális aminocsoportról, akár a láncközi imidazolgyűrűről elindulhat, azaz a két donorcsoport együttes jelenléte lehetőséget teremt izomerszerkezetek kialakulására. Erősen bázikus közegben mind [NH2, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>] koordinációjú, mind pedig [N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] kötésmódot tartalmazó, 4N-es komplexek képződését kimutatták. alátámasztva. hogy а kétfaita koordinációs módú részecskék egyidejűleg is jelen lehetnek az oldatban [70].

Egyértelmű, hogy az N-terminális aminocsoport hozzáférhetősége jelentős hatással van a komplexképződési folyamatokra, azonban az élő szervezet fehérjéihez a fémionok többnyire nem az aminoterminuson, hanem az oldalláncbeli donoratomokon keresztül koordinálódnak. Ebből következően az akár több száz aminosavból felépülő fehérjék láncközi donorcsoportjainak fémionkötő-képességét jobban modellezik a mindkét végükön védett peptidek fémkomplexei.

A védett aminoterminussal rendelkező ligandumokban a terminális aminocsoport blokkolt, így a fémionok nem kötődhetnek hozzá. Enyhén savas közegben, valamint semleges oldatban makrokelát szerkezetű komplexek képződnek, melyekben a fémion kizárólag az oldalláncok donorcsoportjain keresztül koordinálódik [71-76]. A hisztidin imidazolnitrogénatomján keresztüli koordináció sem a réz(II)-, sem a nikkel(II)komplexekben nem képes megakadályozni a fémion-indukált amiddeprotonálódást, de a folyamatot a nagyobb pH-tartományba tolja. Réz(II)ionok jelenlétében pH 4-5 felett, nikkel(II)ionokat tartalmazó mintában enyhén bázikus közegben (pH > 8) következik be a peptidnitrogének protonvesztése, melynek eredményeként egy, kettő, illetve három amidnitrogén deprotonálódik és lép be a fémion koordinációs szférájába.



Az amidnitrogének deprotonálódása egyedi lépésekben, de akár kooperatív folyamatban is lejátszódhat. A kialakuló  $[N(Im), (N^-)_x]$  kötésmódokat (ahol x = 1-3; ld. 3. ábra) a hisztidil-oldalláncok száma és szekvenciában elfoglalt helyzete, valamint a környező aminosavak minősége is jelentősen befolyásolhatja [77,78]. A ligandum szekvenciájától függően, a peptidnitrogének protonvesztése mind az aminoterminus, mind pedig a C-terminális



vég irányába lejátszódhat. Amennyiben a hisztidil-oldalláncot

több aminosav választia el az aminoterminustól, erősen bázikus oldatban (6,5,5)-tagú csatolt kelátgyűrűs szerkezet alakul ki (4/1)ábra). Ugyanakkor, ha az Nterminális vég felé a deprotonálódás valamilven oknál fogva akadályozott - a peptid N-terminális imidazolilcsoportot tartalmaz vagy

a hisztidin előtt szekunder amidcsoportot tartalmazó aminosav (prolin [79] vagy szarkozin [74]) található –, akkor a protonvesztés csak a szénterminus irányába mehet végbe, melynek eredményeként (7,5,5)-tagú csatolt kelátrendszer alakul ki (4/2. *ábra*). Általánosan elmondható, hogy a nagyobb stabilitású, hattagú gyűrű kialakulását eredményező kelátképződés a kedvezményezettebb folyamat, azaz tipikusan az [N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] kötésmódot tartalmazó [MH<sub>-3</sub>L] összetételű részecskék alakulnak ki.

#### **3.2.1.2.** Több hisztidil-oldalláncot tartalmazó peptidek komplexképződési folyamatai

A több hisztidint tartalmazó, úgynevezett multihisztidin peptideket gyakran használjuk egyszerű modellekként metalloenzimek [80,81] és egyéb – például a neurodegeneratív megbetegedésekben szerepet játszó [82-84] – fehérjék szerkezetének és katalitikus aktivitásának tanulmányozására. Ezek a ligandumok kiváló lehetőséget biztosítanak makrokelát szerkezetű komplexek kialakulására, melyek termodinamikai stabilitását a lánc hossza, valamint a hisztidinek közötti távolság határozza meg.

Az N-terminálisan szabad multihisztidin peptidekben a szabad aminoterminus jelenti az elsődleges horgonycsoportot a fémionok által kiváltott amiddeprotonálódáshoz, bár ezek a folyamatok a hisztidinek számától és pozíciójától függően hangolhatók. Általánosan elmondható, hogy az N-terminális hisztidin gátolja, míg a szekvenciában második és harmadik helyet elfoglaló imidazolilcsoportok elősegítik a peptidnitrogének deprotonálódását [77,85-87]. A ligandumok NH2-His-X-Z-..., NH2-X-His-Z-... és NH<sub>2</sub>-X-Z-His-... részéhez kötődve nagyobb stabilitású réz(II)és nikkel(II)komplexek alakulnak ki, mintha a fémionok a láncközi hisztidiloldalláncokhoz koordinálódnának [86,88]. Enyhén savas közegben makrokelát szerkezetű részecskék képződnek, majd a pH emelésével – ha lehetőség van rá – "albuminszerű" kötésmódú komplexek keletkeznek. A másik eshetőség, hogy a pH növelésével a peptidnitrogének deprotonálódnak és kiszorítják a hisztidin imidazolnitrogént a fémion koordinációs szférájából. Ennek eredményeként az [NH<sub>2</sub>, N(Im)] vagy [NH<sub>2</sub>, (N<sup>-</sup>)<sub>x</sub>, N(Im)] kötésmódot (ahol x = 1 vagy 2) erősen bázikus oldatban a terminális aminocsoporton és három deprotonálódott amidnitrogénen keresztüli koordináció ([NH2, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>]) váltja fel. Megfigyelték, hogy a láncközi hisztidinek imidazolgyűrűinek axiális koordinációja a komplexek szerkezetének extra stabilizációját eredményezheti, és ezáltal a további amidnitrogének deprotonálódása a nagyobb pH-tartományba tolódik. Mindezek következtében a közbenső pHértékeken a terminális aminocsoport és az imidazolgyűrűk közötti távolságtól függően rendkívül változatos szerkezetű részecskék alakulhatnak ki [89,90]. A közbenső hisztidil-oldalláncok egyúttal független kötőhelyekként is szolgálhatnak, így lehetőség nyílik, a horgonycsoportok számától függően, két- vagy akár többmagvú komplexek kialakulására is. Az egynél több imidazolilcsoport jelenléte nemcsak tovább fokozza a komplexképződés sokszínűségét, de egyes esetekben fémion-preferenciát is megfigyeltek [2,86]. Bizonyos fémionok – pl. cink(II)- és kadmium(II)kationok – általában nem képesek előidézni a peptidnitrogének deprotonálódását, így többnyire kizárólag a terminális amino- és/vagy hisztidin imidazolnitrogénen keresztül kötődnek. Ha nem alakulnak ki amidkoordinációjú részecskék, ez a kötésmód nem képes megóvni a fémiont a hidrolízistől és bázikus közegben leválik a megfelelő hidroxidcsapadék [88,89,91].

A biológiai rendszerekben előforduló fehérjéket (pl. prion protein, amiloid- $\beta$  fehérje) célzó kutatások feltárták, hogy a modellként szolgáló **terminálisan védett** multihisztidin peptidek esetén a hisztidinek számának növekedése a makrokelát szerkezetű komplexek kialakulásának kedvez a fiziológiás pHtartományban [92-94]. Ennek megfelelően az ezen proteinek modelljeiként szolgáló terminálisan védett kisebb tagszámú peptidek esetén a hisztidiloldalláncok számának növekedésével a kialakuló imidazol-koordinációjú

komplexek termodinamikai stabiugvanakkor litása nő. minél távolabb helyezkednek el egymástól. annál kisebb a képződő makrokelát szerkezetek stabilitása. A legnagyobb stabilitású komplexek а -His-X-His-Z-His-, valamint a -His-X-X-His-Z-Hisszekvenciát tartalmazó ligandumok esetén képződnek, azaz olvan peptidekkel alakulnak ki, melyekben a hisztidineket egy (5. *ábra*) vagy két aminosav választja el egymástól [51]. Ennek oka,



hogy a makrokelát szerkezetű komplexek képződése ezen szekvenciák esetén képes a legnagyobb mértékben visszaszorítani az peptidnitrogének deprotonálódását, bár teljes mértékben nem tudja megakadályozni azt és bázikus közegben kialakulnak az amidkoordinált részecskék. A hisztidin melletti, egyéb koordinálódó donorcsoportok jelenléte tovább bonyolítja a komplexképződési folyamatok leírását. Példának okáért a prolin beépítése a peptidláncba egyfajta "töréspontot" eredményez, míg az aszparaginsav és glutaminsav oldalláncbeli karboxilátcsoportja megváltoztatja a ligandum töltését és ezen keresztül hatással van a kialakuló komplexek termodinamikai stabilitására is.

A multihisztidin peptidek komplexképződési folyamatainak tanulmányozása során nem szokatlan jelenség a koordinációs izomerek képződése. A kialakuló izomerszerezetek arányát elsősorban a hisztidil-oldalláncok száma és helyzete határozza meg, de az izomerarányra a méret, a molekula hidrofobicitása és a keletkező komplexek töltése is jelentős hatással lehet. Általában az olyan koordinációs izomerek képződnek túlsúlyban, melyekben a fémion a szénterminushoz közelebbi hisztidinhez koordinálódik. Ugyanakkor, ha a karboxiterminuson nagy térkitöltésű oldallánc található, a C-terminális imidazolilcsoporthoz koordinálódó izomerek aránya csökken, míg ugyanebben a pozícióban egy aromás gyűrű vagy egy karboxilátoldallánc jelenléte éppen ellenkező hatást eredményez [75,76]. A multihisztidin peptidek komplexképződési folyamatainak további fontos vonása, hogy mivel valamennyi imidazolnitrogén betöltheti a horgonydonor szerepét, fémionfelesleg alkalmazása esetén többmagvú részecskék alakulhatnak ki. A több hisztidint tartalmazó molekulák két képviselője a prion protein és az  $A\beta$  peptid, melyek konformációváltozását összefüggésbe hozzák különféle neurodegeneratív megbetegedések (pl. Creutzfeldt-Jakob kór, surlókór, kergemarhakór, illetve Alzheimer-kór) kialakulásával.

A prion protein tíz hisztidil-oldallánccal rendelkezik. A teljes hosszúságú fehérje négy, nyolc aminosavból álló (-PHGGGWGQ-) ismétlődő egységet tartalmaz, régiónként egy-egy imidazolilcsoporttal (His61, His69, His77, His85). Két hisztidin (His96 és His111) található a neurotoxikus tartományban és további négy (His140, His155, His177, His187) a molekula C-terminális részén. A protein fémionkötő-képességét modellezendő számos, kisebb tagszámú, több hisztidint tartalmazó peptidfragmens oldategyensúlyi viselkedését tanulmányozták. Kutatócsoportunkban több olyan ligandum komplexképződési folyamatait is leírták, melyek az oktarepeat régióból származó hisztidil-oldallánc mellett külső hisztidin(eke)t is tartalmaz(nak). A natív fragmensek – HuPrP(91-115), HuPrP(84-114), HuPrP(76-114), HuPrP(76-91) – mellett azok hisztidin helyett alanint tartalmazó pontmutánsainak – HuPrP(84-114)His85Ala, HuPrP(84-114)His96Ala, HuPrP(84-114)His111Ala – komplexképződési folyamatait is tanulmányozták, mind réz(II)-, mind pedig nikkel(II)ionok jelenlétében [95,96]. Valamennyi vizsgált peptidfragmens hatékony réz(II)kötő ligandumnak bizonyult. A fémion imidazolilcsoporton keresztüli kötődésével enyhén savas közegben stabil makrokelát szerkezetű részecskék képződnek, majd 5,5-es pH fölött két amidnitrogén kooperatív deprotonálódásával [N(Im), N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>] donoratomok által meghatározott koordinációs környezet alakul ki a réz(II)ion körül. Enyhén bázikus közegben egy harmadik deprotonálódott peptidnitrogén is kötődik a fémionhoz, melynek eredményeként 4N-es komplexek jönnek létre. A fent említett prion modellekben valamennyi imidazolilcsoport független kötőhellyé válhat, vagyis az egyes ligandumok a hisztidinek számával azonos ekvivalens réz(II)ion megkötésére képesek. A két, három, illetve négy horgonycsoport többmagvú komplexek kialakulását teszi lehetővé. A nikkel(II) – a réz(II)ionokhoz hasonlóan – elsősorban a hisztidinek imidazol-nitrogénatomján keresztül kötődik [97]. Ugyanakkor, míg a makrokelát szerkezetek kialakulása általánosan jellemző a réz(II)-prion komplexekre, a nikkel(II) esetén csak a négy hisztidint tartalmazó HuPrp(76-114) származékkal sikerült ilyen részecske képződését kimutatni. Az amidnitrogének deprotonálódása a réz(II)ionokat tartalmazó rendszerhez képest nagyobb pH-n (pH > 7,5) megy végbe és a kooperatív folyamat eredményeként [N(Im), N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>] koordinációs módú komplexek alakulnak ki. A különböző fémionokat tartalmazó rendszerek közös vonása a többmagvú részecskék képződése: a vizsgált ligandumok annyi ekvivalens nikkel(II)ion megkötésére képesek, ahány hisztidil-oldalláncot tartalmaznak.

Az **amiloid-\beta** peptid az amiloid prekurzor protein többlépéses enzimatikus hasítása után visszamaradó, 40-42 aminosavból álló polipeptid, melynek aggregációját összefüggésbe hozzák az AK kialakulásával. A fehérje egy-egy imidazolil-oldalláncot tartalmaz a szekvencia hatodik, tizenharmadik és tizennegyedik pozíciójában. Kutatócsoportunkban a szomszédos hisztidinek fémionmegkötő-képességét az Ac-SGAEGHHQK-NH2 szekvenciájú nonapeptid ( $A\beta(8-16)mHH$ ) és alanint tartalmazó mutánsai ( $A\beta(8-16)mHA$ : Ac-SGAEGHAQK-NH<sub>2</sub> és  $A\beta(8-16)mAH$ : Ac-SGAEGAHQK-NH<sub>2</sub>) segítségével vizsgálták [98]. A két hisztidint tartalmazó származékkal biszkomplexek, valamint egy- és kétmagvú réz(II)komplexek is kialakulnak, míg nikkel(II)ionok jelenlétében csak mononukleáris részecskék képződnek. Jelentős különbség a két fémion jelenlétében lejátszódó komplexképződési folyamatok között, hogy míg a nagy pH-n kialakuló 4N-es nikkel(II)részecskékben közel 100%-ban a His14 a fémion elsődleges kötőhelye, addig a kötésmódú réz(II)komplexek megközelítőleg 1:1 arányban hasonló képződnek a His13 és His14 oldalláncokról kiinduló amidkoordinációval [99]. A réz(II)- és nikkel(II)ionok mellett a ligandum a cink(II)ionokkal is stabil komplexeket képez: a fémion:ligandum aránytól függően az egymagvú részecskék mellett bisz- és dinukleáris komplexek jelenlétét is igazolták.

# **3.2.2.** Ciszteinil-oldalláncot tartalmazó peptidek komplexképződési folyamatai

A biológiai rendszerekben számos olyan fehérje – pl. metallotioneinek, fitokelatinok, "cink-ujj" fehérjék, "kékréz" fehérjék, nikkel chaperonok található, melyekhez a fémionok a ciszteinil-oldallánc tiolátcsoportján keresztül koordinálódnak [100], azonban ez a kötés meglehetősen szelektív [50,51]. A "szoft" karakterű fémionokkal (pl. Cd(II), Hg(II), Pd(II)) a tiolátcsoport erős, kovalens kötést alakít ki, míg a "hard" sajátságú fémionok (pl. Al(III)) és a kénatom között lényegesen gyengébb kölcsönhatás jön létre. A vizsgálataink szempontjából érdekes 3d átmenetifémionok – közülük is elsősorban a cink(II) – viszonylag nagy affinitással kötődnek a ciszteiniloldalláncokhoz, különösen, ha lehetőség nyílik vegyes, S- és N-donoratomokat tartalmazó kelátgyűrűs szerkezet kialakítására. A hisztidin imidazolgyűrűjéhez hasonlóan a tiolátcsoport is horgonyként szolgálhat a peptidnitrogének deprotonálódásához, és a ciszteinek számától, illetve szekvenciában elfoglalt pozíciójától függően rendkívül változatos sztöchiometriájú és szerkezetű komplexek alakulhatnak ki. Sőt, a tiolcsoporttal bizonyos vegyértékváltó fémionok - példának okáért a réz- és a vasionok redoxireakcióba is léphetnek, melynek eredményeként a tiolátkénatom diszulfidcsoporttá oxidálódik, miközben a fémionok redukálódnak [101,102], és az így kialakuló diszulfidhidas részecskék még tovább színesítik a képződő komplexek sokféleségét.

## **3.2.3.** Vegyes kötőhelyű, hisztidil- és ciszteinil-oldalláncot tartalmazó peptidek komplexképződési folyamatai

legegyszerűbb, hisztidil- és ciszteinil-oldalláncot is tartalmazó А ligandumok a HisCys és a CysHis dipeptidek. A ciklikus HisCys dipeptid (c-HisCys) komplexképződési folyamatait cink(II)ionok jelenlétében tanulmányozták. A fémion hisztidin imidazolnitrogénen és cisztein tiolátkénatomon keresztüli kötődésével egymagvú részecskék és biszkomplexek is kialakulnak. Hasonló szekvenciájú dipeptideket vizsgálva megállapították, hogy a mononukleáris komplexek termodinamikai stabilitása a c-HisHis < c-HisCys ~ Ac-HisCys-OEt ~ Ac-CysHis-OEt [103] c-CysHis < c-CysCys sorrendben nő, amiből a ciszteinil-oldalláncok stabilitásnövelő hatására következtethetünk. Ekvimoláris oldatban dimer és [M2L3] összetételű képződését is megfigyelték, melyekben a tiolátcsoport részecskék híddonorként köti össze a fémionokat [104]. Hasonló tendenciáról számoltak be a hisztidint és ciszteint egyaránt tartalmazó tripeptidek komplexeiben is: ligandumok cink(II)komplexeinek stabilitása mintegy 1-2 ezen nagyságrenddel nagyobb, mint azoké a peptideké, melyekben a fémion csak az imidazolgvűrűn keresztül koordinálódik [105].

A hisztidin melletti cisztein stabilitásnövelő hatása a **ZnT3 cinktranszporter fehérje** modellvegyületénél, az Ac-PFHHCHRD-NH<sub>2</sub>



peptidnél érvénvesül. А is komplexképződés enyhén savas közegben a fémion hisztidinekhez való kötődésével indul, majd a fiziológiás pH-tartományban megjelennek a kiugró stabilitású, [ML] összetételű részecskék (6. ábra), melyekben a hisztidin imidazolnitrogének mellett a cisztein tiolátkénatomia is részt vesz a fémion megkötésében. A három imidazolil- és egy tiolátcsoporton

keresztül koordinált [ZnL] komplex stabilitása mintegy két nagyságrenddel nagyobb, mint az azonos koordinációs módú [NiL] részecskéé, amit azzal magyarázhatunk, hogy a két kation közül a cink(II) számára kedvezőbb az [N(Im), N(Im), N(Im), S<sup>-</sup>] donoratomok által kialakított tetraéderes koordinációs környezet. A pH növelésével bekövetkezik a peptidnitrogének nikkel(II)ionok által indukált deprotonálódása és koordinálódása, melynek eredményeként bázikus közegben az amidnitrogének kiszorítják a hisztidin imidazolnitrogéneket a fémion koordinációs szférájából és kialakulnak a síknégyzetes geometriájú, [N(Im), N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, S<sup>-</sup>] kötésmódú komplexek. Cink(II)ionok jelenlétében nem figyelték meg hasonló folyamatok lejátszódását [106], ami arra utal, hogy a tiolátcsoport stabilizáló hatása nagyban függ a pH-tól.

A hisztidinben és ciszteinben gazdag fehérjék egyik legújabban felfedezett képviselői a H. pylori baktérium nikkel chaperonjai, melyek fémionkötő sajátságaival világszerte számos kutatócsoport foglalkozik [107-109]. A proteinek azon túl, hogy a nikkel(II)ionokat a megfelelő enzimekhez szállítják, a fémion szervezeten belüli koncentrációjának szabályozásában is részt vesznek. Az elkülönült nikkel(II)- és cink(II)-kötőhelyeket tartalmazó HvpA fehérje a nikkel(II)ion [NiFe]-hidrogenáz enzim nagyméretű alegységébe való beépülését segíti elő [110]. A fémion az N-terminális hisztidinhez kötődik, koordinálásában egy hisztidin imidazol- és három deprotonálódott peptidnitrogén vesz részt. A cinkkötő régió két -Cvs-X-X-Cvsmotívumot tartalmazó hurok, ahova a cink(II)ion tetraéderes koordinációs környezetet kialakítva kötődik [111]. A H. pylori nikkel(II) metabolizmusában szerepet játszó hősokkfehérjéje, a HspA is a hisztidil- és ciszteiniloldalláncot tartalmazó, vegyes kötőhelyű ligandumok sorába tartozik. A protein karboxiterminusát modellező Ac-ACCHDHKKH-NH2 peptid vizsgálata bebizonyította, hogy a nikkel(II) még hisztidil-oldallánc jelenlétében is a -Cys-Cys- motívum két tiolátkénatomján és a köztük lévő deprotonálódott peptidnitrogénen keresztül koordinálódik [112]. Ugvanakkor, a -Cvs-Cvsszekvenciát tartalmazó peptidek cink(II)komplexei lényegesen kisebb stabilitásúnak bizonyultak, mint a megfelelő nikkel(II)részecskék [113].

#### 3.3. A neurodegeneratív betegségek áttekintése, taupátiák

A neurodegeneratív kór kifejezés az agyi idegsejteket érintő betegségek gyűjtőneve. A kórképek hátterében valamely, alapvetően fiziológiás funkciójú fehérje konformációváltozása áll: a natív protein hibás feltekeredése a szerkezet megváltozásához vezet, melynek eredményeképpen extracelluláris vagy intracelluláris aggregátumok alakulnak ki. A képződő rendellenes plakkok és kötegek jelenléte súlyos zavarokat okoz az idegsejtek működésében, valamint a szövetállomány elhalását idézi elő, ami a beteg szellemi (demencia) és/vagy fizikai állapotának leépüléséhez (ataxia) vezet.

А neurodegeneratív taupátiákat magukba foglaló demenciák és mozgásszervi zavarok jellemzője az abnormális tau-filamentumok intracelluláris felhalmozódása, melyek neurofibrilláris kötegeket (NFK) és egyéb tau-lerakódásokat képeznek a neuronokban és a gliasejtekben. A tauneuropatológia önmagában, izolált formában csak ritkán fordul elő, a legtöbb taupátia esetén a protein patológiás elváltozásait általában legalább egy másik fajta fehérjelerakódás (pl.  $\alpha$ -szinuklein, huntingtin, A $\beta$ ) megjelenése kíséri

[114,115]. A betegségek pontos molekuláris háttere a mai napig nem ismert, de feltételezhető, hogy egyéb – például genetikai tényezőkön kívül – a különböző fémionok [116], valamint az oxidatív stressz [117] is szerepet játszik a kóros biokémiai folyamatok lejátszódásában.

#### 3.3.1. Az Alzheimer-kór kialakulásáért felelős tényezők

A legszélesebb körben ismert és – közvetve vagy közvetlenül – a legtöbb embert érintő taupátia valószínűleg az AK. A később róla elnevezett betegség tüneteit elsőként egy bajorországi orvos, Alois Alzheimer írta le 1907-ben [118]. Neuropatológiás szempontból a kórt két rendellenesség jellemzi: amiloidot tartalmazó intracelluláris plakkok és neurofibrilláris kötegek megjelenése az agyban. A plakkok amiloid- $\beta$  nevű rendellenes fehérjéből állnak, a neurofibrilláris kötegeket tau alkotja [114]. Az esetek mintegy 95%ában ún. sporadikus, azaz elszigetelten jelentkező AK-ról beszélhetünk, mely jellemzően idős korban alakul ki. Ugyanakkor bizonyos esetekben a tünetek fiatalabb korban is jelentkezhetnek: a megbetegedések 5%-a családi halmozódást mutat (familiáris AK), amelyért az amiloid prekurzor proteint (APP), illetve a presenilin-1 és presenilin-2 fehérjéket kódoló gének valamelyikének mutációja felelős [119].

A sporadikus és familiáris AK előfordulásának százalékos aránya egyértelműen tükrözi, hogy a betegség kialakulásában az elsődleges rizikófaktort az öregedés jelenti, és a kór mára az (el)öregedő – nyugati – társadalmak népbetegségévé nőtte ki magát. Általános vélekedés, hogy bizonyos fokú szellemi leépülés az idős kor elkerülhetetlen velejárója és az agy élettani öregedése együtt jár a kognitív képességek hanyatlásával. Az idő múlásával az agykéreg homloki és halántéki részének szöveti állománya elvékonyodik, de 56 és 103 éves kor között az idegsejtek száma többé-kevésbé állandónak tekinthető. Az AK-s betegek esetén azonban a hippokampusz neuronjainak száma csökken, mely jelenség nem része a természetes öregedési folyamatnak [120]. A betegség első tünetei a memóriazavar és az emlékezetvesztés, de az agy leépülése hatással van az idegsejtek működésére is – ez hibás jelátvitelt eredményez, mozgási és kognitív működési zavarok lépnek fel [121]. Az egyre súlyosbodó tünetek végül a beszédre, a döntéshozatalra és a viselkedésre is kihatnak [122].

A betegség az orvostudomány jelenlegi állása szerint gyógyíthatatlan: a klinikai gyakorlatban alkalmazott kezelések és gyógyszerek legfeljebb a tüneteket enyhíthetik, de nem képesek sem visszafordítani, sem lassítani a kór lefolyását [123], így az AK napjaink egyik legjelentősebb egészségügyi és szociális kihívásává vált. A probléma súlyosságát az esetszámok előrevetített növekedése is jól mutatja: 2019-ben az AK-ban szenvedő betegek számát mintegy 57,4 millió főre becsülték, mely szám 2050-re közel háromszorosára, 152,8 millióra nőhet [124].

Az AK egy rendkívül komplex betegség, kialakulásához számos tényező hozzájárulhat. A betegség molekuláris hátterének feltárását tovább nehezíti, hogy a kór a legbonyolultabb, legösszetettebb szervünket érinti: az agyat, melynek működését a mai napig nem sikerült maradéktalanul feltárni. A betegséget és magának az agynak a pontos működését övező megválaszolatlan kérdések is hozzájárulhattak ahhoz, hogy az AK kialakulásának lehetséges okairól több elképzelés is napvilágot látott [120] – a teljesség igénye nélkül, beszélhetünk kolinerg- [125], amiloid-kaszkád [126], tau-[127], fémion- [128] és oxidatív stressz hipotézisről [129]. A szakemberek által talán legszélesebb körben elfogadott elméletek az amiloid-kaszkád, illetve a tauhipotézis. A következő bekezdésekben ezeket mutatom be röviden.

Az 1990-es évek elején ismertetett **amiloid-kaszkád hipotézis** szerint az AK kialakulásáért az amiloid- $\beta$  plakkok lerakódása a felelős. Az  $A\beta$  fehérjék az egészséges szervezetben is jelen vannak. Fiziológiás körülmények között először az  $\alpha$ -szekretáz enzim hidrolizálja az amiloid prekurzor proteint, majd a  $\gamma$ -szekretáz hasítja: ily módon nem keletkeznek oldhatatlan  $A\beta$  molekulák. Azonban amiloidogenezis során az APP-t a  $\beta$ -, majd a  $\gamma$ -szekretáz hasítja, ami toxikus  $A\beta$  formák kialakulását eredményezi [130]. Az elmélet az  $A\beta$ -t tekinti a patológiás kaszkád indítómolekulájának: a szenilis plakkok megjelenését követi a tau fehérje hiperfoszforilációja, a hibás szerkezetű fehérjék összetapadnak, végül az idegsejtek elpusztulnak [130].

A 2009-ben napvilágot látott **tauhipotézis** [127] középpontjában a tau protein szerkezetének megváltozása áll. Az elmélet alapja az a megfigyelés, hogy a neurofibrilláris kötegek elsőként a transentorhinalis és az entorhinalis kéreg<sup>3</sup> idegsejtjeiben jelennek meg, ahonnan az aggregátumok "prionsze-rűen" terjednek szét az agy egyéb területeire [132,133].

Számos olyan elképzelés is létezik, melyek szerint a tau és az  $A\beta$  fehérje egymásra hatva felelősek az AK-patomechanizmus kialakulásáért: a leggyakrabban a ravasz és a golyó [134], illetve a bozóttüzet fellobbantó gyufa [135] metaforákkal találkozhatunk. Ugyanakkor, habár több hipotézis is ismert, a tudománynak a mai napig nem sikerült egyértelmű és kielégítő magyarázattal szolgálnia arra a kérdésre, hogy a két protein hibás működése pontosan miként idézi elő az Alzheimer-kórban szenvedő betegek szervezetében a kóros állapot kialakulását.

A fent említett elméletek középpontjában az  $A\beta$ , illetve a tau fehérje szerkezetének megváltozása áll, mely folyamatra a különböző – akár esszenciális – fémionok jelentős hatást gyakorolhatnak, így egyre inkább

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Az entorhinalis és transentorhinalis kéreg a hippokampusz belépő és kimenő kapuja, melyek a memóriatárolásban játszanak fontos szerepet. Ezen régiók sérülése felelős az AK-ra jellemző memóriazavarért és emlékezetvesztésért.

teret hódít az ún. **fémionhipotézis**, mely szerint az AK legalább annyira metallopátiának tekinthető, mint proteopátiának [136].

#### 3.3.2. A tau fehérje jellemzése, szerepe az Alzheimer-kór lefolyásában

Az 1975-ben felfedezett tau [137] az idegsejtek sejtplazmájában található, mikrotubulus-asszociált fehérje, mely legnagyobb mennyiségben a neuronok axonjaiban fordul elő. A fiziológiás funkciójú protein a mikrotubuláris hálózat dinamikus átrendeződésében, illetve stabilizálásában játszik szerepet, valamint ezzel összefüggésben részt vesz az idegsejtek morfológiájának kialakításában és az axonális transzportban is [138]. A makromolekulát egyetlen gén, a 17-es kromoszómán található (17q21), 16 exont tartalmazó úgvnevezett MAPT-gén kódolja [139]. Az emberi agyban az N1. N2 és R2 szakaszokat kódoló 2-es, 3-as és 10-es exonok alternatív splicingjával<sup>4</sup> hat különböző, 352-441 aminosavból álló izoforma alakul ki [140]. Az izoformák között különbségek lehetnek a tubulinkötő helyek mennyiségében, valamint az N-terminális véghez tartozó, 29 aminosav hosszúságú szakasz meglétében vagy hiányában. A 2-es és 3-as exonok alternatív splicingjával olyan fehérjeváltozatok jönnek létre, melyek nem tartalmazzák a 29 aminosavból álló szakaszt (0N), illetve abból egyet (1N) vagy kettőt (2N) tartalmaznak. A 10-es exon alternatív splicingja három (3R) vagy négy (4R) mikrotubuluskötő régiót tartalmazó izoformákat eredményez. Az egészséges emberi agyban a 3R és 4R izoformák aránya közel 1:1 [140], mely arányszám egyes neurodegeneratív megbetegedésekben megváltozik.

A tau molekulán belül biokémiai jellemzőik alapján négy fő régiót [115] különböztetünk meg (7. *ábra*). A 150 aminosavból álló **N-terminális szakasz** kinyúlik a mikrotubulusok felszínétől. Habár a fehérje ezen régiója nem kötődik közvetlenül a mikrotubulusokhoz, szerepet játszik azok dinamikus viselkedésének szabályozásában, valamint hatással van arra, hogy a mikrotubulusok és az egyéb sejtalkotók milyen távolságra helyezkednek el egymástól [141] (azaz, közvetlenül kapcsolódnak-e egymáshoz vagy tér választja el őket). A 151-243 aminosavszakaszt felölelő régiót **prolinban gazdag doménnek** nevezzük. A prolin aminosavak nagy része –SerPro– vagy –ThrPro– motívumok formájában fordul elő, illetve ez a domén hét –Pro-X-X-Pro– motívummal is rendelkezik, melyek a feltételezések szerint az SH3-tartalmú fehérjék<sup>5</sup> – például a protein kinázok Src családjának – potencionális felismerő helyei lehetnek. A tau és az SH3 tartalmú proteinek

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Az alternatív splicing a génexpresszió szabályozott folyamata, melynek során bizonyos exonok kivágódnak a génből, így nem vesznek részt a transzláció előtt álló hírvivő RNS képzésében.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Åz SH3 (Src-homológ 3) domén konzervált szerkezeti egység, mely képes más fehérjék prolinban gazdag szakaszait felismerni és hozzájuk kötődni.

között közvetlen kölcsönhatásról számoltak be [142], mely kölcsönhatások

valószínűleg a mikrotubulus-asszociált fehérie jelátvivő funkcióiban játszanak szerepet. Továbbá. prolinban а gazdag domén részt vesz a mikrotubuláris hálózat átrendeződésének szabályozásában [143] és az aktin megkötésében is [144], ami arra utal, hogy ennek a régiónak fontos szerepe van az idegsejtek morfológiájának fenntartásában. A mikrotubuluskötő domén (244-370



aminosav-szekvencia) négy, tökéletlenül ismétlődő motívumot tartalmaz. A tau és a mikrotubulusok ezeken az ismétlődő egységeken keresztül lépnek kölcsönhatásba egymással. A 371-441 aminosavakat magába foglaló régió alkotja a protein **karboxiterminusát**. A C-terminális szakasz pontos szerepe nem ismert, ahogy az is tisztázásra vár, hogy milyen fehérjék kötődnek ehhez a régióhoz. Egyes vizsgálatok arra utalnak, hogy az ebben a doménben bekövetkező változások hathatnak a protein egyéb régióira, így a karboxiterminus közvetetten befolyásolhatja egyrészt a tau és az egyéb fehérjék között kialakuló kölcsönhatásokat, másrészt hatással lehet a molekula foszforilációs állapotára is.

Számos esetben megfigyelték, hogy a neurodegeneratív betegségek lefolyása során a tau fehérje különböző poszttranszlációs módosulásokon megy keresztül, úgy mint hiperfoszforiláció [146], glikoziláció [147], oxidáció [148], glikáció [149], acetilálás [150], nitrálódás [151], ...stb. A fenti folyamatok közül kétségkívül a hiperfoszforiláció tart számot a legnagyobb érdeklődésre, a felsoroltak közül ez a legintenzívebben kutatott folyamat. A 441 aminosavból álló tau molekula 85 potenciális foszforilációs helyet tartalmaz: 45 szerin és 35 treonin alkoholos, valamint 5 tirozin fenolos hidroxilcsoportjára kerülhet foszfátcsoport. Kutatások igazolták, hogy a megfelelő működéshez a fehérje bizonyos mértékű foszforiláltsági állapota elengedhetetlen [152], és fiziológiás körülmények között a foszforilált és defoszforilált állapot közötti dinamikus egyensúlyt kinázok és foszfatázok szabályozzák. Kóros esetben azonban hiperfoszforiláció következik be és ún. hiperfoszforilált formák alakulnak ki. Összehasonlításként: míg az egészséges kontrollszervezetek post mortem szövetmintáiban az oldható tau

fehérjék oldalláncai közül 10 foszforilált, addig az AK-ban szenvedő betegek mintáiból izolált oldhatatlan fehérjeváltozatok mintegy 45 oldalláncán található foszfátcsoportot [153,154].



Azon túl, hogy a hiperfoszforilált tau mikrotubuluskötő képessége csökkent mértékű az egészséges proteinéhez képest, további problémát jelent, hogy a folyamat eredményeként a fehérje aggregációs hajlama is fokozódik. A protein rendellenes változatai elválnak a mikrotubulusoktól, a kötetlen tau citoszolikus mennyisége megnő és különféle oldható vagy oldhatatlan oligomerek keletkeznek, amelyek páros helikális filamentumokat, majd neurofibrilláris kötegeket képeznek [156]. Az aggregáció végül a mikrotubuláris hálózat szétesését, a sejtvázrendszer összeomlását, végső soron az idegsejtek pusztulását eredményezi (8. *ábra*). Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy a tau hiperfoszforilációja kulcsfontosságú szerepet játszik az AK-kórkép kialakulásában. A kóros foszforilációt összefüggésbe hozzák a fémionhipotézissel is, hiszen a foszfátcsoport(ok) beépülésével a fehérje negatív töltés(ek)re tesz szert, amely elősegítheti a fémionokkal való elektrosztatikus kölcsönhatások kialakulását. A protein számos potenciális kötőhelyet tartalmaz, többek között tizenkét hisztidin imidazolnitrogént és két cisztein tiolátkénatomot. Ezek horgonydonorként szolgálhatnak az esszenciális fémionok (pl. Cu(II), Fe(II/III), Zn(II)) megkötődéséhez, mely kationok kiválthatják a fehérje hiperfoszforilációját és elősegíthetik az aggregációs folyamatok lejátszódását [157].

#### 3.3.3. A fémionok szerepe a neurodegeneratív megbetegedésekben

A fémionok megfelelő eloszlása és homeosztázisa elengedhetetlen a normális idegi működéshez. Ugyanakkor, az agy egyes területein magas koncentrációban felhalmozódó fémionok különböző fehérjék aggregációját idézhetik elő (pl.  $A\beta$ -ból álló szenilis plakkok és tau alkotta NFK-k jöhetnek létre), mely aggregátumok toxikusak a neuronok számára. Ezek az aggregátumok különféle mechanizmusok alapján alakulhatnak ki:

- a fémion kötődésének hatására az adott fehérje harmadlagos szerkezete megváltozik;
- a fémion kötődésének hatására nulla nettó töltéssel rendelkező fémionfehérje komplex alakul ki, a semleges töltésű részecske kicsapódik, ami felgyorsíthatja az aggregációs folyamatok lejátszódását [158];
- a fémion hatására új intermolekuláris keresztkötések alakulnak ki a proteinszálak között;
- a fémion koordinációjának hatására a fehérje oligomer formája nagyobb stabilitásúvá válik, megváltoztatva a protein morfológiáját [159];
- a fémion és a fehérje között kialakuló kölcsönhatás megváltoztathatja a protein szerkezetét és dinamikus viselkedését: a kötődés hatására a fehérje natív szerkezete destabilizálódik és a protein legombolyodása energetikailag kedvezményezetté válik [160].

A neurodegeneratív megbetegedésekkel összefüggő tanulmányok arra utalnak, hogy a 3d-mezőbeli átmenetifémionok, valamint a kalciumion homeosztázisának zavara összefüggésbe hozható az AK-patológiában szerepet játszó fehérjék hibás szerkezetű formáinak kialakulásával és a proteinek aggregációjával [161]. Az AK-ban szenvedők vérében, illetve a szérumban csökkent, míg a gerincvelői folyadékban és a neokortikális agyi régióban megemelkedett cink(II)ion-szintet figyeltek meg [162,163]. Ezzel
párhuzamosan az ún. neuropilben<sup>6</sup> nagy koncentrációban mutatták ki a cink(II)- mellett a réz(II)- és a vas(II)ionok jelenlétét is [164]. A tudomány jelenlegi állása szerint a neurodegeneratív megbetegedésekben a fémionok homeosztázisának zavara nem toxikus fémexpozícióra vezethető vissza. Sokkal inkább arról lehet szó, hogy az endogén szabályozó mechanizmusok nem megfelelő működésének következtében egyes idegsejtek elveszítik fiziológiás funkciójukat, míg más neuronokban toxikus fémionfelesleg halmozódik fel. Ugyanakkor a mai napig kérdéses, hogy a fémionok eloszlásának zavara az AK egyik tünete vagy esetleg a betegség kiváltó oka.

#### 3.3.3.1. A tau fehérje kölcsönhatása a fémionokkal

Az eddigi kutatások elsősorban a réz(II)-, a cink(II)- és a vas(II/III)ionok hatását vizsgálták, így a legtöbb információ az ezekkel a fémionokkal kialakuló kölcsönhatásokról áll a rendelkezésünkre. Az alábbiakban a kutatásunk szempontjából releváns, réz(II)- és cink(II)ionokkal kapcsolatos ismereteinket mutatom be röviden.

A réz(II)ionok AK-ban, illetve a tau fehérje aggregációs folyamataiban betöltött szerepe vitatott. Számos tanulmány számolt be a fémion aggregációt elősegítő szerepéről [165-167], amivel összhangban a neurofibrilláris kötegekben megemelkedett rézszintet mutattak ki [168]. Ennek az elképzelésnek némiképp ellentmondva egyes kísérleti tapasztalatok alapján arra következtettek, hogy a fémion a proteinhez kötődve in vitro körülmények között képes lehet gátolni a tau aggregációját [169], ugyanakkor elősegíti a hippokampusz neuronjaiban a fehérje hiperfoszforilációját [167]. Szintén a fémion aggregációt gátló hatását támasztja alá egy in vivo tanulmány, melynek során AK-s egerek agyában az intracelluláris rézkoncentrációt réz(II)-bisztioszemikarbazon komplex adagolásával növelték. Ez a feltételezések szerint olyan jelátviteli útvonalak aktiválódását eredményezheti, melyek hatására az  $A\beta$ trimerek mennyisége csökken, a tau foszforilációja visszaszorul és a kísérleti egerek Y-tesztben<sup>7</sup> mutatott teljesítménye fejlődik: akár a normális kognitív funkciókkal rendelkező állatok szintjét is elérhetik [170]. Vagyis az intracelluláris réz biohozzáférhetőségének növelése képes lehet visszaállítani a normális kognitív funkciókat azáltal, hogy gátolja a toxikus  $A\beta$  trimerek és a hiperfoszforilált tau felhalmozódását.

Vizsgálatok folynak annak felderítésére is, hogy a fehérje melyik része lehet a réz(II)ionok elsődleges kötőhelye – ezek többsége a mikrotubuluskötő régióra irányul. Az R1, R2 és R4 domének egy-egy hisztidil-oldalláncot

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> A neuropil az idegrendszer axonokat, dendriteket és támasztósejteket magába foglaló, szinapszisokban gazdag területe.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Az Y-labirintus az állatok iránytanulási képességének vizsgálatára alkalmas egyszerű teszt, mely a kísérleti állatok felfedezőtevékenységén alapul. Segítségével a hosszú- és a rövidtávú memória is vizsgálható.

tartalmaznak (His268, His299, His362); az R3 régióban pedig két hisztidin található egymás melletti pozíciókban (His329, His330). Shin és Saxena az R1, R2, R3 és R4 régiókban található, 18 aminosavból álló, tökéletlenül ismétlődő szakasz réz(II)ionok megkötésében játszott szerepéről számoltak be [171]. A fémion koordinálásában a hisztidin imidazolnitrogénen kívül a peptidváz deprotonálódott amidnitrogénjei is részt vesznek, stabilizálva a Cu(II):oktadekapeptid komplexek szerkezetét. Megállapították, hogy a mikrotubulusok és a tau fehérje közötti kölcsönhatásokat kialakító oldalláncok nem játszanak szerepet a réz(II) megkötésében, ami lehetőséget teremt arra, hogy a fémion mikrotubulushoz kötött tauhoz koordinálódjon, ezáltal megváltoztatva a protein másodlagos szerkezetét. Azonban meg kell említenünk, hogy ezen következtetéseket terminálisan szabad peptidek vizsgálatából vonták le. Bacchella és munkatársai az R1 és R3 domének komplexképződési folyamatait réz(II)- és réz(I)ionok jelenlétében tanulmányozták [172]. Az R1 régió fémionmegkötő-képességét a tau(256-273) szekvenciával modellezték, míg az R3 domén rézionok jelenlétében lejátszódó komplexképződési folyamatait a terminálisan szintén védett, 13 tagú oligopeptiddel, a tau(323-335) fragmenssel vizsgálták. Mindkét ligandummal 1:1 sztöchiometriájú, egymagvú réz(II)komplexek keletkeznek, melyekben a fémion a hisztidin imidazolnitrogénen és a deprotonálódott peptidnitrogéneken keresztül koordinálódik. Igazolták, hogy a tau(323-335) származék egyik hisztidil-oldallánca az ekvatoriális síkban, míg a másik imidazolilcsoport axiálisan koordinálódik a fémionhoz. Ugyanakkor, a réz(I)ionok számára csak a szomszédos His329-His330 oldalláncok bizonyultak jó kötőhelynek; az egyvegyértékű fémion és a tau(256-273) fragmens között nem számoltak be számottevő kölcsönhatás kialakulásáról. Más tanulmányok bizonyították, hogy a tau fehérje N-terminális szakasza is képes a réz(II) megkötésére a 14-es és a 32-es helyzetű imidazolilcsoportokon keresztül. Különösen a -TMH- szekvenciát tartalmazó tau(26-33) származékok bizonyultak hatékonynak a fémion koordinálásában [2].

Habár a tau fehérjét érintő aggregációs folyamatok lejátszódásának pontos mechanizmusát a mai napig nem ismerjük, egyre több bizonyíték utal arra, hogy az agy cinkegyensúlyának felborulása szerepet játszhat az AK kialakulásában, és a citoplazma csökkent és megemelkedett cink(II)koncentrációját egyaránt összefüggésbe hozzák a betegséggel [173]. A cink a tau hiperfoszforilációs folyamataiban a feltételezések szerint két különböző útvonalon keresztül játszhat szerepet. Egyrészt, in vitro közvetlenül hathat a fehériére а -SerProés -ThrPromotívumokhoz vagy а Cys291 és Cys322 ciszteinil-oldalláncokhoz kötődve. Másrészt, a fémion kináz- és foszfatáz-útvonalak aktiválása révén közvetett módon is részt vehet a protein hiperfoszforilációjában, például a Raf-mitogénaktivált proteinkináz<sup>8</sup> aktiválásán [174] vagy különböző foszfatáz enzimek, például a PP2A inaktiválásán keresztül [175]. Valószínűsítik, hogy a toxicitás kialakulásához mind a fehérje hiperfoszforilált állapota, mind pedig a cink(II)ionokkal kialakított kölcsönhatás szükséges.

Mindezek fényében különösen fontos a cink(II)ionok megfelelő homeosztázisának fenntartása az AK-ban szenvedő betegek agyában. Cink(II) hiányában a monomer tau-molekulák szálakká alakulása lassú folyamat, de a fémion már µM mennyiségben is drasztikusan fokozza a szálképződést mind oxidatív, mind reduktív körülmények között. A folyamat koncentrációfüggő: a jelenlévő cink(II)ionok mennyiségétől függően szálas vagy szemcsés aggregátumok is kialakulhatnak [176]. A fémion aggregációt elősegítő hatását elsősorban a Cys291 és Cys322 ciszteinil-oldalláncok közötti intramolekuláris diszulfidhíd kialakulásának tulajdonítják [177], de a folyamatot a fémion és egyéb, a cink(II)ionokat kisebb affinitással kötő fehérjeláncok között kialakuló gyenge kölcsönhatások is fokozhatják [178].

A ciszteinil-oldalláncok cink(II)ionok megkötésében játszott szerepét támasztja alá az úgynevezett K19 származék (*tau*(243-274)(305-324)(337-347)) komplexképződési folyamatait vizsgáló tanulmány. Megállapították, hogy a cisztein mellett imidazolilcsoportokat is tartalmazó K19 ligandum erősebben köti a cink(II)ionokat az R3 régió fémionmegkötését modellező, hisztidint nem tartalmazó *tau*(305-324) fragmensnél. Ez arra utal, hogy a cink(II) megkötésében a tiolátcsoporton kívül hisztidil-oldalláncok is részt vesznek, növelve a képződő fémkomplexek termodinamikai stabilitását [179].

A **nikkelion** létfontossága az emberi szervezetben nem bizonyított és a taupátiákban esetlegesen betöltött szerepéről sem áll rendelkezésre túl sok információ. Ugyanakkor, egy 2019-ben publikált tanulmányban a kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy a nikkel(II)-klorid, illetve annak morfolin konjugátumai védő hatásúak lehetnek az AK lefolyásában [180]. A vegyületek védő szerepét annak tulajdonítják, hogy azok – a feltételezések szerint – elősegíthetik a tau-aggregátumok szétesését.

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> A Raf enzim a szerin/treonin kinázok közé tartozik, és az enzimatikus kaszkádban az egy szinttel alatta elhelyezkedő MEK enzimcsalád tagjait foszforilálja és aktiválja. A *MEK* rövidítés az angol "**M**itogen-activated/Extracellular signal-regulated **K**inase kinase" kifejezés rövidítése, melynek jelentése: mitogén aktivált/extracellularis szignál-regulált kináz kináz.

# 4. Kísérleti módszerek és alkalmazott technikák

## 4.1. Felhasznált vegyszerek, vizsgált ligandumok

# 4.1.1. A szilárdfázisú peptidszintézishez és a ligandumok tisztaságának ellenőrzéséhez használt vegyszerek

A peptidek előállítása során használt valamennyi oldószer és szilárd reagens kereskedelmi forgalomból származik, és további tisztítás nélkül került felhasználásra. A ligandumok C-terminális amid végződését biztosító Rink Amide AM gyantát, a 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilammóniumtetrafluoroborátot (TBTU) valamint a 9-fluorenil-metoxi-karbonil (Fmoc) védőcsoporttal ellátott aminosav-származékokat (Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Pro-Fmoc-Ser(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH) OH. a Novabiochem (Svájc) forgalmazza. A szintetikus célokra használható N,N-dimetil-formamid (DMF), az N-metil-2-pirrolidon (NMP), az N-hidroxi-benztriazol hidrát (HOBt·H<sub>2</sub>O), a dietil-éter (Et<sub>2</sub>O), a trifluorecetsav (TFA), a triizopropilszilán (TIS) és a 2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol (DODT) a Sigma-Aldrich Co. termékei. A 2-metil-2-butanolt és az N,N-diizopropil-etilamint (DIPEA) a Merck Co. hozza forgalomba. Az ecetsavanhidrid (Ac<sub>2</sub>O) a VWR International Kft-től, míg a piperidin, a diklórmetán és a 96%-os ecetsav a Molar Chemicals Kft-től származik.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás vizsgálatokhoz használt acetonitrilt (ACN) a *Sigma-Aldrich Co.*, míg a HPLC-tisztaságú trifluorecetsavat a *Merck Co.* forgalmazza.

### 4.1.2. Vizsgált ligandumok

A kutatásokhoz használt Ac-GNIHHKAG-NH<sub>2</sub>, Ac-GNGHHKPG-NH<sub>2</sub>, Ac-GNGHAKPG-NH<sub>2</sub>, Ac-GNGAHKPG-NH<sub>2</sub> és Ac-TMHQDNIHHKP-NH<sub>2</sub> szekvenciájú peptideket a *SynPeptide Co.* (Kína) gyártotta. Az Ac-SKCGSLGNIHHKPG-NH<sub>2</sub> és Ac-SKCGSLGNIHHHKPG-NH<sub>2</sub> ligandumokat a *Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén* állítottam elő. A HAVAHHH-NH<sub>2</sub> származékot *Dr. Bihari Zsolt* szintetizálta, míg az Ac-GNIHHKPG-NH<sub>2</sub> és Ac-GNIHHKPGKLVFF-NH<sub>2</sub> fragmenseket *Dr. Szunyog Györgyi* és *Dr. Lukács Márton* állították elő a cataniai *Consiglio Nazionale Delle Ricerche - Instituto Di Biostrutture e Bioimmagini* (CNR-IBB) kutatóközpontban egy kétoldalú szakmai együttműködés keretében. A vizsgált tau fragmensek értekezésben használt rövidítéseit az *1. táblázat* foglalja össze; a *9. ábra* az előállított és tanulmányozott ligandumok szerkezeteit mutatja be.

Szekvencia	Az értekezésben használt rövidítés
Ac-GNIHHKPG-NH <sub>2</sub>	tau(326-333)
Ac-GNIHHKAG-NH <sub>2</sub>	tau(326-333)mA
Ac-GNGHHKPG-NH <sub>2</sub>	tau(326-333)mG
Ac-GNGAHKPG-NH <sub>2</sub>	tau(326-333)mGA
Ac-GNGHAKPG-NH <sub>2</sub>	tau(326-333)mGH
Ac-SKCGSLGNIHHKPG-NH <sub>2</sub>	tau(320-333)
Ac-SKCGSLGNIHHHKPG-NH <sub>2</sub>	tau(320-333)mH
Ac-TMHQDNIHHKP-NH <sub>2</sub>	tau(30-34)(327-332)
Ac-GNIHHKPGKLVFF-NH <sub>2</sub>	tau(326-333) KL

1. táblázat: A vizsgált tau fragmensek értekezésben használt rövidítései

#### 4.1.3. Az oldategyensúlyi vizsgálatok során alkalmazott vegyszerek

A sav-bázis titrálásokat megközelítőleg 0,20 M-os, pontosan ismert koncentrációjú, karbonátmentes, argongáz alatt tárolt kálium-hidroxid oldattal végeztem. A mérőoldat pontos koncentrációját 0,0500 M-os káliumhidrogén-ftalát oldattal határoztam meg, a minták állandó ionerősségét kálium-klorid biztosította. Az elektród kalibrálásához, a pH-potenciometriás mérésekhez, valamint a pH állításához használt kálium-hidrogén-ftalát (BDH Prolabo, VWR International Kft.), kálium-klorid (Merck Co.) és káliumhidroxid (Merck Co.) oldatok szilárd vegyszerekből, a ~ 0,20 M koncentrációjú sósav-oldat tömény sav hígításával készült háromszor ioncserélt víz (Millipore) felhasználásával. A ligandumok komplexképző sajátságainak vizsgálatához használt réz(II)-klorid, nikkel(II)-klorid és cink(II)-klorid törzsoldatok a Reanal Finomvegyszergyár Zrt. által gyártott a.l.t. minőségű vegyszerekből készültek. Az oldatok pontos fémionkoncentrációját a megfelelő oxinát-csapadék formájában, gravimetriás titrálással, míg a savkoncentrációkat pH-potenciometriás módszerrel határozták meg.

#### 4.1.4. Az ESR-vizsgálatokhoz használt vegyszerek

Az ESR-vizsgálatokat 0,05 M koncentrációjú, izotóptiszta <sup>63</sup>Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> törzsoldat felhasználásával végezték, amit a 99%-ot meghaladó <sup>63</sup>Cu-tartalmú fémréz (*Medgenix*, Ratingen, Németország) nitráttá alakításával nyertek.

#### 4.1.5. A Thioflavin T assay vizsgálatokhoz használt vegyszerek

A vizsgálatokhoz használt  $A\beta(1-42)$  peptid a *Bachem* (Svájc) terméke, a Thioflavin T-t a *Sigma-Aldrich Co.* (St. Louis, Missouri) hozta forgalomba. A vizsgálatok során szükséges ~ 7,4-es pH beállításához használt nátriumdihidrogén-foszfát/dinátrium-hidrogén-foszfát puffert a szilárd anyagok háromszor ioncserélt vízben történő feloldásával nyertem.





Az ESR-vizsgálatokra a Cataniai Egyetemen (*Università di Catania*), a tömegspektrometriai vizsgálatok egy részére és az inhibíciós vizsgálatokra a CNR-IBB kutatóközpontban, *Dr. Giuseppe Pappalardo* kutatócsoportjával való kétoldalú együttműködés keretében (2019-2.1.11-TÉT-2019-00055) került sor, amelybe egy tanulmányút révén én is bekapcsolódtam.

#### 4.2 Szilárdfázisú peptidszintézis

A vizsgált ligandumokat a felépítő aminosavakból állítottuk elő az Nterminális védőcsoport eltávolítása és az egyes aminosavak kapcsolása révén szilárdfázisú peptidszintézis segítségével. Az 1984-ben kémiai Nobel-díjjal jutalmazott technikát, mely során a peptidet oldhatalan szilárd hordozóra, úgynevezett gyantára kapcsolva állítják elő, Robert Bruce Merriefield, amerikai professzor dolgozta ki 1963-ban [181]. A szilárdfázisú peptidszintézis előnye, hogy a reagenseket nagy feleslegben alkalmazhatjuk, ami egyrészt teljesebb konverziót biztosít, másrészt segít a kis térfogatokkal való munka során jelentkező hibák kiküszöbölésében. A keletkező melléktermékek és a reagensek feleslege szűréssel eltávolítható a reakciótérből, vagyis nincs szükség az egyes aminosavak kapcsolása után a peptid kicsapására, majd újbóli feloldására, ami – amellett, hogy idő- és energiaigényes – a kitermelést is csökkenti. A módszer további előnye, hogy a hasítási és kapcsolási lépések ciklikus ismétlődése lehetővé teszi a szintézis automatizálását [182].

A szilárdfázisú szintézis során alkalmazott gyanta egyfajta finomszemcsés műanyag, melynek 1 grammja mintegy 1 millió, milliméter nagyságú szemcsét tartalmaz. Felületén és belsejében olyan funkciós csoportok találhatók, melyeken keresztül aminosav-származékokat kapcsolhatunk kémiai kötésekkel a szilárd hordozóhoz. A peptidlánc felépítése a szekvencia karboxiterminusa felől indul: a C-terminális aminosav karboxilcsoportját kovalens kötéssel rögzítjük a gyantához. A további aminosavakat a láncvégi aminosavhoz kapcsoljuk, így az épülő peptid a szintézis teljes ideje alatt a gyantához kötve marad. A szilárd hordozónak kémiailag és mechanikailag egyaránt ellenállónak kell lennie, nem reagálhat a reagensekkel és az oldószerekkel, ahogy a növekvő peptidlánccal sem. Továbbá jól kell duzzadnia az alkalmazott oldószerekben, hogy az épülő peptidlánc könnyen hozzáférhető legyen valamennyi reagens számára. Fontos, hogy a gyanta és a peptid közötti kovalens kötés az előállítás körülményei között végig stabil maradjon, de a szintézis végeztével könnyen hasítható legyen. Mindezek mellett a szintézis sikerességét a szilárd hordozó szemcsemérete, -alakja és homogenitása is befolyásolja.

A peptidlánc felépítéséhez, azaz az aminosavak közötti savamidkötés kialakításához az amino- és a karboxilfunkciók védőcsoportjait el kell távolítanunk. Az esszenciális aminosavak több mint fele rendelkezik olyan funkciós csoporttal, mely a szintézis egyes szakaszaiban reakcióba lépne a reagensekkel, változatos összetételű melléktermékeket eredményezve. Ennek elkerülése érdekében ezeket a funkciós csoportokat a peptidszintézis teljes ideje alatt blokkolni kell, méghozzá olyan védőcsoportok alkalmazásával, melyek a szintézis körülményei között stabilak maradnak, de annak végeztével könnyen eltávolíthatók. Valamennyi ligandum előállítása során az Fmoc/tBu stratégiát alkalmaztuk [183], mely a nemkívánatos mellékreakciók kizárását az  $\alpha$ -aminocsoporton 9-fluorenil-metoxi-karbonil (Fmoc), az oldalláncokon pedig *terc*-butil (*t*Bu) vagy abból származtatható csoporttal biztosítja. Az Fmoc/tBu módszer az úgynevezett ortogonális védőcsoport-

stratégiák közé tartozik, vagyis az N-terminális és az oldalláncvédőcsoportok eltávolítása eltérő kémiai körülményeket igényel. Az Fmoc védőcsoport enyhe bázis (pl. piperidin) alkalmazásával távolítható el, míg az oldalláncok védőcsoportjai savas közegben (általában trifluorecetsavat tartalmazó oldattal) hasíthatók.

#### 4.2.2. Az aminosav-szekvencia felépítése

A peptideket automatizált módon, szilárdfázisú technikával, mikrohullámú Liberty 1<sup>™</sup> peptidszintetizátor (*CEM*, Matthews, Észak-Karolina) segítségével állítottuk elő. Oldószerként DMF-et használtunk. Valamennyi vizsgált modellpeptid C-terminális karboxilcsoportja blokkolt – ezt a szénterminuson amid végződést biztosító Rink Amide AM típusú - 1% divinil-benzollal térhálósított funkcionalizált polisztirol – gyanta [184] alkalmazásával értük el. A szilárd hordozót Fmoc védőcsoporttal ellátva hozzák kereskedelmi forgalomba, amit a szintézis első lépésében, az első aminosav kapcsolása előtt el kell távolítani. A védőcsoport hasítását a készülék 20% piperidintartalmú DMF-oldat segítségével végzi. A piperidin lehasítja a fluorén-gyűrű savas karakterű hidrogénjét, majd β-eliminációt követően nagy reaktivitású dibenzofulvén köztitermék képződik, ami adduktot képez a piperidinnel (ld. Függelék, A1. ábra). A keletkező adduktnak jellegzetes fényelnyelése van az ultraibolya tartományban, 301 nm-en ( $\varepsilon_{301nm} = 7800 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ ), így a védőcsoport eltávolításának hatékonysága spektrofotometriásan nyomon követhető. A reakció 80°C-on, 30 W teljesítményű mikrohullámú sugárzás alkalmazása mellett, 180 másodperc alatt megy végbe. A gyanta és az aminosavak Fmoc védőcsoportjának hasítását a készülékhez kapcsolt UV MONITOR egység (CEM, Matthews, Észak-Karolina) segítségével követtük nyomon. A védőcsoport eltávolításával a szilárd hordozó felületén hozzáférhetővé válik a szabad aminocsoport, melyhez hozzákapcsolhatjuk a soron következő aminosav karboxilcsoportját. Mivel a peptidkötés kialakítása energiaigényes folyamat és a szintézist – az előállítani kívánt molekulák hőérzékenysége miatt – általában szobahőmérsékleten (vagy ahhoz közeli hőmérsékleten) végezzük, a savamidkötés létrehozásához az amino- vagy a karboxilcsoportot aktiválni kell. A két lehetséges módszer közül – az aminocsoport aktiválásának nehézségei miatt – a kapcsolási reakciók alapja a karboxilfunkció aktiválása olyan reagensek alkalmazásával, melyek növelik az inert funkciós csoport elektrofilitását. Ezt általában in situ észterképzéssel valósítjuk meg: a TBTU és a HOBt aktivátorok DIPEA jelenlétében aktív észtert képeznek a kapcsolni kívánt aminosavval, ami könnyen reagál a gyantához kötött, épülő peptidlánc szabad aminocsoportjával. A szintézis során az aminosav-oldatokat négyszeres feleslegben, 0,2 M koncentrációban alkalmazzuk, a kapcsolni kívánt aminosav karboxilcsoportjának aktiválása a TBTU/HOBt/DIPEA stratégiának megfelelően történik. A hozam maximalizálása érdekében aktivátor reagens (0,5 M HOBt H<sub>2</sub>O és 0,5 M TBTU DMF-

es oldata) mellett aktivátor bázist (2,0 M DIPEA NMP-s elegye) is használunk. Az aminosav kapcsolását – mind a gyantához, mind pedig a növekvő peptidlánc megelőző aminosavához – a készülék 30 W teljesítményű mikrohullám segítségével, 80°C-on végzi, 300 másodpercen keresztül. A hasítási és kapcsolási lépést ismételve épül fel a kívánt szekvenciájú peptid. Az egyes reakciólépések között a készülék DMF hozzáadásával és az oldószer gyantáról való leszűrésével távolítja el a reagensek feleslegét. A vizsgált ligandumok többsége védett aminoterminussal rendelkezik. Az acetilcsoport kiépítését a készülék az utolsóként kapcsolt aminosav Fmoc védőcsoportjának lehasítását követően 6 V/V% ecetsavanhidridet és 5 V/V% DIPEA-t tartalmazó DMF-oldat hozzáadásával valósítja meg. A szintézist követően a gyantát diklórmetánnal, 96%-os ecetsavval, 2-metil-2-butanollal és dietil-éterrel mossuk.

#### 4.2.3. Az előállított peptidek hasítása a gyantáról

A nyerstermék hasítását valamennyi peptid esetén szobahőmérsékleten, 94% TFA, 2,5% TIS, 2,5% H<sub>2</sub>O és 1% DODT elegyében hajtottuk végre – a peptidlánc hosszától függően – 2-3 óra alatt. Ilyen körülmények között nemcsak a peptidet távolíthatjuk el a gyantáról, de az oldalláncbeli védőcsoportokat is lehasíthatjuk a ligandumról. A hasítóelegy hideg dietiléterbe való csepegtetésével jutottunk hozzá a fehér vagy halványsárga színű csapadékhoz. A nyerstermék kicsapását jeges fürdőben, folyamatos kevertetés mellett végeztük. A csapadékot centrifuga (ScanSpeed 406) segítségével elválasztottuk a folyadékfázistól, hideg dietil-éterrel mostuk, majd argongázas szárítást követően vízben feloldottuk és liofilizáltuk. Valamennyi esetben trifluorecetsav-sója formájában jutottunk hozzá az előállítani kívánt peptidhez. A peptidszintézis lépéseit a *Függelék A2. ábrája* mutatja be.

#### 4.2.4. Az előállított peptidek tisztaságának ellenőrzése és azonosítása

A szintézis során az egyedüli tisztítási eljárást a gyanta DMF-fel való mosása, majd az ezt követő szűrési lépés jelenti. Azonban előfordulhat, hogy az Fmoc védőcsoport eltávolítása és/vagy valamely kapcsolási lépés nem játszódik le teljesen, ami kis mennyiségben hiányos szekvenciájú peptidek képződését eredményezi. Ennek eredményeként a szintézis végén, a hasítást követően többkomponensű terméket kapunk. Ezt elkerülendő a hasítási és kapcsolási reakciók hatásfokának közel 100%-nak kell lennie az előállítás során, amit a reagensek nagy feleslegben való alkalmazásával, illetve bizonyos aminosavak esetén a kapcsolási lépés megismétlésével biztosíthatunk. Az UV MONITOR egység használata szintén a hiányos szekvenciájú ligandumok képződésének veszélyét hivatott csökkenteni.

A liofilizált termékek tisztaságáról nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia segítségével bizonyosodtunk meg, melyhez 250 mm  $\times$  4,6 mm átmérőjű, Vydac C18 típusú analitikai kolonnát (szemcseméret: 5 μm; pórusméret: 300 Å) és JASCO MD-2010 plus diódasoros detektorral felszerelt JASCO készüléket használtunk. A termék homogenitását a peptidkötésre jellemző maximális elnyelési hullámhosszon, azaz 222 nm-en történő detektálással ellenőriztük. A vizsgálat során gradiens elúciót alkalmaztunk, az eluálószer 0,1% TFA-t tartalmazó háromszor ioncserélt víz és azonos TFA-tartalmú acetonitril volt. A kromatográfiás profilok alapján a vizsgált ligandumok mindegyike egykomponensűnek bizonyult, a helyes szekvenciát tömegspektrometriás (ESI- vagy MALDI-MS) vizsgálatok igazolták. pH-potenciometriás mérések alapján az előállított peptidek hatóanyagtartalma minden esetben 90-95% közöttinek adódott.

#### 4.3. pH-potenciometria

Az oldatfázisban lejátszódó komplexképződési folyamatok egyensúlyi vizsgálatának egyik általánosan alkalmazott módszere a pH-potenciometria. A technika abban az esetben alkalmazható, ha a folyamat az oldat pH-jának megváltozásával jár, azaz, ha a fémion koordinálódásának hatására proton szorítódik le a ligandumról.

A hidrogénion  $(H^+)$  és a fémion  $(M^{m+})$  között lejátszódó kompetíciós reakció az (1) reakcióegyenlettel adható meg:

$$n\mathrm{HL} + \mathrm{M}^{\mathrm{m}+} \rightleftharpoons \mathrm{ML}_{\mathrm{n}}^{(\mathrm{m}-\mathrm{n})+} + n\mathrm{H}^{+} \tag{1}$$

A bruttó komplexképződési folyamatot a (2) egyenlettel írhatjuk fel (a könnyebb áttekinthetőség kedvéért a részecskék töltését nem tüntettem fel):

$$p\mathbf{M} + q\mathbf{H} + r\mathbf{L} \rightleftharpoons \mathbf{M}_{\mathbf{p}}\mathbf{H}_{\mathbf{q}}\mathbf{L}_{\mathbf{r}}$$
(2)

, ahol M a fémiont, H a hidrogéniont, L a ligandum teljesen deprotonált formáját, p, q és r pedig a sztöchiometriai együtthatókat jelöli.

pH-potenciometriás vizsgálatok segítségével meghatározhatjuk a keletkező részecskék összetételét és stabilitási szorzatát. A (2) reakcióegyenlet alapján képződő  $M_pH_qL_r$  összetételű komplexek bruttó stabilitási állandója ( $\beta_{pqr}$ ) a következőképpen számítható ((3) reakcióegyenlet):

$$\beta_{pqr} = \frac{M_p H_q L_r}{[M]^p [H]^q [L]^r}$$
(3)

A szabad ligandum protonálódási állandóit, valamint a minták ligandum- és protonkoncentrációját a SUPERQUAD programmal [185] számoltam. A különböző fémionokkal (réz(II), nikkel(II) és cink(II)) képződő komplexek stabilitási szorzatát a PSEQUAD számítógépes program [186] segítségével határoztam meg, ami D.D. Perrin és I.G. Sayce SCOGS nevű programjának Zékány László és Nagypál István által továbbfejlesztett változata. A PSEQUAD lehetővé teszi, hogy ugyanazon rendszer különböző

fémion:ligandum arányú mintáira kapott mérési adatokat párhuzamosan értékeljük ki. Bemenő adatként meg kell adnunk a titrálás során kapott primer térfogat-pH adatpárokat, a fémion, a ligandum és a hidrogénion analitikai koncentrációját, a minta kiindulási térfogatát, a mérőoldat (jelen esetben a ~ 0.20 M koncentrációjú kálium-hidroxid oldat) pontos koncentrációját, valamint a vízionszorzat (Kw) és az Irving-faktor (IRVátl) értékét. Az Irvingféle korrekciós tényezőt a diffúziós potenciál kiküszöbölésére szolgál, értékét az Irving és munkatársai által javasolt módszerrel [187] határoztam meg. A számításhoz szükséges egyéb paraméterek a következők: az M, L, H komponensek, illetve a képződő asszociátumok – nevezetesen a ligandum különböző protonáltsági fokú részecskéi, az  $M_pH_qL_r$  sztöchiometriájú fémkomplexek, illetve a hidroxidokomplexek – száma, valamint azok összetétele, továbbá a felsorolt részecskék pontos vagy közelítő stabilitási szorzata. A program a részecskék stabilitási állandóit a kiindulási komponensekre felírható (4-6) anyagmérleg-egyenletek megoldásával adja meg, ahol n a vizsgált rendszerben képződő asszociátumok számát jelöli:

$$c_{M} = [M] + \sum_{i=1}^{n} p_{i} \beta_{pqr} [M]_{i}^{p} [H]_{i}^{q} [L]_{i}^{r}$$
(4)

$$\mathbf{c}_{H} = [\mathbf{H}] + \sum_{i=1}^{n} q_{i} \beta_{pqr} [M]_{i}^{p} [H]_{i}^{q} [L]_{i}^{r}$$
(5)

$$\mathbf{c}_{L} = [\mathbf{L}] + \sum_{i=1}^{n} r_{i} \beta_{pqr} [M]_{i}^{p} [H]_{i}^{q} [L]_{i}^{r}$$
(6)

Az egy fémiont tartalmazó rendszerek mellett vegyes rendszerekben lejátszódó komplexképződési folyamatokat is tanulmányoztam. Ezekben az esetekben – az oldatban jelenlévő két különböző fémionnak megfelelően – a komponensek száma háromról négyre változik, ebből következően az anyagmérleg is négy komponensre írható fel. A megadott kiindulási paramétereket felhasználva, a PSEQUAD program Newton-Raphson iterációval közelíti a meghatározni kívánt stabilitási állandók értékét, mindaddig, míg a  $\sum (V_{számított} - V_{mért})^2$  számérték minimumot ér el (az egyenletben szereplő V a titráló oldat térfogatát jelöli). Az iterációsorozat végén megkapjuk az úgynevezett finomított stabilitási szorzatokat, azok hibáját, valamint a közelítés pontosságát jellemző, a |V<sub>számított</sub> - V<sub>mért</sub>| átlagértékeként definiált illesztési paramétert. Az értekezésben szereplő stabilitási állandók (log  $\beta$  [H<sub>a</sub>L<sub>r</sub>], log  $\beta$  [M<sub>b</sub>H<sub>a</sub>L<sub>r</sub>]) után zárójelben feltüntetett szám az utolsó tizedesjegy szerinti standard deviáció értékét jelöli. Továbbá, a program egy adott komponensre - ez általában a fémion, de több fémiont tartalmazó rendszerek esetén célszerűbb a ligandumot választani - nézve kirajzolja a részecskék koncentrációeloszlási görbéjét is a pH függvényében. A dolgozatban szereplő részecskeeloszlási diagramokat a komplexek összetételének, stabilitási szorzatának és a komponensek koncentrációjának ismeretében a SED program [188] Windows operációs rendszer alatt futó változatával, a MEDUSA-val szerkesztettem meg, majd MS Excel programmal ábrázoltam.

Gyakran előfordul, hogy a különböző ligandumok fémkomplexeinek képződését jellemző bruttó stabilitási szorzatok összehasonlítása közvetlenül nem lehetséges, csak a belőlük képzett, úgynevezett származtatott állandók vethetők össze. A következő néhány bekezdésben az értekezésben előforduló származtatott állandók számítását ismertetem röviden. Gyakran használt származtatott állandó a log  $K(M+N_{Im})$  érték, mellyel az oldalláncbeli imidazolilcsoportok koordinálódásával képződő makrokelát szerkezetű komplexek stabilitását jellemezhetjük. Abban az esetben, ha a ligandum teljesen deprotonált formában van és valamennyi imidazolgyűrűje a fémionhoz koordinálódik, a fent említett származtatott állandó értéke megegyezik az [ML] sztöchiometriájú komplex  $\log \beta$  értékével. Ugyanakkor, ha a ligandum nagy pH-n deprotonálódó funkciós csoportot tartalmaz – ilyen például a lizin ammóniumcsoportja, mely aminosavat az általunk vizsgált peptidek többsége tartalmazza –, akkor a log  $K(M+N_{Im})$  értéket a megfelelő protonálódási állandó(k) kivonásával kapjuk. Ennek megfelelően, a (7) egyenletben feltüntetett egyensúlyi reakció stabilitási állandóját a (8) egyenlet alapján számíthatjuk (a töltéseket a könnyebb áttekinthetőség kedvéért nem jelöltem):

$$M + H_x L \rightleftharpoons [MH_x L] \tag{7}$$

$$\log K(M+N_{Im}) = \log \beta [MH_xL] - \log \beta [H_xL]$$
(8)

Az általunk vizsgált réz(II)- és nikkel(II)ionok – valamint bizonyos esetekben a cink(II)ionok is – képesek elősegíteni az amidnitrogének deprotonálódását és koordinálódását. A kialakuló amidkoordinált komplexek képződésének jellemzésére – az egy lépésben deprotonálódó petidnitrogének számától függően – a (9) és (10) egyenletek alapján számított állandók használhatók:

$$pK(amid) = \log \beta [MH_nL] - \log \beta [MH_{n-1}L]$$
(9)

$$pK \text{ (amid)}_{\text{átl}} = \frac{\log\beta[MH_nL] - \log\beta[MH_{n-x}L]}{x}$$
(10)

, ahol x a fémion koordinálódása során az amidnitrogénről leszorított protonok számát jelöli.

A pH-potenciometriás titrálásokat vizes oldatban – illetve a ligandum rossz vízoldhatósága esetén 70% (V/V) DMSO-víz oldószerelegyben<sup>9</sup> –, 298 K hőmérsékleten végeztem. A mérések során az állandó hőmérsékletet Julaba F12 típusú ultratermosztát biztosította. Mérőoldatként ~ 0,20 M, pontosan ismert koncentrációjú, argonatmoszféra alatt tárolt, karbonátmentes kálium-

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> A 70% (V/V) DMSO-víz oldószerelegyet 1 liter, argongázzal átbuborékoltatott DMSO és a szükséges mennyiségű – szintén kiargonozott – háromszor ioncserélt víz elegyítésével készítettem.

hidroxid oldatot használtam, melvnek koncentrációját 0.0500 M-os káliumhidrogén-ftalát oldat titrálási görbéjének Gran-féle linearizációjával [189] határoztam meg. A titráló oldat adagolását vizes minták esetén 500 vagy 1000 µl végtérfogatú Hamilton-fecskendővel felszerelt, számítógép által vezérelt Mol-AcS mikrobürettával végeztem, a pH változását MOLSPIN pH-mérőhöz csatlakoztatott Metrohm 6.0234.110 kombinált üvegelektród mérte. A légköri szén-dioxid és oxigén kizárását a minták gőzterébe vezetett argongáz, a folyamatos kevertetést VELP mágneses keverőtest biztosította. A DMSO-víz oldószerelegyben lejátszódó komplexképződési folyamatok tanulmányozásához 6.0234.100 kombinált üvegelektróddal felszerelt Mettler Toledo DL50 típusú automata titrátort használtam. A titrálás során a mintákba argongázt vezettem, ami a légköri gázok kizárása mellett a minták folyamatos kevertetését is biztosította. Valamennyi minta titrálása előtt az elektródot a említett, 0,0500 M koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldat már segítségével kalibráltam, melynek pH-ja 298 K hőmérsékleten 4,005-4,008. A minták összeállítása során a kiindulási pH beállítására 10% vagy 1 ekvivalens, ~ 0,20 M koncentrációjú sósav-oldatot használtam, attól függően, hogy a peptid tartalmazott-e erősen savas pH-n deprotonálódó funkciós csoporto(ka)t. A savoldat pontos koncentrációját, valamint az aktuális rendszerparamétereknek megfelelő vízionszorzatot és az Irving-féle korrekciós tényezőt a már ismert töménységű kálium-hidroxid mérőoldattal való titrálás révén határoztam meg, a kapott erős sav-erős bázis titrálási görbe Gran-féle linearizációjával. A vizsgálni kívánt ligandumok törzsoldatait a szilárd peptidek bemérésével készítettam, oldószerként háromszor ioncserélt vizet vagy 70% DMSO-víz elegyet használtam. A peptidek mintabeli koncentrációja valamennyi esetben a  $7 \cdot 10^{-4}$  -  $2 \cdot 10^{-3}$  M tartományba esett. a mintákban a fémion:ligandum aránya 1:3 és 3:1 között változott. Az állandó 1,0 M koncentrációjú kálium-klorid oldat. ionerősséget illetve az oldószerelegyben végzett vizsgálatok során szilárd vegyszer hozzáadásával biztosítottam. A mintabeli 0,20 M ionerősség jó közelítéssel megegyezik a titráló oldat koncentrációjával, egyúttal jelentősen meghaladja a titrálándó minták fémion- és ligandum-koncentrációjának összegét. A minták kezdeti térfogata 3,00 vagy 4,00 ml volt; a titrálási adatok kiértékeléséhez használt számítógépes szoftverek (SUPERQUAD és PSEQAUD) figyelembe veszik a titrálás során bekövetkező térfogat-növekedést.

A pH-potenciometria kétségkívül hasznos és igen elterjedt technika a komplexképződési folyamatok tanulmányozására. A titrálási adatok fontos információval szolgálnak a vizsgált rendszerben képződő részecskék összetételéről és stabilitásáról, ugyanakkor a módszernek megvannak maga korlátai. Példának okáért, ha két komplex képződése azonos pH-effektussal jár, azok nem különböztethetők meg pH-potenciometria segítségével, de az is előfordulhat, hogy valamely rendszer több, kémiailag reális modellel is jó

illesztéssel leírható. Továbbá említést érdemel, hogy a komplexek stabilitási állandói a koordinációban résztvevő donoratomok számáról és minőségéről, valamint a kialakuló részecskék geometriájáról nem adnak felvilágosítást, így a pH-potenciometriás mérések eredményeinek alátámasztásához egyéb, szerkezeti információkat nyújtó vizsgálati módszerek (pl. UV-látható spektrofotometria, cirkuláris dikroizmus spektroszkópia, tömegspektrometria, mágneses magrezonancia vagy elektronspin rezonancia spektroszkópia) is szükségesek.

#### 4.4. UV-látható (UV-Vis) spektrofotometria

Az átmenetifémionok komplexeinek képződése során a ligandum elektromos terének hatására a központi fémion d-pályái felhasadnak, energiájuk eltérő lesz. A részecskékre jellemző fényabszorpciót a felhasadt dpályák közötti elektronátmenetek - vagy más néven d-d átmenetek -, a fémionról a ligandumra, illetve a fordított irányba lejátszódó töltésátviteli folyamatok okozzák. A komplexek abszorpciós spektrumai fontos szerkezeti információval szolgálnak: megadható a koordinációban résztvevő donoratomok száma és minősége, valamint a spektrális adatokból a keletkező részecskék geometriájára is következtethetünk. Az általunk vizsgált átmenetifémionok közül a réz(II) és a nikkel(II) peptidekkel képzett komplexei színesek, így ezen részecskék elektrongerjesztési spektrumát mutatom be részletesebben.

Α réz(II)komplexek spektrális sajátságait sokan és széleskörűen tanulmányozták, ezáltal gazdag szakirodalom áll rendelkezésünkre [190]. Oktaéderes térben a +2 oxidációs állapotú rézion d<sup>9</sup> elektronjainak energiaszintje mind gyenge, mind pedig erős terű ligandumok hatására – a kristálytérerősségtől függő mértékben - kétfelé hasad, majd a tetragonális torzulás az energiaszinteket újabb két-két szintre hasítja. Vagyis a réz(II)komplexekre jellemző tetraéderesen torzult oktaéderes térben a Jahn-Teller hatás következtében a <sup>2</sup>Eg alap- és a <sup>2</sup>Tg gerjesztett állapotok négyfelé hasadnak:  ${}^{2}B_{1g}$  (d<sub>x</sub>2-y2),  ${}^{2}A_{1g}$  (d<sub>z</sub>2),  ${}^{2}B_{2g}$  (d<sub>xy</sub>) és  ${}^{2}E_{g}$  (d<sub>xz</sub>, d<sub>yz</sub>) szintek jönnek létre. Ennek megfelelően az abszorpciós spektrumban a négy energiaszint közötti háromféle d-d átmenet, nevezetesen a  $d_{xz} (d_{yz}) \rightarrow d_{x^2-y^2}$ , a  $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$  $v^2$  és a  $d_{z^2} \rightarrow d_{x^2-v^2}$  sávok megjelenését várjuk. A gyakorlatban ezek az átmenetek általában nem különülnek el, hanem egyetlen széles abszorpciós sávvá olvadnak össze, melynek intenzitása és energiája a koordinálódó donoratomok számán és minőségén kívül a képződő komplexek geometriájától is függ. Utóbbiak hatását Sigel és Martin [47] mellett Pettit és munkatársai [48] is vizsgálták. Megállapították, hogy elsősorban az ekvatoriális síkban koordinálódó atomoknak van jelentős hatása a hullámszámra, valamint azt is megfigyelték, hogy az egyes donorcsoportokhoz rendelhető hatás additív [191]. A vizes oldatban jelenlévő  $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$  hexaakvaion négy ekvatoriális vízmolekulájának nitrogén- vagy oxigéndonoratomokkal történő helyettesítése az abszorpciós maximumot a rövidebb hullámhosszak felé tolja el. Ez az effektus különösen a nitrogéntartalmú funkciós csoportok koordinálódása esetén jelentős (2. *táblázat*).

2. táblázat: A réz(II)komplexek spektrális paramétereinek függése a koordinált nitrogénatomok számától

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

A kvantitatív összefüggések megadását nehezíti, hogy a "kékeltolódás" mértéke a donoratom minőségén kívül a kelátgyűrű méretétől és a ligandum fémionhoz nem koordinálódó, egyéb szubsztituenseitől is függ. Ha ezeket a hatásokat figyelmen kívül hagyjuk, a várható abszorpciós maximum hullámhosszát ( $\lambda_{max}$ ) egy empirikus összefüggés segítségével megközelítőleg 2%, azaz mintegy 10-12 nm pontossággal megadhatjuk [47]:

$$\lambda_{\max} [nm] = \frac{10^3}{[0.294(C=0/H_20) + 0.346(C00^-) + 0.460(NH_2) + 0.492(N=) + 0.434(Im)]}$$
(11)

Azonban meg kell jegyeznünk, hogy a (11) egyenlet nem alkalmazható abban az esetben, ha az ekvatoriális koordinációt valamely funkciós csoport axiális koordinációja egészíti ki. Ebben az esetben ugyanis az abszorpciós maximum kis mértékben a nagyobb hullámhosszak felé tolódik el. Az ekvatoriális sík torzulását szintén a fent említett, "vörös" vagy batokróm eltolódás kíséri – a jelenség egy jellegzetes példája a *bisz*-hisztamin típusú kötés kialakulása.

Komplexvegyületeiben a d<sup>8</sup> elektronkonfigurációjú **nikkel(II)ion** leggyakrabban 6-os és 4-es koordinációs számmal fordul elő [190]. A 6-os koordinációs számú, paramágneses sajátságú oktaéderes geometriájú, nagy spinszámú komplexek általában gyenge terű ligandumokkal alakulnak ki. Ezeknek a részecskéknek egy-egy spinmegengedett d-d átmenete van a közeli infravörös, a látható, valamint a közeli ultraibolya tartományban. Ennek megfelelően összesen három sáv jelenik meg az abszorpciós spektrum 1430-770, 910-500 és 520-370 nm hullámhossztartományában, melyek a  ${}^{3}A_{2g}(F) \rightarrow {}^{3}T_{2g}(F)$ ,  ${}^{3}A_{2g}(F) \rightarrow {}^{3}T_{1g}(F)$  és  ${}^{3}A_{2g}(F) \rightarrow {}^{3}T_{1g}(P)$  átmenetekhez rendelhetők. Ezek az átmenetek a Laporte-szabály értelmében szigorúan véve tiltottak, ennek megfelelően kis intenzitásúak ( $\varepsilon_{max} < 30 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ). Az említettek mellett létezik egy negyedik, szintén kis intenzitású, spintiltott átmenet is, mely azonban csupán vállként jelenik meg valamelyik sávon. 4-es koordinációs számmal tetraéderes vagy síknégyzetes geometriájú nikkel(II)komplexek képződnek, melyek fényelnyelése sokkal intenzívebb az oktaéderes komplexekénél. Gyenge terű, egyfogú ligandumokkal általában tetraéderes geometria alakul ki. Ezen részecskék abszorpciós spektrumában 500-900 nm között jelenik meg egy nagyobb intenzitású sáv ( $\varepsilon_{max} \sim 100-1000$  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ). Erős terű ligandumok, így például a peptidek deprotonálódott amidnitrogénjeinek koordinációja kis spinszámú, diamágneses sajátságú, síknégyzetes geometriájú nikkel(II)komplexek képződését eredményezi. Ezen részecskék 400-500 nm körül rendelkeznek egy nagy intenzitású, – tipikusan széles – elnyelési sávval ( $\varepsilon_{max} \sim 50-500$  M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>). Egy második, még ennél is intenzívebb sáv is megjelenhet 430 nm alatt, ami gyakran töltésátviteli eredetű.

A réz(II)- és nikkel(II)ionok mellett a peptidek **cink(II)ionok** jelenlétében lejátszódó komplexképződési folyamatait is vizsgáltam. A cink(II) elektronkonfigurációja d<sup>10</sup>, komplexei színtelenek, ami megnehezíti az optikai vizsgálatokat. Ugyanakkor, ha a ligandumnak az ultraibolya tartományban elnyelése van, mely deprotonálódás hatására megváltozik – pl. S<sup>-</sup>  $\rightarrow$  Zn(II) –, az UV-látható spektrofotometria is hasznos információkkal szolgálhat a komplexképződés folyamatáról és a kialakuló részecskék szerkezetéről [192].

Az UV-látható spektrumokat Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras és VWR UV-1600PC típusú egysugaras spektrofotométerrel vettem fel, 1,000 cm úthosszúságú kvarcküvettában, különböző pH-értékeken. A vizsgálatokat valamennyi esetben szobahőmérsékleten végeztem. A réz(II)- és nikkel(II)ionokat tartalmazó minták spektrumait a 900-200 nm, míg a szabad ligandumot, illetve a cink(II)iont tartalmazó oldatok fényelnyelését a 400-200 nm hullámhossztartományban rögzítettem. A mintákban a peptidek koncentrációja megegyezett a pH-potenciometriás mérések során alkalmazott koncentrációval, a fémion:ligandum arányt 1:3 és 3:1 között változtattam. A hullámhossz–abszorbancia adatpárokat a gyártók által biztosított számítógépes szoftverekkel regisztráltam, az értekezésben szereplő abszorpciós spektrumokat MS Excel táblázatkezelő szoftver segítségével ábrázoltam.

#### 4.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia [193]

A cirkuláris dikroizmus vagy röviden CD-spektroszkópia a polarizált fény és az optikailag aktív anyag kölcsönhatásán alapuló szerkezetvizsgálati módszer. A síkban polarizált fény felbontható egy balra és egy jobbra cirkulárisan polarizált hullám összegére, melyek azonos fázisúak és amplitúdójuk is megegyezik. Az optikailag aktív anyagok különbözőképpen lépnek kölcsönhatásba a síkban polarizált fény két komponensével –

törésmutatójuk és abszorpciós koefficiensük is eltér -. melvnek eredményeként a kilépő fénysugár elliptikusan polarizálttá válik. A balra és a jobbra cirkulárisan polarizált hullám abszorpciójának eltérését cirkuláris dikroizmusnak vagy felfedezője, Aimé Auguste Cotton, francia fizikus tiszteletére Cotton-effektusnak [194] nevezzük. A két fénysugár abszorpciójában mutatkozó különbség igen kicsi, a teljes abszorpciónak mindössze 1%-át teszi ki. A balra és jobbra cirkulárisan polarizált hullám elnyelődésének különbségét, illetve az ebből származtatható moláris abszorpciókülönbséget ( $\Delta \varepsilon = \varepsilon_{bal} - \varepsilon_{jobb}$ ) a hullámhossz függvényében ábrázolva jutunk a cirkuláris dikroizmus spektrumhoz. A CD-spektrumok minimumai és maximumai általában az abszorpciós sávokhoz képest keskenyebb Gaussgörbék, melyek az elektrongerjesztési spektrum maximuma helyén vagy ahhoz közel jelentkeznek. A CD-görbékből általában több információt nyerhetünk, mint az UV-Vis spektrumokból, hiszen a keskenyebb sávok miatt viszonylag ritkán fordul elő, hogy a különböző elektronátmenetek folyamatai átfednek egymással, továbbá a Cotton-effektusok előjele is fontos szerkezeti információt hordoz magában.

A fémkomplexek optikai aktivitása származhat a ligandum saját – már a komplexképződés előtt meglévő – aszimmetriájától, míg más esetekben az aszimmetriacentrum a ligandum fémionhoz való koordinációjával alakul ki. Utóbbi esetben beszélhetünk konfigurációs (a fémion körüli kelátgyűrűk elrendeződése királis) és konformációs aszimmetriáról (az egyes kelátgyűrűk konformációjából adódik a kiralitás) is [195]. Az általunk tanulmányozott réz(II)- és nikkel(II)komplexek vizes oldataiban általában a ligandum saját kiralitásának tulajdonított effektus és a konformációs aszimmetria hatása a legmeghatározóbb. A spektrum alakjából, a Cotton-effektusok előjeléből és intenzitásából a fémion körüli koordinációs környezetre következtethetünk.

A kis tagszámú, egyszerű peptidek különböző fémionokkal – elsősorban réz(II)- és nikkel(II)ionokkal – képzett komplexeinek CD-spektroszkópiai tulajdonságait számos kutatócsoport vizsgálta [196-198]. Megállapították, hogy az egyes donorcsoportok különböző mértékben továbbítják a királis információt a kromofór, jelen esetben a fémion felé. A kísérleti tapasztalatok alapján a peptid-fémkomplexekben az amidnitrogének koordinálódása eredményezi a legnagyobb effektust, míg a karboxilátoxigének és az aminonitrogének lényegesen kisebb hatásfokkal továbbítják a környezet kiralitását [47]. A koordinálódó donoratom minőségén kívül figyelembe kell vennünk a kiralitáscentrum és a kromofór csoport távolságát is: minél távolabb helyezkednek el egymástól, annál gyengébb az effektus.

A CD-spektroszkópiás vizsgálatokat a *Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén*, egy JASCO-810 típusú spektrofotométeren végeztem. A peptidek mintabeli koncentrációja, valamint a fémion:ligandum arány megegyezett a pH-potenciometriás mérések során alkalmazottal. A vizsgálatokat valamenynyi esetben szobahőmérsékleten végeztem. A CD-spektrumokat különböző pH-értékeken rögzítettem, a 220-800 nm hullámhossztartományban 0,100 és 1,000 cm úthosszúságú kvarcküvettákban. Az adatsorok kiértékelése a gyártó által rendelkezésünkre bocsátott szoftver segítségével történt, az értekezésben szereplő CD-spektrumokat MS Excel programmal ábrázoltam.

#### 4.6. Elektronspin rezonancia (ESR) spektroszkópia

Az elektronspin rezonancia (ESR) vagy elektron paramágneses rezonancia (EPR) spektroszkópia a párosítatlan elektront tartalmazó, paramágneses részecskék fontos vizsgálati módszere. Ebből következően a technika igen jól alkalmazható а peptidek tetragonálisan torzult, oktaéderes réz(II)komplexeinek tanulmányozására [199,200]. Az ESR-spektroszkópiában a mintát erős mágneses tér jelenlétében monokromatikus fénnyel sugározzuk be, a fény és az anyag kölcsönhatásából eredő abszorpció az elektronspinek következménye. rezonanciájának А módszer segítségével mérhető paraméterek fagyasztott és szilárd minták esetén anizotrópok, mely anizotrópia az egykristályok rögzített tengely körüli forgatásakor nyomon követhető.

Az ESR-spektrumok egyik legfontosabb jellemzője az ún. hiperfinom szerkezet. A magok mágneses momentumától származó mágneses tér hatással van a párosítatlan elektronok mágneses momentumára, ami a spektrumvonalak felhasadását eredményezi. Egy *I* spinszámú mag (2I + 1)féleképpen módosíthatja a párosítatlan elektronra ható mágneses teret, ami az elektron rezonanciajelének felhasadásához vezet és (2I + 1) számú, azonos intenzitású spektrumvonalból álló finomszerkezet jön létre. Réz(II)ionra alkalmazva a fenti összefüggést ( $I_{Cu(II)} = 3/2$ ), a fémkomplexek esetén négy vonalból álló hiperfinom szerkezet alakul ki. A spektrumok hiperfinom szerkezetéből a komplexek geometriájának változására következtethetünk [201].

A komplexek ESR-paraméterei (g<sub>||</sub> tenzor és A<sub>||</sub> hiperfinom csatolási állandó [cm<sup>-1</sup>]) a (12) és (13) összefüggések alapján számíthatók:

$$g_{||} = g_{||}^0 \frac{H_0}{H_{||}} \tag{12}$$

$$A_{||} = \frac{g_{||} \cdot \mu_B \cdot a_{||}}{h \cdot c}$$
(13)

, ahol  $g^0$  a külső standard értéke,  $H_0$  és  $H_{ll}$  a standardban és a mintában mért mágneses térerő értéke [Gauss],  $\mu_B$  a Bohr-magneton (értéke: 9,27400899·  $10^{-24}$  J·T<sup>-1</sup>),  $a_{ll}$  a parallel csatolási állandó [Gauss], h a Planck-állandó, c a fénysebesség. Ezeket az értékeket összehasonlítva ismert szerkezetű komplexek ESRparamétereivel, a koordinálódó donoratomok számára, minőségére és a geometria változására következtethetünk.

Az ESR-spektrumokat számítógép által vezérelt, Bruker Elexsys E500 CW-ESR típusú készülék segítségével rögzítették különböző pH-értékeken, 150 K hőmérsékleten. A mérésekhez használt fémtörzsoldat izotóptiszta <sup>63</sup>Cu(II)ionokat tartalmazott, a felbontás javítása érdekében mintákhoz kis mennyiségű – legfeljebb 10% – metanolt adtak. A spektrumok kiértékelésében a Monoclin számítógépes program jelentett segítséget.

#### 4.7. Tömegspektrometria (ESI-MS)

Előfordul, hogy az eddig ismertetett technikák – pH-potenciometria, UVlátható spektrofotometria, különböző spektroszkópiai módszerek – nem szolgálnak elegendő információval annak eldöntésére, hogy az extra deprotonálódási folyamatok a fémionhoz koordinálódott vízmolekula (hidrolízis) vagy a ligandum protonvesztéséhez (amidnitrogén(ek) deprotonálódása) rendelhetők-e. Továbbá, a többmagvú komplexek esetében az egyes fémionok körüli pontos kémiai környezet meghatározásához is kiegészítő mérésekre lehet szükség. Ezeknek a kérdéseknek a megválaszolásában nagy segítséget jelent, ha ismerjük az egyes részecskék pontos molekulatömegét, melynek meghatározására kiváló módszer a tömegspektrometria. A technikát széles körben alkalmazzák, többek között peptidek különböző fémionokkal alkotott komplexeinek azonosítására is [202]. A tandem tömegspektrometria (MS/MS) pedig a fémion(ok) koordinációs környezetéről szolgál értékes szerkezeti információval.

A tömegspektrometriás vizsgálatokat gázfázisban végezték, a vizes oldatokat elektroporlasztásos ionizáció (ESI) segítségével alakították gáz halmazállapotúvá. A lágy ionizációnak köszönhetően a képződő részecskék fragmentációja kismértékű, ami a komplexek molekulatömegének ismeretében lehetővé teszi a jelek direkt hozzárendelését. Az ionforrásból távozó töltött részecskék a szárítógáz hatására gáz halmazállapotúvá válnak, majd az analizátoron (jelen esetben: *time of flight* (TOF, repülési idő) vagy Orbitrap) áthaladva tömeg/töltés (m/z) értékük alapján elkülönülnek.

A tömegspektrometrumok egy részét a *Debreceni Egyetemen* rögzítették, a méréseket *Dr. Csire Gizella* és *Dr. Nagy Lajos* végezte. A spektrumokat ESI ionforrással ellátott maXis II MicroTOF-Q típusú Qq-TOF MS készüléken (*Bruker Daltonik*, Bréma, Németország) vették fel. A mintákat egy fecskendőpumpa segítségével (*Cole-Parmer Ins. Co.*, Vernon Hills, Illinois) juttatták az ionforrásba, a mintabevitel sebessége 3 µl/perc, a spray feszültsége 4 kV volt. Szárítógázként nitrogént alkalmaztak ( $T(N_2) = 200 \,^{\circ}C$ ;  $v(N_2) = 4 \,^{l/perc}$ ), ami az MS/MS méréseknél egyúttal ütközési gázként is szolgált; a nyomás az ütközési cellában 1,2  $\cdot 10^{-2}$  mbar volt. Külső kalibrálóként a nátrium-formiát oldatból ESI körülmények között keletkező klaszterionok ([(HCOONa)<sub>n</sub> + Na]<sup>+</sup>) szolgáltak.

Az Ac-TMHQDNIHHKP-NH<sub>2</sub> réz(II)- és cink(II)komplexeinek spektrumait Dr. Giuseppe Di Natale rögzítette a 400-1000 m/z tartományban, Q Exactive (Orbitrap) tömegspektrométeren (*ThermoFischer Scientific*), a CNR-IBB kutatóközpontban. A kötőhelyek azonosítása a *HCD* fragmentációs technikán<sup>10</sup> alapult. A spray feszültsége 3,5 kV; a kapilláris hőmérséklete 250 °C volt.

A vizsgált mintákban a ligandum koncentrációja megközelítőleg 0,001 M volt, az adott részecskék képződésének megfelelő pH-t ~ 0,20 M koncentrációjú kálium-hidroxid oldat segítségével állították be. Az ESI-MS spektrumokat a komplexek töltésétől függően pozitív vagy negatív módban rögzítették. A jelek hozzárendelése azok tömeg/töltés értéke, valamint a komplexek mért és szimulált izotópeloszlásának összehasonlítása alapján történt a DataAnalysis 4.4 (*Bruker*) számítógépes szoftver segítségével.

#### 4.8. Thioflavin T (ThT) assay

Az AK egyik jellegzetes tünete a rendellenes  $A\beta$ -ból álló aggregátumok jelenléte az agyban. A Thioflavin T assay lehetőséget teremt az aggregációs folyamat követésére, sőt a módszer segítségével egyes vegyületek aggregációt gátló hatását is tanulmányozhatjuk.

A Thioflavin T (ThT) egy kationos benzotiazol-származék (10. ábra), ami

az amiloidszálakhoz kötődve intenzív fluoreszcens sugárzást bocsájt ki [203]. Megfigyelték, hogy a festékmolekula  $A\beta$ -szálakhoz való kötődésével mind a ThT gerjesztéséhez szükséges hullámhossz (385 nm  $\rightarrow$  450 nm), mind pedig a fénykibocsájtás maximuma (445 nm



 $\rightarrow$  482 nm) eltolódik [204]. A technika előnye a nagy érzékenysége, hiszen a festékmolekulától származó fluoreszcencia elhanyagolható mértékű, így a detektált sugárzás gyakorlatilag kizárólag az amiloidszálakhoz kötött ThT-től származik. Továbbá, mivel a molekula jól oldódik vízben, a szálképződési folyamatok lejátszódását könnyen nyomon követhetjük oldatfázisban. Ugyanakkor a módszer hiányossága, hogy az amiloidszálak képződését megelőző oligomerek kialakulásáról – melyek mai ismereteink szerint toxikusabbak a nagyméretű aggregátumoknál – nem szolgál információval.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> A *HCD* rövidítés az angol "Higher Energy Collisional Dissociation" kifejezésből származik, melyet magyarul az ütközési cellában végrehajtott ütközéséses aktiválásra használunk. A többszörös ütközések miatt a peptidváz teljesebb fragmentációja játszódik le, így a technika jól alkalmazható a fémionok körüli koordinációs környezet felderítésére.

Az Ac-GNIHHKPGKLVFF-NH2 ligandum (tau(326-333) KL) réz(II)ionok jelenlétében lejátszódó oldategyensúlyi folyamatainak megismerése mellett, a peptid potenciális aggregációt gátló viselkedésének tanulmányozása is a céljaim között szerepelt. A különböző  $A\beta$ :tau arányú minták ( $A\beta$ :tau = 1:1, 2:1 és 4:1) vizsgálata lehetővé tette a tau(326-333) KL ligandum  $A\beta(1-42)$ szálképződési folyamataira gyakorolt hatásának tanulmányozását. A minták ~ 7.4-es pH-ját nátrium-dihidrogén-foszfát/dinátrium-hidrogén-foszfát puffer segítségével állítottam be. А kinetikai görbéket egy Varioskan (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts) plate reader készülék rögzítette, 37 °C hőmérsékleten. A készülék a mintatartót (Corning 96) valamennyi spektrum felvétele előtt 10 másodpercig rázta, ily módon csökkentve a mikrobuborékok képződésének veszélyét. A gerjesztésre használt fény hullámhossza 440 nm, míg az emittált fény hullámhossza 485 nm volt. A készülék az adatgyűjtést 24 órán keresztül végezte, az értekezletben szereplő görbéket három mérés átlagaként kaptuk. A ThT assay vizsgálatok eredményeként kapott kinetikai görbéket Michele F.M. Sciacca és munkatársai értékelték ki.

# 5. Kísérleti eredmények és értékelésük

#### 5.1. A tau(326-333) fragmens és mutánsai komplexképződési folyamatai

A tau fehérje R3 mikrotubuluskötő régiójának két hisztidil-oldallánca (His329, His330) kötőhelyül szolgálhat a réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionok számára. A szomszédos hisztidinek jelenléte a komplexképződési folyamatok nagy változatosságát eredményezi, hiszen a peptidnitrogének deprotonálódásához mindkét aminosav horgonycsoportként szolgálhat és a koordináció a molekula N- és C-terminális vége felé is lejátszódhat (*11. ábra*). Ebből következően nagyszámú részecske képződhet és izomerszerkezetek kialakulásával kell számolnunk.



Munkám során célom volt az elsődleges horgonycsoport meghatározása és a kialakuló koordinációs izomerszerkezetek arányának megbecsülése. Ennek érdekében a natív Ac-GNIHHKPG-NH<sub>2</sub> ligandum (tau(326-333)) mellett a peptid izoleucin helvett CD-inaktív glicint tartalmazó Ac-GNGHHKPG-NH2 szekvenciájú származéka (tau(326-333)mG) komplexképződési folyamatait is tanulmányoztam. Habár az aminosavcsere lehetővé teszi, hogy megkülönböztessük a különböző imidazolilcsoportokról kiinduló amidkoordinációt, a két kötésmód leírásához szükség volt az Ac-GNGAHKPG-NH<sup>2</sup> és Ac-(tau(326-333)mGA tau(326-**GNGHAKPG-NH**<sub>2</sub> pontmutációkra és 333)mGH) is. A natív oktapeptid szekvenciája egy – a "lánctörő" szerepéről ismert [51] – prolin aminosavat (Pro332) is tartalmaz, melynek a komplexképződési folyamatokra gyakorolt hatását az Ac-GNIHHKAG-NH<sub>2</sub> pontmutáns (tau(326-333)mA) segített feltárni.

A két imidazolil-oldalláncot tartalmazó tau(326-333) származékok protonálódási és deprotonálódási állandóit a 3., míg az egy hisztidint tartalmazó fragmensek megfelelő értékeit az 4. táblázatban foglaltam össze. A két hisztidil-oldalláncot tartalmazó ligandumok imidazóliumcsoportjainak deprotonálódása egymással átfedő lépésekben játszódik le; a legnagyobb pK érték valamennyi vizsgált peptid esetén a lizin ammóniumcsoportjához rendelhető. A tau fragmensekre számított értékek mellett a szintén szomszédos hisztidineket tartalmazó  $A\beta(8-16)mHH$  nonapeptid (Ac-SGAEGHHQK-NH<sub>2</sub>) és egy hisztidint tartalmazó származékainak állandóit [99] is feltüntettem a táblázatokban. A részecskék töltését a vizsgált és az összehasonlításra használt peptidek eltérő bázicitása miatt a könnyebb áttekinthetőség érdekében általában nem jelöltem.

3. táblázat: A két hisztidil-oldalláncot tartalmazó natív tau(326-333) fragmens és mutánsai protonálódási (log  $\beta$ ) és deprotonálódási (pK) állandói (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

	tau(326-333)	tau(326-333)mG	tau(326-333)mA	Aβ(8-16)mHH
Részecske	Ac-GNIHHKPG-	Ac-GNGHHKPG-	Ac-GNIHHKAG-	Ac-SGAEGHHQK-
	$NH_2$	$NH_2$	$\rm NH_2$	NH <sub>2</sub> [99]
[HL]	10,17(1)	10,26(1)	10,24(1)	10,23
$[H_2L]$	16,88(2)	16,95(1)	16,88(1)	16,96
$[H_3L]$	22,69(2)	22,81(1)	22,95(1)	22,94
$[H_4L]$	_	_	_	27,02
pK (Glu–COOI	- (F	_	_	4,08
$pK(N_{Im(1)}-NH^+)$	) 5,81	5,86	6,07	5,98
$pK(N_{Im(2)}-NH^+)$	) 6,71	6,69	6,64	6,73
pK (Lys-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	10,17	10,26	10,24	10,23

4. táblázat: Az egy hisztidil-oldalláncot tartalmazó mutáns tau(326-333) fragmensek protonálódási (log  $\beta$ ) és deprotonálódási (pK) állandói (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

	tau(326-333)mGA	tau(326-333)mGH	Aβ(8-16)mAH	Aβ(8-16)mHA
Részecske	Ac-GNGAHKPG-	Ac-GNGHAKPG-	Ac-SGAEGAHQK-	Ac-SGAEGHAQK-
	$NH_2$	$NH_2$	NH <sub>2</sub> [99]	NH <sub>2</sub> [99]
[HL]	10,23(1)	10,19(2)	10,26	10,27
$[H_2L]$	16,56(2)	16,56(3)	16,69	16,73
[H <sub>3</sub> L]	—	—	20,84	20,82
pK (Glu-COOH)	_	_	4,15	4,09
$pK(N_{Im}-NH^+)$	6,33	6,37	6,43	6,46
pK (Lys-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	10,23	10,19	10,26	10,27

Az aminosav-cserék nem befolyásolják jelentősen a ligandumok sav-bázis tulajdonságait, amit jól tükröz, hogy a tau fragmensek állandói jó egyezésben vannak mind egymással, mind pedig más, hisztidint és lizint tartalmazó, hasonló szekvenciájú peptidek megfelelő értékeivel.

#### 5.1.1. A natív tau(326-333) fragmens és mutánsai réz(II)komplexei

Az egy-hisztidines tau származékokkal hasonló komplexképződési folyamatok játszódnak le, mint más, egy imidazolilcsoportot tartalmazó, terminálisan védett peptidekkel [205]. Horgonycsoportként egy-egy hisztidint tartalmaznak, melyen keresztül egy ekvivalens réz(II)ion megkötésére

képesek. A pH-potenciometriás adatok alapján valamennyi vizsgált fémion:ligandum arány esetén csak egymagvú részecskék képződését tudtuk kimutatni, biszkomplexek még háromszoros ligandumfelesleg alkalmazása mellett sem keletkeznek jelentős mennyiségben. A képződő réz(II)komplexek stabilitási állandóit az 5. *táblázat* tartalmazza.

5. táblázat: Az egy hisztidil-oldalláncot tartalmazó mutáns tau(326-333) fragmensek réz(II)komplexeinek stabilitási állandói (log  $\beta$ ) (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

Részecske	tau(326-333)mGA	tau(326-333)mGH	Aβ(8-16)mAH	Aβ(8-16)mHA
	uu(020 000)morr	uu(020 000)men	[99]	[99]
[CuHL]	13,96(2)	13,95(2)	14,49	14,47
[CuL]	—	—	7,91	7,96
$[CuH_{-1}L]$	1,87(1)	2,47(3)	2,11	2,23
[CuH <sub>-2</sub> L]	-5,37(2)	-4,83(5)	-5,38	-6,53
[CuH <sub>-3</sub> L]	-15,45(2)	-14,27(8)	-15,61	-16,74
$pK(amid_1)$	—	—	6,58	6,51
$pK(amid_2)$	—	—	5,70	5,73
$pK_{\text{átl}} (\text{amid}_{1,2})$	6,05	5,74	—	_
$pK(amid_3)$	7,24	7,30	7,59	8,78
pK (Lys-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	10,08	9,44	10,23	10,21

Az enyhén savas pH-tartományban keletkező [CuHL]<sup>3+</sup> összetételű részecskében a fémion a hisztidin imidazolnitrogénjén keresztül kötődik: a Cu(II) monodentát kötődésére számított egyensúlyi állandó értéke  $(\log K(Cu+N_{Im}) = 3.76 \text{ és } 3.73)$  jó egyezést mutat más, egy hisztidint tartalmazó peptidek esetén leírtakkal. A pH növelésével két amidnitrogén kooperatív folyamatban deprotonálódik. A harmadik peptidnitrogén deprotonálódása és koordinációja elkülönült lépésben megy végbe, melynek eredményeként kialakul a 4N-es, [CuH-2L] sztöchiometriájú komplex. A ammóniumcsoportja feltehetően lizil-oldallánc nem vesz részt а komplexképződési folyamatokban. Ebből következően a részecske pontos összetétele [CuH<sub>-3</sub>L]H<sup>+</sup> és a fémion kötésmódja megegyezik a [CuH<sub>-3</sub>L]<sup>-</sup> komplexével. Az 5. táblázatban feltüntetett deprotonálódási állandókat összehasonlítva látható, hogy a tau(326-333)mGH peptid Lys–NH<sub>3</sub><sup>+</sup> pK értéke mintegy 0,6 logaritmus egységgel kisebb, mint a tau(326-333)mGA származéké és az egy hisztidint tartalmazó  $A\beta(8-16)$  fragmenseké. Elképzelhető, hogy kialakul valamilyen másodlagos (pl. elektrosztatikus) kölcsönhatás a horgonydonor hisztidin és a tőle egy aminosav-távolságra lévő protonált ammónium-oldallánc között, ami elősegíti a lizin protonvesztését, kisebb deprotonálódási állandót eredményezve. A pHpotenciometriás adatokból levont következtetéseket az UV-Vis spektrofotometriás és CD-spektroszkópiás vizsgálatok is alátámasztják (ld. Függelék, A3/1,2. ábra).

A két hisztidint tartalmazó származékok lényegesen változatosabb képet mutatnak a komplexképződés tekintetében: az egymagvú részecskék mellett biszkomplex és dinukleáris részecskék is kialakulnak (*6. táblázat*).

6. táblázat: A két hisztidil-oldalláncot tartalmazó natív tau(326-333) fragmens és mutánsai réz(II)komplexeinek stabilitási állandói (log  $\beta$ ) (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

Részecske	tau(326-333)	tau(326-333)mA	tau(326-333)mG	Aβ(8-16)mHH [99]
[CuH <sub>2</sub> L <sub>2</sub> ]	29,58(31)	30,17(15)	30,51(21)	30,92
[CuH <sub>2</sub> L]	20,22(11)	20,21(13)	20,23(22)	21,07
[CuHL]	15,81(2)	15,90(2)	16,10(3)	16,25
[CuL]	9,49(7)	9,39(11)	9,85(11)	10,29
$[CuH_{-1}L]$	2,66(5)	2,89(4)	3,09(7)	3,43
[CuH <sub>-2</sub> L]	-5,50(7)	-5,12(6)	-4,75(8)	-4,66
[CuH <sub>-3</sub> L]	-15,12(8)	-14,75(7)	-14,20(9)	-14,61
$[Cu_2H_{-1}L]$	6,28(13)	6,58(8)	6,84(14)	7,31
$[Cu_2H_{-2}L]$	-0,10(7)	-0,76(23)	0,24(15)	0,79
$[Cu_2H_{-3}L]$	-7,36(11)	-7,63(9)	-6,82(12)	-6,55
$[Cu_2H_4L]$	_	—	-	-14,31
$[Cu_2H_{-5}L]$	_	-28,32(11)	-	—
$[Cu_2H_{-6}L]$	—	-38,95(10)	—	-34,82
$pK(amid_1)$	6,32	6,51	6,25	5,96
$pK(amid_2)$	6,83	6,50	6,76	6,86
$pK(amid_3)$	8,16	8,01	7,84	8,09
pK (Lys-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	9,62	9,63	9,45	9,95

Az 1:1 fémion:ligandum arányú minták és a ligandumfelesleget tartalmazó oldatok részecskeeloszlási diagramjai nagyfokú hasonlóságot mutatnak mindhárom vizsgált tau fragmens esetén. Továbbá érdemes megjegyezni,



hogy a kapott eredmények összhangban vannak а Bacchela és munkatársai által levont következtetésekkel, akik az R3 régió fémionmegkötését egy hosszabb oligopeptiden, a tau(323-335) ligandumon keresztül, ekvimoláris mennyiségű réz(II)ion jelenlétében vizsgálták [172]. A hasonlóságok miatt a komplexképződés jellemző vonásait a natív tau(326-333) származékon

keresztül mutatom be (*12. ábra*). A savas pH-n kialakuló protonált részecskék a fémion egy, illetve két imidazolnitrogénen keresztüli koordinációjával képződnek. Ebben a pH-tartományban nincs mérhető CDaktivitás, ami alátámasztja, hogy a réz(II)ion megkötésében csak a hisztidinek oldalláncbeli donorcsoportjai vesznek részt. Ezeket a következtetéseket ESRmérések is megerősítik (*7. táblázat*): a [CuH<sub>2</sub>L]<sup>4+</sup> komplexre számított hiperfinom csatolási állandó (A<sub>II</sub> =  $135 \times 10^{-4}$  cm<sup>-1</sup>) és g tenzor (g<sub>II</sub> = 2,365) értékéhez hasonló Hamilton-paramétereket állapítottak meg egyéb, egy hisztidint tartalmazó peptidek savas pH-n kialakuló fémkomplexeire is [92]. Az [N(Im), N(Im)] kötésmódú, [CuHL]<sup>3+</sup> összetételű részecskére számított hiperfinom csatolási állandó vártnál alacsonyabb értékét (A<sub>II</sub> =  $145 \times 10^{-4}$  cm<sup>-1</sup>) a réz(II)ion körüli koordinációs környezet kismértékű torzulása okozhatja [76].

7. táblázat: A Cu(II)–tau(326-333) = 1:1 rendszerben képződő egymagvú réz(II)komplexek spektrális adatai

Részecske	$\lambda_{max}/\epsilon (nm/M^{-1} \cdot cm^{-1})$	$\lambda/\Delta\epsilon (nm/M^{-1} \cdot cm^{-1})$	$g_{\parallel}/A_{\parallel} (10^{-4} \text{ cm}^{-1})$
$[CuH_2L]^{4+}$	—	—	~2,365/135
[CuHL] <sup>3+</sup>	~659/50	_	~2,310/145
[CuL] <sup>2+</sup>	_	_	_
$[CuH_{-1}L]^+$	~571/112	~748/+0,11	~2,224/176
		~596/-0,32	
		~359/-0,83	
		~248/+8,11	
[CuH <sub>-2</sub> L]	~547/128	~658,5/+0,60	_
		~498,5/-1,06	
		~363,5/-0,34	
		~322,5/+0,87	
		~2,55/+8,39	
[CuH_3L] <sup>-</sup>	~530/157	~654/+1,01	~2,195/193
		~502,5/-1,80	
		~325,5/+1,28	
		~259/+8,39	

A táblázatokban feltüntetett spektrális paraméterek becsült értékek, pontosabb adatokat a spektrumok felbontása adna.

Háromszoros ligandumfelesleg alkalmazása mellett az enyhén savas és semleges pH-tartományban (pH ~ 6-7) a  $[CuH_2L_2]^{4+}$ összetételű biszkomplex az uralkodó részecske, melyben a fémion két ligandum szomszédos imidazolilcsoportjain keresztül koordinálódik (2×[N(Im), N(Im)] kötésmód). A pH további növelésével amidkoordinált egymagvú részecskék alakulnak ki és a továbbiakban a ligandumfelesleget tartalmazó rendszer speciációja nagyon hasonló az ekvimoláris minta koncentrációeloszlási görbéjéhez. A [CuH<sub>x</sub>L]<sup>2+x</sup> (ahol x = 0, -1 vagy –2) sztöchiometrájú komplexekben a fémion megkötésében résztvevő deprotonálódott peptidnitrogének növekvő számát egyrészt az abszorpciós maximum hullámhosszának hipszokróm eltolódása, másrészt a CD-spektrumok változása – a 250 nm-es hullámhossznál megjelenő, N<sup>-</sup>  $\rightarrow$  Cu(II) töltésátvitelre jellemző sáv jelenléte [198,206] – is igazolja (7. *táblázat*). Az utolsó deprotonálódási lépés a lizin oldalláncbeli donorcsoportjához rendelhető. pH 9-9,5 fölött sem az abszorpciós, sem pedig a CD-spektrumok nem mutatnak jelentős változást, ami alátámasztja, hogy az ammóniumcsoport nem vesz részt a réz(II)ion koordinálásában.

A két hisztidin horgonycsoportról akár az N-, akár a C-terminális vég felé elindulhat az amidnitrogének koordinációja. Utóbbi esetben kisebb stabilitású részecskék alakulnak ki, így a peptidnitrogének koordinációja várhatóan az aminoterminus felé valósul meg. A viszonylag széles abszorpciós spektrumok, valamint az ESR-adatok is koordinációs izomerek képződésére utalnak. Az izomerszerketek arányát a két- (tau(326-333)mG), illetve egyhisztidines glicint tartalmazó mutánsok (tau(326-333)mGA és tau(326-333)mGH) réz(II)komplexeinek CD-spektrumai segítségével becsülhetjük meg. Az egy imidazolilcsoportot tartalmazó ligandumokban az akirális glicin aminosav különböző távolságra található a hisztidin horgonycsoporttól, így a peptidnitrogének deprotonálódásával képződő komplexekre a -GAH- és -GHA- szekvenciát tartalmazó ligandumok esetén

eltérő CD-spektrumokat kaptunk. Ismert, hogy ha a glicin egy aminosav távolságra helyezkedik el a hisztidintől (–GXH–), а Cotton-effektus előjele ellentétére változik а -ZXH- szekvenciát tartalmazó peptidek CD-görbéihez képest. Ezzel szemben, ha a glicin és a hisztidin szomszédos helyzetben találhatóak (-GHX-), a Cotton-effektus előjele változatlan marad [207]. Ezen komplexek szerkezetét a két, egy hisztidint



tartalmazó modellpeptid segítségével írhatjuk le, melyek CD-spektruma alapján meghatározhatjuk a Cu(II)–tau(326-333)mG = 1:1 rendszerben képződő koordinációs izomerek arányát. A spektrumok összehasonlítása alapján valószínűsíthetjük, hogy a 329-es és 330-as hisztidinről induló amidkoordináció közel azonos mértékben (48:52) következik be (13. ábra).

A komplexképződési folyamatok hasonlósága arra enged következtetni, hogy az izomerszerkezetek a Cu(II)–*tau*(326-333) és Cu(II)–*tau*(326-333)*m*A ekvimoláris rendszerekben is összemérhető mennyiségben vannak jelen.

Fémionfelesleg alkalmazása mellett a két hisztidil-oldallánc elkülönült kötőhellyé válik és semleges, illetve bázikus oldatban kétmagyú komplexek alakulnak ki. Valamennyi dinukleáris részecskében egy-egy hisztidin imidazolnitrogén és 1-3 peptidnitrogén koordinálja a réz(II)ionokat. A prolin jelenléte ugyan nem akadályozza meg a kétmagyú részecskék keletkezését, de a képződő komplexek sztöchiometriájára hatással van. Ezen származékok esetén az abszorpciós maximum hullámhossza csak ~ 575 nm-ig tolódik el, ami megfelel a réz(II)ionok körüli [N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] + [N(Im), N<sup>-</sup>] koordinációs környezetnek. A tau(326-333)mA mutáns szekvenciája azonban nem tartalmaz olyan aminosavat, ami gátolná az amidnitrogének protonvesztését, és a ligandum komplexeinek speciációja eltér a másik két peptidétől. Ennek megfelelően az alanint tartalmazó peptid spektrumában az abszorpciós maximum további "kékeltolódása" figyelhető meg, megközelítőleg 526 nmes hullámhosszig. Ebből arra következtethetünk, hogy a fémionok koordinációs szférájában négy-négy nitrogénatom található. Az erősen bázikus oldatban keletkező, [Cu<sub>2</sub>H<sub>-6</sub>L]<sup>2-</sup> sztöchiometriájú részecske kialakulását CD-spektroszkópiás vizsgálatok is igazolják. A kétmagvú komplexben (14/1. ábra) mindkét réz(II)ion egy hisztidin imidazolilcsoporton és három deprotonálódott peptidnitrogénen keresztül koordinálódik.



A 330-as pozíciójú hisztidinről az amidnitrogének deprotonálódása a Cterminális vég felé indul. A kialakuló (7,5,5)-tagú csatolt kelátgyűrűs szerkezet CD-görbéjének modellezésére az Ac-PHAAA-NH<sub>2</sub> pentapeptid [CuH<sub>-3</sub>L]<sup>-</sup> komplexét [208] használhatjuk. A másik réz(II)ion körüli [N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] koordinációs környezetet a humán prion protein

Ac-SKPKTNAKHA-NH<sub>2</sub> szekvenciájú fragmensének megfelelő komplexével [81] modellezhetjük. A 14/2. ábráról látható, hogy a két modellspektrum 1:1 arányú összegzésével a [Cu<sub>2</sub>H<sub>-6</sub>L]<sup>2-</sup> komplex spektruma jó közelítéssel leírható.

A 15. ábra segítségével az R3 mikrotubuluskötő régió (His329-His330) és az N-terminális szakasz (His14, hisztidil-oldalláncainak His<sub>32</sub>) réz(II)ionkötő affinitását hasonlíthatjuk össze. Az ábrán egy olyan modellrendszer koncentrációeloszlási görbéjét tüntettem fel, amely ekvimoláris mennyiségben tartalmazza a réz(II)ionokat, valamint a szóban forgó kötőhelyeket peptidfragmenseket. modellező Láthatjuk, hogy a fiziológiás pHtartományban a tau(26-33) ligandum egyetlen hisztidil-oldallánca jobb kötőhelyet jelent a réz(II)-



ionok számára a *tau*(326-333) peptid két imidazolilcsoportjánál.

#### 5.1.2. A natív tau(326-333) fragmens és mutánsai nikkel(II)komplexei

A két hisztidint tartalmazó peptidek nikkel(II)komplexeinek stabilitási állandóit a 8. táblázat tartalmazza.

8. táblázat: A két hisztidil-oldalláncot tartalmazó natív tau(326-333) fragmens és mutánsai nikkel(II)komplexeinek stabilitási állandói (log  $\beta$ ) (T = 298 K, I = 0.20 M KCl)

Részecske	tau(326-333)	tau(326-333)mG	tau(326-333)mA	Aβ(8-16)mHH [99]
[NiH <sub>2</sub> L <sub>2</sub> ]	_	—	-	26,71
[NiHL]	13,39(3)	13,80(2)	13,61(4)	14,17
[NiH <sub>-1</sub> L]	-3,34(2)	-2,35(2)	-3,09(4)	-2,02
[NiH <sub>-2</sub> L]	-12,34(2)	-10,62(2)	-11,79(3)	-10,49
[NiH_3L]	-22,71(5)	-20,68(2)	-21,53(4)	-20,37
$pK_{\text{átl}} \text{ (amid}_{1,2})$	8,37	8,08	8,35	8,10
p <i>K</i> (amid <sub>3</sub> )	9,00	8,27	8,70	8,47
pK (Lys-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	10,37	10,06	9,74	9,88
$\log K(Ni+2N_{Im})$	3,22	3,54	3,37	3,94

A táblázat adataiból kitűnik, hogy hasonló komplexképződési folyamatok játszódnak le a két hisztidint tartalmazó tau(326-333) pontmutánsok és az  $A\beta(8-16)mHH$  peptid esetén, habár az utóbbi ligandum nikkel(II)komplexe-

karboxilátcsoportok stabilitásnövelő hatásával magyarázhatunk. Nikkel(II)ionok jelenlétében valamennyi vizsgált rendszerben csak egymagyú komplexek keletkeznek. Α szekvenciák mindkét hisztidiloldallánca horgonyként szolgálhat a nikkel(II) számára, így fémionfelesleg alkalmazása mellett elvileg képződhetnének kétmagvú részecskék. Ugyanakkor, a nikkel(II)ionok által indukált amidnitrogén-deproto-



nálódás és -koordináció általában pH > 8 fölött indul meg, és az első fémion kötődésének hatására a második ekvivalens nikkel(II) koordinációja feltehetően olyan bázikus közegbe tolódik el, ahol már bekövetkezik a



17. ábra: A Ni(II)–*tau*(326-333) = 1:1 arányú rendszer abszorpciós (1) és CD-spektrumainak (2) változása a pH függvényében

fémion hidrolízise. Fiziológiás körülmények között az egyszeresen protonált, [NiHL]<sup>3+</sup> összetételű komplex az uralkodó részecske (16. ábra). melyben a fémion a két szomszédos hisztidin imidazolnitrogénen keresztül koordinálódik makrokelát szerkezetet kialakítva. Az UVlátható spektrofotometriás ábra) és CD-spekt-(17/1)roszkópiás vizsgálatok (17/2. ábra) a komplex oktaéderes geometriáját (Függelék, A4. ábra) igazolják: megközelítőleg 8-as pH-ig egyrészt nagyon kis intenzitású abszorpciós spektrumokat láthatunk, másrészt nem mérhető jelentős CD-aktivitás sem. A pH növelésével a spektrumok alakja jól láthatóan megváltozik. Az abszorpciós spekt-

inek termodinamikai stabilitása kicsit nagyobb, amit a negatív töltésű

rumban a ~ 440-500 nm-es hullámhossztartományban megjelenő nagy intenzitású, széles sáv arra utal, hogy az imidazolnitrogénnel kelátképző helyzetben lévő peptidkötés amidnitrogénjeinek deprotonálódása és koordinálódása síknégyzetes szerkezetű (*Függelék, A5. ábra*), diamágneses nikkel(II)komplexek kialakulását eredményezi. A CD-spektrumokban is megfigyelhető megközelítőleg 275 nm-nél a peptidnitrogének deprotonálódására jellemző N<sup>-</sup>  $\rightarrow$  Ni(II) töltésátviteli sáv megjelenése, melynek intenzitása a pH emelésével nő. Az első két amidnitrogén protonvesztése egy lépésben, kooperatív módon megy végbe, míg a harmadik peptidnitrogén deprotonálódása elkülönült folyamatban játszódik le. A [NiH<sub>-2</sub>L]  $\rightarrow$ [NiH<sub>-3</sub>L]<sup>-</sup> átalakulást eredményező, utolsó deprotonálódási lépés a liziloldallánc ammóniumcsoportjához köthető, mely nem vesz részt a fémion koordinálásában.

A koordinációs izomerek arányának megbecsülésében ismételten a tau(326-333)mG ligandum egy hisztidil-oldalláncot tartalmazó mutánsai jelentettek segítséget. A képződő komplexek stabilitási állandóit, valamint az  $A\beta(8-16)mHH$  peptid hasonló, egy-hisztidines származékainak [99] megfelelő értékeit a 9. táblázatban tüntettem fel.

Nagyon hasonló komplexképződési folyamatok játszódnak le valamennyi egy hisztidint tartalmazó tau fragmens és  $A\beta(8-16)$  mutáns esetén. Minden vizsgált ligandummal egymagvú nikkel(II)komplexek alakulnak ki, melyekben a fémion elsődleges horgonycsoportja a hisztidin imidazolnitrogénatomja.

Részecske	tau(326-333)mGA	tau(326-333)mGH	Aβ(8-16)mAH [99]	Aβ(8-16)mHA [99]
[NiHL]	12,73(4)	12,81(4)	13,22	12,95
[NiL]	4,87(3)	4,78(3)	5,20	4,63
[NiH <sub>-2</sub> L]	-10,74(1)	-11,54(1)	-10,57	-12,11
[NiH <sub>-3</sub> L]	-20,93(2)	-21,90(2)	-20,47	-22,16
$pK(amid_1)$	7,86	8,03	8,02	8,32
$pK_{\text{átl}} \text{ (amid}_{2,3})$	7,81	8,16	7,89	8,37
pK (Lys-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	10,19	10,36	9,90	10,05
$\log K(Ni+N_{Im})$	2,50	2,62	2,96	2,68

9. táblázat: Az egy hisztidil-oldalláncot tartalmazó mutáns tau(326-333) fragmensek nikkel(II)komplexeinek stabilitási állandói (log  $\beta$ ) (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

A síknégyzetes geometriájú fémkomplexekben az imidazolil horgonycsoporton kívül egy, illetve három deprotonálódott peptidnitrogén vesz részt a fémion megkötésében. Ahogy a 18/1. *ábra* mutatja az [N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] koordinált részecskék CD-görbéinek lefutása jó egyezést mutat a 330-as pozíciójú hisztidinről induló kötésmódra jellemző komplex spektrumával (*tau*(326-333)*mGA*), vagyis a nikkel(II)ion számára ez a horgonycsoport jelenti az elsődleges kötőhelyet (*18/2. ábra*). Ugyanakkor ez nem jelenti azt, hogy nem alakulnak ki olyan koordinációs izomerek, melyekben a fémion koordinálásában a His329 imidazolilcsoportja és a megelőző, deprotonálódott peptidnitrogének vesznek részt, bár ezen fémkomplexek mennyisége nem számottevő. A hasonló oldategyensúlyi viselkedés alapján feltételezhetjük, hogy a natív szekvencia és az alanint tartalmazó mutáns esetében is a His330 a preferált kötőhely a fémion számára nagy pH-n. Ez jelentős különbséget jelent a réz(II)ionokat tartalmazó rendszerhez képest, ahol ilyen jellegű preferenciáról nem beszélhetünk, és a koordinációs izomerek összemérhető arányban vannak jelen.



spektruma, a két modellspektrum (a) és (b) 95:5 arányú összegzése (c) és a Ni(II)–tau(326-333)mG = 1:1 rendszer mért CD-spektruma (d) pH ~ 11-en (1); valamint a keletkező, 4N-es fő koordinációs izomer feltételezett szerkezete (2)

Multihisztidintartalmú peptidek réz(II)komplexeinek vizsgálata során megfigyelték, hogy a horgonydonor imidazolilcsoport ekvatoriális kötődését egy másik hisztidin axiális koordinációja egészítheti ki. Ez összhangban van a Bacchella és munkatársai által tapasztaltakkal, akik igazolták, hogy az általunk is tanulmányozott –His-His– kötőhelyet tartalmazó réz(II)–*tau*(323-335) rendszerben a szomszédos hisztidinek egyike az ekvatoriális síkban kötődik a fémionhoz, míg a másik imidazolgyűrű axiálisan koordinálódik [172]. Ugyanakkor – szemben a réz(II)komplexekkel – a nikkel(II)iont tartalmazó síknégyzetes részecskékre nem jellemző az imidazolilcsoport kiegészítő axiális koordinációja, ami hozzájárulhat a különböző fémionokat tartalmazó rendszerek nagy pH-n megfigyelt eltérő kötőhely-preferenci-ájához.



A 19. ábra a különböző kémiai környezetű hisztidil-oldalláncok nikkel(II)-

ionkötő képességének összehasonlítására készített hipotetikus eloszlási görbét mutatja be. A diagram jól szemlélteti, hogy a savas és fiziológiás pH-tartományban, ahol az imidazolkoordinációjú, oktaéderes geometriájú komplexek léteznek, a His14 jelenti az elsődleges kötőhelyet a nikkel(II) számára, amit a két glutaminsav és az aszparaginsav karboxilátcsoportjának а fémion megkötésében való részvételével és stabilitásnövelő hatá-

sával magyarázhatunk. Bázikus közegben, a síknégyzetes komplexek megjelenésével, a preferencia – a réz(II)ionokat tartalmazó rendszerhez hasonlóan – egyértelműen a His32-re tolódik át.

#### 5.1.3. A natív tau(326-333) fragmens és mutánsai cink(II)komplexei

egy hisztidint tartalmazó, védett aminoterminussal rendelkező Az peptidekre általánosan jellemző, hogy nem képesek nagy stabilitású cink(II)komplexek kialakítására és semleges-enyhén bázikus közegben általában cink(II)-hidroxid válik le. Ennek megfelelően a cink(II)-tau(326-333)mGA és a cink(II)-tau(326-333)mGH rendszerekben a komplexképződés meglehetősen egyszerű képet mutat. Mindkét peptid esetén csupán egyetlen fajta részecskét tudtunk azonosítani: a kis stabilitású, imidazol-koordinációjú, [ZnHL]<sup>+</sup> összetételű komplexet, mely az enyhén savas-semleges közegben alakul ki. A pH további növelésével bekövetkezik a fémion hidrolízise és hidroxid-csapadék válik le. Hasonló folyamatokat figyeltek meg valamennyi, korábban vizsgált, egy hisztidil-oldalláncot tartalmazó, védett tau fragmens titrálása során is. A keletkező [ZnHL]+ komplex stabilitási állandóját a 10. táblázatban tüntettem fel, mely összehasonlításként egyéb, egy hisztidint peptidek cink(II)komplexeinek megfelelő tartalmazó tau értékeit is tartalmazza. Ha összevetjük az imidazolilcsoportok részvételével kialakuló komplexek stabilitásának összehasonlítására szolgáló,  $Zn(II)+N_{Im}$ koordináció erősségét leíró log K értékeket, egyértelmű, hogy a ligandumok közül a 14-es pozíciójú hisztidin kémiai környezetét modellező, tau(9-16) köti legnagyobb affinitással a fémiont. A peptid ~ 1,3-2 logaritmus egységgel nagyobb cink(II)ionkötő-képességét a glutamát és aszpartát karboxilátcsoportok stabilitásnövelő hatásának tulajdoníthatjuk.

Részecske	tau(326-333)mGA	tau(326-333)mGH	<b>tau(9-16)</b> Ac-EVMEDHAG- NH <sub>2</sub> [209]	<b>tau(26-33)m</b> Ac-KGGYTMHK- NH <sub>2</sub> [209]
[ZnH <sub>3</sub> L]	_	_	_	33,11
[ZnHL]	12,57(10)	12,32(26)	_	_
[ZnL]	_	_	4,22	_
$[ZnH_{-1}L]$	_	_	-3,49	_
$\log K(Zn+N_{Im})$	2,34	2,09	4,22	2,89

10. táblázat: Az egy hisztidil-oldalláncot tartalmazó tau fragmensek cink(II)komplexeinek stabilitási állandói (log  $\beta$ ) (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

A két szomszédos hisztidint tartalmazó natív tau(326-333) ligandum és mutánsai stabilitási állandóit, valamint az imidazol-koordinációjú cink(II)komplexek log *K* értékét a *11. táblázat* tartalmazza. A hasonló koordinációs módú részecskék log *K*(Zn+2N<sub>Im</sub>) értéke általában 2,5-4,0 logaritmus egység, de a nagyobb állandók tipikusan a polárisabb karakterű ligandumok fémkomplexeire jellemzők [190].

11. táblázat: A két hisztidil-oldalláncot tartalmazó natív tau(326-333) fragmens és mutánsai cink(II)komplexeinek stabilitási állandói (log  $\beta$ ) (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

Részecske	tau(326-333)	tau(326-333)mG	tau(326-333)mA
[ZnHL] <sup>3+</sup>	12,74(5)	13,10(5)	12,72(12)
$[ZnL]^{2+}$	5,48(3)	5,78(4)	5,26(9)
$[ZnH_{-1}L]^+$	-2,46(2)	-2,10(3)	-2,32(4)
$[ZnH_{-2}L]$	-11,84(2)	-10,95(3)	-11,24(5)
$pK(amid_1)$	7,26	7,32	7,46
$pK(amid_2)$	7,94	7,88	7,58
$pK(amid_3)$	9,38	8,85	8,92
$\log K(Zn+2N_{Im})$	2,58	2,85	2,48

A 20. ábra a cink(II)–tau(326-333) rendszerben, ekvimoláris fémion:ligandum arány alkalmazása mellett ábrázolt részecskeeloszlási diagramot mutatja be. Ellentétben az egy hisztidint tartalmazó ligandumokkal, ezekben a rendszerekben nem tapasztaltuk cink(II)-hidroxid leválását, amiből arra következtethetünk, hogy a szomszédos imidazolil-csoportokat tartalmazó peptidek bázikus közegben is



képesek oldatban tartani а fémiont. Ugyanakkor, a kötésmód megállapításánál figyelembe kell vennünk, hogy a deprotonálódási folyamatok nem csak a peptidnitrogének koordinációjára, hanem hidrolitikus folyamatok lejátszódására is utalhatnak. Ebből fakadóan, a deprotonált [ZnH-1L]<sup>+</sup> és [ZnH-2L] összetételű részecskék akár amidkoordinált, akár vegyes hidroxido-komplexek is lehetnek. Erre a kérdésre a pHpotenciometriás mérések önmagukban nem adtak választ. Tömegspektruma alapján azonban sikerült azonosítanunk a [ZnC<sub>39</sub>H<sub>59</sub>N<sub>15</sub>O<sub>10</sub>]K<sup>+</sup>H<sup>+</sup> összetételű kétszeresen protonált kálium/hidrogén adduktot, ami a sztöchiometria alapján a [ZnH<sub>-2</sub>L]K<sup>+</sup>H<sup>+</sup> részecskének felel meg. A mért 500,677 m/z-érték megfelel deprotonálódott amidnitrogének részvételével kialakuló részecskére a jellemző értéknek (számított m/z = 500,678), továbbá a mért és szimulált izotópeloszlások is jó egyezést mutatnak. Ebből arra következtethetünk, hogy – legalábbis MS-körülmények között – kialakulnak az amidnitrogének által koordinált cink(II)komplexek is, de annak minden kétséget kizáró igazolására, hogy ezen részecskék oldatfázisban is megjelennek további vizsgálatok (pl. NMR) szükségesek. Ugyanakkor érdemes megjegyezni, hogy az általunk vizsgált ligandumhoz hasonlóan két szomszédos hisztidint tartalmazó, terminálisan védett amiloid-β származékok (Ac-SGAEVHHQK-NH<sub>2</sub> és Ac-SGAEGHHQK-NH<sub>2</sub> ( $A\beta(8-16)mHH$ )) esetén is amidkoordinált cink(II)komplexek képződését feltételezik [82,98]. A fent említett esetekben a cink(II)-indukált amidnitrogén-deprotonálódást feltehetően az oldalláncbeli glutamát karboxilátcsoportja is segíti [205]. Habár az általunk vizsgált *tau*(326-333) fragmensek nem tartalmaznak glutaminsavat (és/vagy aszparaginsavat), egyéb poláris oldalláncot igen (aszparagin, lizin), amelyek a negatív töltésű oldalláncokhoz hasonló szerepet tölthetnek be a cink(II)indukált amiddeprotonálódásban.

A pH-potenciometriás és tömegspektrometriás vizsgálatok alapján felállított modell szerint a *tau*(326-333) származékok cink(II)komplexeiben a liziloldallánc ammóniumcsoportja csak erősen bázikus oldatban, 10,5-es pH felett deprotonálódik. Ez az érték egyrészről meglepő annak fényében, hogy az analóg réz(II)-, illetve nikkel(II)ionokat tartalmazó rendszerekben a  $pK(Lys-NH_3^+)$  értékek 9,69-10,37 közöttinek adódtak. Másrészről azonban, pH > 11 fölötti állandókat határoztak meg az  $A\beta(8-16)$  származékok cink(II)komplexeire is (Ac-SGAEVHHQK-NH<sub>2</sub>: pK(Lys-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) = 11,45 [82]; Ac-SGAEGHHQK-NH<sub>2</sub>: pK(Lys-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) = 11,07 [98]), mely ligandumok hasonló komplexképződési folyamatokban vesznek részt, mint az általunk vizsgált *tau*(326-333) fragmensek.
# 5.2. A natív *tau*(320-333) ligandum és mutánsa komplexképződési folyamatai

A cink(II)ionok megkötésében – és aggregációt elősegítő hatásában – fontos szerepet tulajdonítanak a tau fehérje két –SKCG– motívumának (tau(289-293) és tau(320-323)), de a fémion koordinálásában a ciszteiniloldalláncokon kívül feltehetően hisztidin imidazolnitrogének is részt vesznek. A natív tau(320-333) ligandum (Ac-SKCGSLGNIHHKPG-NH<sub>2</sub>) komplexképződési folyamatainak tanulmányozása mellett a három hisztidint tartalmazó Ac-SKCGSLGNIHHHKPG-NH<sub>2</sub> mutáns peptid (*tau*(320-333)mH) oldategyensúlyi viselkedését is vizsgáltam. Az újabb hisztidin aminosav beépítése lehetővé teszi tetraéderes koordinációs körnvezet kialakulását a fémion körül, így jelenlététől a kialakuló cink(II)-peptid komplexek termodinamikai stabilitásának növekedése várható. A cink(II)ionok mellett a nikkel(II)ionok jelenlétében lejátszódó komplexképződési folyamatokat is vizsgáltam, valamint a nikkel(II)/cink(II) vegyes rendszeren keresztül a két átmenetifémion kötőhely-preferenciáját is tanulmányoztam. Biológiai szempontból elsősorban a réz(II)- és cink(II)ionokat tartalmazó vegyes minták vizsgálata lett volna érdekes, de a réz tipikusan olvan vegvértékváltó fémion, mely hajlamos redoxireakcióba lépni a cisztein tiolcsoportjával, így ezeket a rendszereket nem tanulmányoztam.

Részecske	tau(320-333) Ac- SKCGSLGNIHHKPG- NH <sub>2</sub>	tau(320-333)mH Ac- SKCGSLGNIHHHKPG- NH <sub>2</sub>	tau(320-323) Ac-SKCG- NH <sub>2</sub> [210]	tau(326-333)
$[HL]^+$	10,65(2)	10,63(1)	10,36	10,17
$[H_2L]^{2+}$	20,62(3)	20,70(1)	18,62	16,88
$[H_3L]^{3+}$	28,63(5)	28,80(2)	_	22,69
$[H_4L]^{4+}$	35,09(6)	35,46(3)	_	_
$[H_5L]^{5+}$	40,88(7)	41,65(3)	_	_
$[H_6L]^{6+}$	_	47,08(3)	_	_
$pK(N_{Im(1)}-NH^+)$	5,79	5,43	_	5,81
$pK(N_{Im(2)}-NH^+)$	6,46	6,19	_	6,71
$pK(N_{Im(3)}-NH^+)$	_	6,66	_	_
pK (Cys-SH)	8,01	8,10	8,26	_
$pK(Lys_1-NH_3^+)$	9,97	10,07	10,36	10,17
pK (Lys <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	10,65	10,63	_	_

12. táblázat: A tau(320-333) peptid és mutánsa protonálódási (log  $\beta$ ) és deprotonálódási (pK) állandói (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

A 12. táblázat a vizsgált peptidek protonálódási és deprotonálódási állandóit tartalmazza, továbbá összehasonlításként az egyedi tiolát- és hisztidil-kötőhelyeket modellező natív tau(320-323) és tau(326-333) fragmensek megfelelő értékeit is feltüntettem. A ligandumok imidazóliumcsoportjainak deprotonálódása átfedő lépésekben játszódik le, majd a pH növelésével a tiolcsoport is deprotonálódik (pH  $\sim 8$ ) – ez, a fotometriás mérések alapján, az előző folyamattól elkülönült lépésben megy végbe (*Függelék, A6. ábra*). A pH további növelésével egy újabb lúgfogyasztó folyamat veszi kezdetét és – szintén átfedő lépésekben – bekövetkezik a liziloldalláncok ammóniumcsoportjának protonvesztése.

#### 5.2.1. A natív tau(320-333) ligandum és mutánsa nikkel(II)komplexei

A hisztidin imidazolnitrogének mellett a cisztein tiolátcsoportja is kötőhelyül szolgálhat a fémion számára, így a *tau(320-333)* származékok komplexképződési folyamatait két ekvivalens nikkel(II)iont tartalmazó oldatban is vizsgáltam.

13. táblázat: A tau(320-333) peptid és mutánsa egymagvú nikkel(II)komplexeinek stabilitási állandói ( $\log \beta$ ) (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

Részecske	tau(320-333) [211]	tau(320-333)mH	tau(320-323) [210]	tau(326-333)
[NiH4L] <sup>6+</sup>	_	38,84(2)	_	_
$[NiH_3L]^{5+}$	31,39	32,88(2)	—	_
$[NiH_2L]^{4+}$	-	25,44(3)	—	_
[NiHL] <sup>3+</sup>	17,26	17,77(4)	13,27	13,39
[NiL] <sup>2+</sup>	9,75	9,77(3)	—	—
$[NiH_{-1}L]^+$	1,68	0,95(3)	-1,02	-3,34
[NiH <sub>-2</sub> L]	-8,00	-9,44(3)	-8,49	-12,34
$[NiH_{-3}L]^{-}$	-18,23	-20,49(2)	-18,32	-22,71
$pK(amid_1)$	_	7,67	_	_
$pK(amid_2)$	7,51	8,00	_	_
$pK_{\text{átl}} (\text{amid}_{1,2})$	_	_	7,15	8,37
$pK(amid_3)$	8,07	8,82	7,47	9,00
$pK(Lys_1-NH_3^+)$	9,68	10,39	9,83	10,37
$pK(Lys_2-NH_3^+)$	10,23	11,05	—	—
$\log K(Ni+2N_{Im})$	2,76	3,38	—	3,22
$\log K(Ni+3N_{Im})$	—	4,08	—	_
$\log K(Ni+S^{-})$	_	_	2,91	_

A pH-potenciometriás adatok alapján az egymagvú részecskék (13. *táblázat*) mellett dinukleáris komplexek is képződnek (14. *táblázat*), melyekben a tiolátcsoport és a hisztidil-oldalláncok elkülönült kötőhelyekként egy-egy fémiont koordinálnak.

A 13. táblázatban feltüntetett értékeket összehasonlítva látható, hogy ekvimoláris oldatban a vizsgált ligandumok hasonló komplexképződési folyamatokban vesznek részt (21,22. ábrák).



enyhén savas-semleges pH-tartományban (pH 4-7) Az  $\sim$ létező. többszörösen protonált részecskékben a nikkel(II)ion a tiolát és/vagy az imidazolilcsoport(ok)on keresztül koordinálódik. Az ebben a pHtartományban rögzített abszorpciós spektrumok kis intenzitásúak, valamint pH < 7 alatt jelentős CD-aktivitás sem mérhető, ami alátámasztja a komplexek oktaéderes geometriáját. A titrálás során pH > 7 fölött a kezdetben színtelen minta halvány, sárgás-barna színű lett, majd a komplexek színe – a várakozásoknak megfelelően – a pH növelésével egyre intenzívebbé vált. 7-7,5-es pH fölött, a vizuális tapasztalatokkal összhangban, az UVlátható spektrofotometriás spektrumsorozatban megjelenik a síknégyzetes komplexekre jellemző nagy intenzitású sáv (Függelék, A7/1. ábra). Ez arra utal, hogy a  $[NiHL]^{3+} \rightarrow [NiH_{-1}L]^+$  összetételű komplexekben a fémion megkötésében az oldalláncbeli donoratomokon kívül feltehetően 1-3 deprotonálódott peptidnitrogén is részt vesz. Ahogy azt a 21, 22. ábrákon feltüntetett részecskeeloszlási diagramok is szemléltetik, a 446 nm-es hullámhossznál megjelenő csúcs intenzitása az amidkoordinált komplexek képződésével párhuzamosan nő, majd 9,5-es pH-nál maximumot ér el, vagyis a  $[NiH_{-1}L]^+$  részecske  $[NiH_{-2}L]$ , majd  $[NiH_{-3}L]^-$  formává alakulása nem eredményezi a moláris abszorpciós koefficiens további változását. A korábbi eredmények fényében erre is számítottunk, hiszen a kisebb tagszámú modellpeptidek vizsgálata során sem tapasztaltuk, hogy a lizil-oldallánc eammóniumcsoportia részt venne а nikkel(II)ion megkötésében. А síknégyzetes komplexek kialakulásával párhuzamosan a CD-spektrumok alakja is megváltozik (Függelék, A7/2. ábra): a megközelítőleg 520 nm-es hullámhossznál megfigyelhető pozitív Cotton-effektus mellett ~ 440 nm-nél is látható egy nagy intenzitású negatív csúcs. A látható fény hullámhossztartományában megjelenő Cotton-effektusok a d-d átmenetektől származnak. A 320 nm körül jelentkező maximumban valószínűleg összemosódik a S<sup>-</sup> $\rightarrow$ 

Ni(II) sáv az N(Im)  $\rightarrow$  Ni(II) töltésátvitellel, míg a 260-270 nm-es hullámhossznál látható intenzív csúcs a fémion és az amidnitrogének közötti töltésátviteli folyamatokhoz rendelhető. A koordinációban résztvevő donorcsoportok megerősítésén kívül a cirkuláris dikroizmus vizsgálatok segítséget jelentettek abban is, hogy megbecsüljük a síknégyzetes geometriájú nikkel(II)komplexek koordinációs izomerszerkezeteinek arányát (23. *ábra*). Mind az izomerarány, mind pedig a fő kötőhely tekintetében azonos következtetésre jutottunk mindkét vizsgált peptid esetén; az eredményeinket a nikkel(II)–*tau*(320-333)mH rendszeren keresztül mutatom be. Az N-terminális tiolátcsoport fémionmegkötését az Ac-SKCG-NH<sub>2</sub> 4N-es nikkel(II)komplexével [210], míg az imidazolil-oldalláncokról induló [N<sup>-</sup>,

N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] koordinációt az Ac-HHH-NH<sub>2</sub> ligandum sztöchiometriáiú  $[NiH_{-3}L]^{-}$ fémkomplexével modellezhetjük. Az említett részecskékhez rendelhető CD-spektrumok összegzése alapján 70%-ban olyan koordinációs izomerek alakulnak ki, melvekben а fémion az -SKCG- szekvencia tiolátkénatomián és deprotonálódott peptidnitrogénjein keresztül kötődik, vagyis a ciszteinil-oldallánc nemcsak



két, de három hisztidin jelenlétében is kedvezőbb kötőhelyet jelent a nikkel(II)ionok számára.

Kétszeres fémionfelesleg alkalmazása mellett pH > 7,5 fölött a kétmagvú nikkel(II)komplexek az uralkodó részecskék, melyekben az egyik fémion az N-terminális –SKCG– peptidrészhez kötődik, míg a másik nikkel(II) a szomszédos hisztidil-oldalláncok valamelyikén keresztül koordinálódik. A dinukleáris részecskék stabilitási állandóit a *14. táblázatban* foglaltam össze.

Részecske	tau(320-333) [211]	tau(320-333)mH
$[Ni_2L]^{4+}$	12,73	13,49(4)
$[Ni_2H_{-1}L]^{3+}$	_	5,65(3)
$[Ni_2H_{-2}L]^{2+}$	-3,65	-2,73(3)
$[Ni_{2}H_{-3}L]^{+}$	—	-12,05(3)
$[Ni_2H_4L]$	-20,86	-22,26(4)
$[Ni_2H_{-5}L]^-$	_	-32,91(4)
$[Ni_2H_{-6}L]^{2-}$	-40,82	-44,34(7)
$pK([Ni_2L]^{4+}/[Ni_2H_{-1}L]^{3+})$	_	7,84
$pK([Ni_2H_{-1}L]^{3+}/[Ni_2H_{-2}L]^{2+})$	—	8,38
$pK_{\text{átl}}$ ([Ni <sub>2</sub> L] <sup>4+</sup> /[Ni <sub>2</sub> H <sub>-2</sub> L] <sup>2+</sup> )	8,19	8,11
$pK([Ni_2H_{-2}L]^{2+}/[Ni_2H_{-3}L]^+)$	_	9,32
$pK([Ni_2H_{-3}L]^+/[Ni_2H_{-4}L])$	—	10,21
$pK_{\text{átl}}$ ([Ni <sub>2</sub> H <sub>-2</sub> L] <sup>2+</sup> /[Ni <sub>2</sub> H <sub>-4</sub> L])	8,61	9,77
pK ([Ni <sub>2</sub> H <sub>-4</sub> L]/[Ni <sub>2</sub> H <sub>-5</sub> L] <sup>-</sup> )	—	10,65
pK ([Ni <sub>2</sub> H <sub>-5</sub> L] <sup>-</sup> /[Ni <sub>2</sub> H <sub>-6</sub> L] <sup>2-</sup> )	_	11,43
$pK_{\text{átl}} ([Ni_2H_{-4}L]/[Ni_2H_{-6}L]^{2-})$	9,98	11,04

14. táblázat: A tau(320-333) peptid és mutánsa kétmagvú nikkel(II)komplexeinek stabilitási állandói (log  $\beta$ ) (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

A 24, 25. ábrákon bemutatott koncentrációeloszlási görbéken a  $\sim$  445-450 nm hullámhosszhoz tartozó moláris abszorpciós koefficiens változását is feltüntettem.



Megfigyelhető, hogy a síknégyzetes komplexek kialakulását kísérő sáv intenzitása a dinukleáris részecskék képződésével párhuzamosan nő, amiből arra következtethetünk, hogy a fémionok megkötésében a cisztein és hisztidin horgonycsoportokon kívül deprotonálódott amidnitrogének is részt vesznek, vagyis  $[(N^-)_x, S^-]$  és  $[N(Im), (N^-)_y, N(Im)]$  vagy  $[(N^-)_x, N(Im)]$  kötésmódot tartalmazó kétmagvú részecskék alakulnak ki (ahol x = 1-3 és y = 1 vagy 2). Továbbá, szembetűnő, hogy a három imidazolil-oldalláncot tartalmazó származék eloszlási görbéjén megközelítőleg 9-es pH körül, a [Ni<sub>2</sub>H<sub>-2</sub>L] sztöchiometriájú részecske képződésével párhuzamosan a moláris abszorpciós koefficiens ( $\epsilon_{451 nm}$ ) változása lokális minimumot mutat. Ebben a komplexben a két fémiont feltehetően négy peptidnitrogén, egy tiolátkén- és egy vagy két imidazol-nitrogénatom koordinálja. Az abszorpciós spektrum alapján a 25. ábrán feltüntetett lokális minimumot feltehetően a S<sup>-</sup>  $\rightarrow$  Ni(II) töltésátvitelhez és a síknégyzetes geometriához tartozó abszorpciós sávok egymásra épülése eredményezi (*Függelék, A8. ábra*).

Az UV-látható spektrofotometriás spektrumsorozatban a pH növelésével (pH > 8) 340 nm-es hullámhossznál megjelenik a nikkel(II)ionok és a

tiolátcsoport közötti kölcsönhatáshoz rendelhető váll, melynek intenzitása a kétmagvú részecskék képződésével párhuzamosan nő (26. *ábra*). pH > 8 fölött különbséget vehetünk észre a két rendszer komplexeinek speciációja között. Míg a natív tau(320-333) ligandum esetén csak a  $[Ni_2L]^{4+}$ ,  $[Ni_2H_{-2}L]^{2+}$ ,  $[Ni_2H_{-4}L]$ és [Ni<sub>2</sub>H<sub>-6</sub>L]<sup>2-</sup> összetételű réképződését szecskék tudtuk kimutatni. a három hisztidint



származék esetén a közbenső sztöchiometriájú komplexek tartalmazó kialakulását is igazoltuk [212]. Sztöchiometriáját tekintve a  $[Ni_2H_2L]^{2+}$ összetételű részecske összesen négy deprotonálódott amidnitrogént tartalmaz, ugyanakkor ez a vizsgált ligandumok esetén különböző koordinációs környezetet jelenthet a hisztidil-oldalláncokon keresztül kötődő fémion körül. A tau(326-333)mH származék esetén a hisztidin imidazol- és a két deprotonálódott peptidnitrogénen kívül egy második hisztidil-oldallánc is koordinálódhat a nikkel(II)ionhoz – nagyobb stabilitású, [N(Im), N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] kötésmódot tartalmazó komplexeket eredményezve -, míg erre a natív fragmens esetén nincs lehetőség. A 14. táblázatban feltüntetett adatokból jól látszik, hogy a tau(320-333)mH ligandum [Ni<sub>2</sub>H-4L] összetételű részecskéje mintegy 1,5 logaritmus egységgel kisebb stabilitású, mint a natív peptid megfelelő fémkomplexe. A spektroszkópiai adatok alapján valószínűsíthetjük, hogy mindkét tau(320-333) származékban ugyanazon donorcsoportok vesznek részt a nikkel(II) megkötésében, és a stabilitásbeli jelentős eltérést nem a fémionok különböző kötésmódja eredményezi. Az irodalomból ismert, hogy szomszédos hisztidil-oldalláncok ún. "stacking" párokat alkothatnak [213]. Habár a protonált imidazóliumgyűrűk közötti kölcsönhatás erősebb, mint a deprotonált hisztidinek között fellépő effektus, a két imidazolilcsoport közötti hasonló extra stabilizációs hatás kialakulása, legalábbis részben, hozzájárulhat a natív *tau(320-333)* származék nikkel(II)komplexének megnövekedett termodinamikai stabilitásához, bár a kb. 1,5 logaritmus egységbeli különbségre nem ad kielégítő magyarázatot. A jelenség pontos molekuláris hátterének feltárása további vizsgálatokat igényelne.

A dinukleáris részecskék kialakulását cirkuláris dikroizmus vizsgálatok is

megerősítik. A 27. ábra a tau(320-333) [Ni<sub>2</sub>H<sub>-6</sub>L]<sup>2-</sup> öszszetételű komplexének CDspektrumát mutatja be. А kétmagvú részecske görbéjének alakja egyértelműen eltér az Ac-SKCGSLGNIHHKPG-NH2 N- és C-terminális kötőhelvét ligandumok modellező tau(320-323) és tau(326-333) -[NiH-3L]<sup>-</sup> komplexének spektrumától. Ugyanakkor a két modellspektrum 1:1 arányú összegzésével teljesen а deprotonált dinukleáris komplex CD-görbéje jó közelítéssel



 [NIII-3L] Komplexenek spektruma, a ket modellspektrum (a) és (b) 50:50 arányú
 összegzése (c) és a Ni(II)- tau(320-333) = 2:1
 rendszer mért CD-spektruma (d) pH ~ 11-en

leírható. Hasonló következtetéseket vonhatunk le az Ac-SKCG-NH<sub>2</sub> és az Ac-HHH-NH<sub>2</sub> ligandumok megfelelő nikkel(II)komplexéhez tartozó CD-spektrumok összegzéséből a három hisztidint tartalmazó származék esetén is.

#### 5.2.2. A natív *tau*(320-333) ligandum és mutánsa cink(II)komplexei

A két és három imidazolilcsoportot tartalmazó tau(320-333) származékok

cink(II)ionok jelenlétében hasonló komplexképződési folyamatokban vesznek részt (28. ábra). Ennek megfelelően a képződő részecskék koncentrációeloszlási görbéi között sincs jelentős különbség, habár az azonos sztöchiometriának nem feltétlenül azonos kötésmód felel meg. A kialakuló komplexek stabilitási állandóit 15. táblázat а tartalmazza.



Részecske	tau(320-333)	tau(320-333)mH	tau(326-333)
$[ZnH_{3}L]^{5+}$	32,73(1)	34,55(1)	_
$[ZnH_2L]^{4+}$	26,90(7)	28,21(2)	_
$[ZnHL]^{3+}$	18,92(2)	19,45(4)	12,77
$[ZnL]^{2+}$	9,86(2)	9,81(4)	5,43
$[ZnH_{-1}L]^+$	-0,37(2)	-0,74(5)	-2,35
[ZnH <sub>-2</sub> L]	_	_	-11,81
$pK([ZnH_3L]^{5+}/[ZnH_2L]^{4+})$	5,83	6,34	_
$pK([ZnH_2L]^{4+}/[ZnHL]^{3+})$	7,98	8,76	_
$pK([ZnHL]^{3+}/[ZnL]^{2+})$	9,06	9,64	7,34
$pK([ZnL]^{2+}/[ZnH_{-1}L]^{+})$	10,23	10,55	7,78
$pK([ZnH_{-1}L]^{+}/[ZnH_{-2}L])$	_	_	9,46
$\log K(\text{Zn}+2N_{\text{Im}})$	4,10	_	2,60
$\log K(\text{Zn+2N}_{\text{Im}}-\text{S}^{-})$	6,28	_	_
$\log K(\text{Zn}+3\text{N}_{\text{Im}})$	_	5,75	_
$\log K(\text{Zn+3N}_{\text{Im}}-\text{S}^-)$		7,51	_

15. táblázat: A tau(320-333) peptid és mutánsa cink(II)komplexeinek stabilitási állandói (log  $\beta$ ) (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

Az ekvimoláris cink(II)ion:ligandum arány alkalmazása mellett ábrázolt részecskeeloszlási diagramok alapján a komplexképződés a hisztidiloldalláncok imidazol-nitrogénatomján keresztül kezdődik a [ZnH<sub>3</sub>L]<sup>5+</sup> összetételű komplex kialakulásával. A natív fragmens fémkomplexében a cink(II) kettő, míg tau(320-333)mH ligandum megfelelő részecskéjében három imidazolilcsoporton keresztül koordinálódik. A tau(320-333) fragmens esetén a fémionkötés erősségére számított log  $K(Zn+2N_{Im}) = 4,10$  érték megfelel a cink(II) két imidazolnitrogénen keresztüli koordinációjának, egyúttal közel van az Ac-HVHAH-NH2 peptid azonos koordinációs módú cink(II)komplexére meghatározott állandóhoz (log  $K(Zn+2N_{Im}) = 3,73)$  [72]. A háromfogú koordinációs módú részecskére számított log  $K(Zn+3N_{Im})$  érték pedig jó egyezést mutat az Ac-HVHAH-NH<sub>2</sub> (log  $K(Zn+3N_{Im} = 5,09)$  és az Ac-HHGH-NHMe (log  $K(Zn+3N_{Im} = 4,70)$  peptidek hasonló kötésmódot tartalmazó cink(II)komplexére meghatározott állandókkal [72]. A három hisztidint tartalmazó származék fémkomplexének mintegy 1,8 logaritmus egységgel nagyobb termodinamikai stabilitásában egyrészt az azonos sztöchiometriájú [ZnH<sub>3</sub>L]<sup>5+</sup> komplexek kötésmódbeli különbsége – a fémion két, illetve három funkciós csoporton keresztüli koordinációja – tükröződik. Másrészt, nem zárható ki annak a lehetősége sem, hogy a tau(320-333)mH ligandum [3N(Im)]-koordinált komplexei mellett kialakulnak [S<sup>-</sup>, N(Im), N(Im)] kötésmódot tartalmazó részecskék is.

Mindkét vizsgált rendszerben széles pH-tartományban (pH ~ 6-8) a  $[ZnH_2L]^{4+}$  összetételű komplex az uralkodó részecske. A sztöchiometria és a részecske kiemelkedő stabilitása arra enged következtetni, hogy a cink(II)ion megkötésében valamennyi oldalláncbeli donorcsoport részt vesz. A *15*.

*táblázat* adataiból látható, hogy a *tau*(*320-333*)*mH* ligandum fémkomplexének stabilitása több mint egy logaritmus egységgel nagyobb, mint a két imidazolilcsoportot tartalmazó peptid [ZnH<sub>2</sub>L]<sup>4+</sup> részecskéjéhez tartozó log  $\beta$ érték. A nagyobb stabilitás feltehetően arra vezethető vissza, hogy a három hisztidin imidazolnitrogén és a cisztein tiolátkénatom egyidejű koordinációjának köszönhetően a cink(II) koordinatíve telített, tetraéderes környezetben található. A komplex stabilitási állandójából kivonva a két nem koordinálódó lizil-oldallánc p*K* értékét, a log *K* = 7,51 egyensúlyi állandóhoz jutunk, ami megközelíti a cink(II)–Ac-PFHHCHRD-NH<sub>2</sub> rendszerben képződő, [N(Im), N(Im), N(Im), S<sup>-</sup>] koordinációs módú részecskére meghatározott fémionkötés erősségét (log *K*(Zn+3N<sub>Im</sub>–S<sup>-</sup>) = 8,76) [106].

A következő deprotonálódási lépésben kialakuló, egyszeresen protonált részecske kötésmódjának megállapításában UV-Vis spektrofotometriás vizsgálatok is segítettek. A szabad ligandum abszorpciós spektrumában  $(29/1. \ abra)$  – a tiolcsoport deprotonálódásával párhuzamosan – egy növekvő intenzitású váll jelenik meg pH > 7 fölött megközelítőleg 240 nm-nél; míg a cink(II)komplexek spektrumában már pH  $\geq$  6 fölött megfigyelhető egy váll jelenléte ~ 230 nm-es hullámhossznál (29/2. abra).



Ahogy azt a 28. *ábrán* bemutatott koncentrációeloszlási diagram szemlélteti, a 230 nm-es hullámhosszon leolvasott moláris abszorpciós koefficiens értékek csak részben esnek egybe a  $[ZnH_2L]^{4+}$  sztöchiometriájú komplex képződésével, míg nagyobb részben a  $[ZnHL]^{3+}$  részecskéhez rendelhetők. Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy a Zn(II)-hidroxido töltésátviteli sáv a SH  $\geq$  S<sup>-</sup> átalakulást kísérő sáv hullámhossza körül, megközelítőleg 220 nm-en [214], jelenik meg, így a 230 nm-en leolvasott moláris abszorpciós koefficiensben feltehetően az említett két átmenet olvad össze. Ez arra utal, hogy a [ZnHL]<sup>3+</sup> összetételű komplex valószínűleg egy koordinálódott vízmolekula, és nem egy amidnitrogén, protonvesztésével képződik. A további deprotonálódási folyamatok ([ZnHL]<sup>3+</sup>  $\rightarrow$  [ZnL]<sup>2+</sup>  $\rightarrow$  [ZnH<sub>-1</sub>L]<sup>+</sup>) –

az egyes lépések pH-tartománya alapján (ld. 15. táblázat) – a liziloldalláncok ammóniumcsoportjához rendelhetők.

### 5.2.3. A natív *tau*(320-333) ligandum vegyes nikkel(II)/cink(II)komplexei

A vizsgált, cisztein- és hisztidintartalmú tau fragmensek oldategyensúlyi



viselkedése egy fémiont tartalrendszerben hasonló mazó képet mutat, így cink(II)- és nikkel(II)ionok egyidejű jelencsak létében az Ac-SKCGSLGNIHHKPG-NH2 szekvenciájú ligandum komplexképződési folyamatait vizsgáltuk. A pH-potenciometriás adatok és egymagvú az törzskomplexek stabilitási állandóinak felhasználásával  $[NiZnH_{-2}L]^{2+}$ ,  $[NiZnH_{-3}L]^+$ .  $[NiZnH_{-4}L]$  és  $[NiZnH_{-6}L]^{2-}$ 

sztöchiometriájú komplexek keletkezését tudtuk kimutatni. A két fémiont tartalmazó rendszer részecskeeloszlási diagramja (*30. ábra*) meglehetősen változatos komplexképződés képét tárja elénk: a vegyes Ni(II)/Zn(II)-komplexeken kívül az egymagvú nikkel(II)- és cink(II)részecskék is jelen vannak a teljes vizsgált pH-tartományban.

Enyhén savas, semleges, sőt még enyhén bázikus oldatban is a különböző protonáltsági fokú, 1:1 összetételű cink(II)komplexek a domináns részecskék, ami újabb bizonyítékul szolgál ezen komplexek kiemelkedő stabilitására. pH ~ 8 körül kialakulnak a kétfajta fémiont tartalmazó részecskék, melyek 9-es pH fölött válnak a fő specieszekké. A dinukleáris vegyes komplexekben az egyik fémion a tiolátcsoporton és a szomszédos amidnitrogéneken keresztül kötődik, míg a másik fémion egy hisztidin imidazol- és két vagy három deprotonálódott peptidnitrogén által meghatározott koordinációs környezetben található. A kialakuló komplexek szerkezetéről, geometriájáról és a nikkel(II)ion – valamint közvetve a cink(II)ion – elsődleges kötőhelyéről az UV-látható spektrofotometriás és cirkuláris dikroizmus vizsgálatok szolgáltak információval. A képződő vegyes részecskék spektrális paramétereit a *Függelék T1. táblázatában* foglaltam össze.

pH < 8 alatt a nagy stabilitású cink(II)komplexeken kívül csak az oktaéderes geometriájú,  $[NiH_3L]^{5+}$  összetételű részecske van jelen az oldatban. Ennek megfelelően az ebben a pH-tartományban felvett abszorpciós spektrumok kis intenzitásúak. A cink(II)ionnak nincs fényelnyelése a látható hullámhossz-tartományban, vagyis az ekvimoláris Ni(II)–Zn(II)–*tau*(320-333) rendszer

pH-függő abszorpciós spektrumsorozatában (Függelék, A9. ábra) a ~ 450 nm-es hullámhossznál jelentkező nagy intenzitású sáv (ε ~ 110-226  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ másik fémion és ligandum а а d-pályái közötti elektronátmenetekhez rendelhető. A csúcs intenzitása 9,5-es pH fölött nem változik számottevően, ami alátámasztja, hogy a [NiZnH\_4L] és [NiZnH\_ <sub>6</sub>Ll<sup>2-</sup> összetételű komplexekben a nikkel(II) azonos, három deprotonálódott amidnitrogénen keresztüli kötésmódja valósul meg, és a lizil-oldalláncok ammóniumcsoportja nem vesz részt a fémion megkötésében. Ugyanakkor, az UV-Vis spektrofotometriás eredmények alapján csak azt valószínűsíthetjük, hogy а vegyes komplexekben а nikkel(II)ion koordinálásában peptidnitrogének is részt vesznek, de az elsődleges horgonvcsoportról nem ad információt. A fémion fő kötőhelyét cirkuláris dikroizmus vizsgálatok segítségével határoztuk meg. A pH-függő abszorpciós spektrumsorozattal összhangban CD-aktivitás csak pH > 8 fölött, a vegyes Ni(II)/Zn(II)komplexek kialakulásával párhuzamosan mérhető. Összehasonlítva a vegyes részecskék CD-spektrumát a két kötőhelyet modellező tau(320-323) [210] és tau(326-333) ligandumok megfelelő nikkel(II)komplexeihez tartozó CDalakjával, megválaszolhatjuk az elsődleges horgonycsoportra görbék vonatkozó kérdést.



A  $[NiZnH_{-6}L]^{2-}$  komplex (31/1. *ábra*) és az összehasonlításra szolgáló ligandumok három peptidnitrogén által koordinált  $[NiH_{-3}L]^{-}$  részecskéinek CD-spektrumát a 31/2. *ábra* mutatja be. Nyilvánvaló, hogy az ekvimoláris Ni(II)–Zn(II)–*tau*(320-333) rendszerben rögzített CD-spektrum alakja nemcsak a ciszteintartalmú tetrapeptid, hanem a *tau*(320-333) fragmens egymagvú nikkel(II)komplexének spektrumához is hasonló. Ez arra enged

következtetni, hogy a nikkel(II) mind az egymagvú, mind pedig a vegyes azonos koordinációs környezetben komplexekben található. vagvis cink(II)ionok jelenlétében is a cisztein tiolátcsoportja jelenti a fő kötőhelyet a következően nikkel(II)ion számára. Ebből a cink(II)ionok csak а rendelkezésre álló másik kötőhelyet foglalhatják el. Ez egyértelmű különbséget jelent az egymagvú cink(II)komplexekhez képest, melyekben a fémion fő kötőhelye a cisztein tiolátcsoportja.

A Ni(II)–tau(320-333) ekvimoláris rendszerhez cink(II)ionokat adagolva vizsgáltuk a koordinációs mód változását bázikus közegben (pH ~ 10,5). Arra

kíváncsiak, voltunk hogy а sztöchiometriájú  $[NiH_{-3}L]^{-}$ részecske kialakulását követően a cink(II)ionok képesek-e a másik fémiont kiszorítva a tiolát funkciós csoporthoz koordinálódni. Ahogy azt a 32. *ábrán* feltüntetett fémfüggő spektrumsorozat szemlélteti, a cink(II)ionok hozzáadása nem eredményezi az [N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, S<sup>-</sup>] kötésmódra jellemző CDsávok alakjának vagy intenzitásának jelentős változását. Ez arra utal, hogy a nikkel(II) körüli



koordinációs környezet nem változik a másik fémion hatására. Egyúttal azt is alátámasztja, hogy vegyes Ni(II)–Zn(II)–*tau*(320-333) rendszerben a cink(II) ion a szomszédos imidazolilcsoportok valamelyikén keresztül kötődik.

### 5.3 A tau(30-34)(327-332) kiméra peptid komplexképződési folyamatai

A fiziológiás pH-tartományban a His32 imidazolnitrogén kedvezőbb kötőhelyet jelenthet a réz(II)ionok számára az R3 régió két szomszédos hisztidil-oldalláncánál, míg a His329-His330 oldalláncok a cink(II)ionok számára biztosítanak jó horgonycsoportot. A két fémion eltérő kötőhely-preferenciája alapján pH  $\geq$  7 felett a réz(II) várhatóan az N-terminális hisztidinhez, a cink(II) pedig az R3 régió szomszédos imidazolilcsoportjainak egyikéhez koordinálódik. Az egyedi kötőhelyeket tartalmazó ligandumok vizsgálatából levont következtetéseinket modellszámítások is megerősítik.

A 33. ábrán feltüntetett oszlopdiagram egy olyan hipotetikus rendszerben mutatia be a réz(II)- és cink(II)ionok megoszlását az említett horgonycsoportok között, mely ekvimoláris mennyiségben  $(c_{\text{lig}} = c_{\text{M(II)}} = 1,00 \cdot 10^{-3} \text{ M})$ tartalmazza a két fémiont és az egyedi kötőhelyek kémiai környezetét modellező kisebb tagszámú peptideket (tau(26-33)m és tau(326-333)). A réz(II)cink(II)-tau(26-33)m-tau(326-(333) = 1:1:1:1 rendszer koncentrációeloszlását **MEDUSA** 



program segítségével készítettük el, összegeztük a szabad tau(26-33)m és tau(326-333) ligandumok, valamint a két peptid réz(II)- és cink(II)komplexeinek móltörtjét, majd a kapott értékeket a pH függvényében ábrázolva szerkesztettük meg a fenti ábrát. A két kötőhelyet együttesen tartalmazó, Ac-TMHQDNIHHKP-NH<sub>2</sub> szekvenciájú, ún. kiméra peptid (tau(30-34)(327-332)) segítségével tanulmányoztam, hogy a 33. ábra oszlopdiagramján bemutatott kötőhely-preferencia egy molekulán belül is mutatkozik-e.

A kiméra peptid, illetve az egyedi kötőhelyek fémionmegkötő-képességét modellező ligandumok protonálódási és deprotonálódási állandóit a 16. táblázat tartalmazza.

16. táblázat: A tau(30-34)(327-332) peptid protonálódási (log  $\beta$ ) és deprotonálódási (pK) állandói (T = 298 K, I = 0.20 M KCl)

Részecske	tau(30-34)(327-332)	tau(26-33)m [2]	tau(326-333)
[HL]	10,20(1)	10,71	10,17
$[H_2L]$	17,18(1)	20,84	16,88
$[H_3L]$	23,57(1)	30,22	22,69
$[H_4L]$	29,35(1)	36,44	_
[H <sub>5</sub> L]	32,83(2)	_	
pK (Asp–COOH)	3,48	_	_
$pK(N_{Im(1)}-NH^{+})$	5,78	6,22	5,81
$pK(N_{Im(2)}-NH^{+})$	6,39	-	_
$pK(N_{Im(3)}-NH^+)$	6,98	-	6,71
pK (Tyr–OH)	-	9,38	-
$pK(Lys_1-NH_3^+)$	10,20	10,13	10,17
$pK(Lys_2-NH_3^+)$	_	10,71	-

#### 5.3.1. A tau(30-34)(327-332) kiméra peptid réz(II)komplexei

A tau(30-34)(327-332) ligandum réz(II)ionok jelenlétében lejátszódó komplexképződési folyamatait ligandum- és fémionfelesleg alkalmazása mellett, illetve ekvimoláris oldatban tanulmányoztuk (34. ábra). A pHpotenciometriás adatok alapján az egymagvú komplexek mellett két- és hárommagvú részecskék kialakulását is ki tudtuk mutatni. A képződő



komplexek stabilitási állandóit a 17. táblázatban foglaltam össze.

17. táblázat: A tau(30-34)(327-332) peptid réz(II)komplexeinek stabilitási állandói (log  $\beta$ ) (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

Részecske	tau(30-34)(327-332)	tau(26-33)m [2]	tau(326-333)
$[CuH_2L_2]$	_	_	29,58 (31)
[CuH <sub>3</sub> L]	28,28 (5)	34,15	-
[CuH <sub>2</sub> L]	23,77 (4)	-	20,22 (11)
[CuHL]	18,78 (4)	23,98	15,81 (2)
[CuL]	11,95 (11)	16,01	9,49 (7)
$[CuH_{-1}L]$	4,80 (9)	6,68	2,66 (5)
[CuH <sub>-2</sub> L]	-3,20 (10)	-3,58	-5,50 (7)
[CuH-3L]	-12,89 (11)	-14,09	-15,12 (8)
$[Cu_2H_{-1}L]$	10,61 (6)	-	6,28 (13)
$[Cu_2H_{-2}L]$	4,52 (7)	-	-0,10 (7)
$[Cu_2H_{-3}L]$	-2,27 (9)	-	-7,36 (11)
$[Cu_2H_{-4}L]$	-9,70 (7)	_	-
$[Cu_2H_{-6}L]$	-27,52 (7)	_	-
$[Cu_3H_4L]$	-5,12 (10)	-	-
$[Cu_3H_{-5}L]$	-12,01 (7)	-	-
$[Cu_3H_{-6}L]$	-19,86 (10)	-	-
$[Cu_3H_{-7}L]$	-28,32 (8)	_	_
$pK(amid_1)$	6,83	_	6,32
$pK(amid_2)$	7,15	_	6,83
$pK_{\text{átl}} (\text{amid}_{1,2})$	_	5,09	-
$pK(amid_3)$	8,00	7,97	8,16
pK (Tyr–OH)	_	9,33	-
$pK(Lys_1-NH_3^+)$	9,69	10,26	9,62
pK (Lys <sub>2</sub> –NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	_	10,51	-
$\log K(Cu+N_{Im})$	4,71	3,93	3,33
$\log K(Cu+2N_{Im})$	6,59	_	5,64
$\log K(Cu + 3N_{Im})$	8,58	_	_



A 35. ábra az ekvimoláris mennyiségű réz(II)ion és ligandum arány

alkalmazása mellett ábrázolt koncentrációeloszlási görbét mutatja be. A komplexképződés savas oldatban, pH > 3 fölött kezdődik. A ligandum nagy fémionkötő-affinitását tükrözi, hogy a réz(II) gyakorlatilag a teljes vizsgált pH-tartományban komplexben kötött formában található. 7-es рH alatt különböző protonáltsági fokú, 1:1 sztöchiometriájú részecskék alakulnak ki. melvekben а

réz(II)iont 1-3 hisztidin imidazolnitrogén és legfeljebb egy deprotonálódott peptidnitrogén koordinálja. A savas közegben képződő komplexek esetén a fémion körüli koordinációs környezetről ESI-MS, valamint MS/MS mérések szolgáltak információval.

A [CuHL]<sup>2+</sup> sztöchiometriának megfelelő, makrokelát szerkezetű komplex képződését tömegspektruma (Függelék, A10/d. ábra) igazolja. Mint a Függelék A10/a. ábráján feltüntetett MS/MS spektrum szemlélteti, a [CuL] összetételű réz(II)ion-peptid komplex kis ütközési energiával történő fragmentációja során legnagyobb valószínűséggel a His330 és Lys331 (Cu-b9 fragmens), valamint a Lys331 és Pro332 aminosavak közötti peptidkötés hasad (Cu-b<sub>10</sub> fragmens). Ezen fragmentációs mintázat (Függelék, All. ábra), a Cu-b<sub>9</sub> fragmens keletkezése, alapján arra következtethetünk, hogy a három lehetséges imidazolil-horgonycsoport közül savas oldatban a 330-as pozíciójú hisztidin mutatja a legnagyobb affinitást a fémion megkötésére. [215] A pH további növelésével amidnitrogének deprotonálódnak és lépnek be a réz(II) koordinációs szférájába, melynek eredményeként kialakul a nagy stabilitású, 4N-es, három peptidnitrogén által koordinált [CuH<sub>-2</sub>L]<sup>-</sup> komplex. A részecskeeloszlási diagramon az abszorpciós maximum változását is feltüntettem (35. ábra). A pH növelésével az abszorpciós maximum folyamatosan tolódik el a kisebb hullámhosszak felé, ami alátámasztja, hogy az amidnitrogének deprotonálódása és koordinálódása egymást követő lépésekben játszódik le. pH > 9 fölött az abszorpciós maximum hullámhossza gyakorlatilag nem változik, csak intenzitásnövekedés tapasztalható. Ez azzal magyarázható, hogy az ebben a pH-tartományban jelenlévő két fő részecskében a fémion ugyanazon donorcsoportokon – egy hisztidin imidazol- és három deprotonálódott peptidnitrogénen – keresztül kötődik. Ugyanakkor, szembetűnő, hogy a  $[CuH_{-2}L]^{-}$  és  $[CuH_{-3}L]^{2-}$  komplexek abszorpciós maximumához tartozó hullámhossz (~ 557 nm) lényegesen

nagyobb, mint az [N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] koordinációs módra jellemző ~ 521 nm-es érték [47]. Ez arra utal, hogy a fent említetteken kívül egyéb donorcsoport is részt vesz a réz(II) koordinálásában. A várt és a mért abszorpciós maximumok hasonló eltérését a réz(II)-tau(326-333) rendszer vizsgálata során nem tapasztaltuk ( $\lambda_{max} \sim 530$  nm), viszont a jelenséget a tau(26-33) fragmens és mutánsai tanulmányozása során natív is megfigyelték. A tau(26-33) származékok réz(II)komplexeiben, habár a fémion fő kötőhelye a hisztidin, a réz(II) koordinálásában a treonil- és/vagy metionil-oldallánc(ok) részvételét is feltételezik [2]. Az ezen ligandumok 4Nes részecskéihez tartozó  $\lambda_{max}$ -értékek jó egyezést mutatnak a kiméra peptid azonos kötésmódot tartalmazó fémkomplexeire kapott értékekkel, valamint a -TMH- [216] és -TXH- kötőhelyek [217] fémionkötőképességét modellező hexapeptidek réz(II)komplexeinek megfelelő értékeivel (18. táblázat) is. A treonil-oldalláncot tartalmazó peptidek [CuH\_3L] komplexeihez tartozó abszorpciós maximum hullámhossza alapján feltételezhetjük, hogy a treonin alkoholos hidroxilcsoportjának axiális koordinációja a kiméra peptid esetén is hozzájárul a batokróm eltolódáshoz, bár nem zárhatjuk ki kétséget kizáróan a metionil-oldallánc hatását sem. Ezek az eredmények egyúttal azt is megerősítik, hogy erősen bázikus oldatban a vizsgált tau(30-34)(327-332) ligandum első hisztidinje – vagyis a His32 kémiai környezetét modellező imidazolil-oldallánc – jelenti az elsődleges kötőhelyet a réz(II)ionok számára.

18. táblázat: Tau fragmensek 4N-koordinált réz(II)komplexeinek UV-Vis spektrális paraméterei

	$\lambda_{\rm max}/\epsilon \ ({\rm nm}/{ m M}^{-1}\cdot{ m cm}^{-1})$			
Koordinációs	tau(30-34)	tau(26-33)	Ac-ATMHQD-	Ac-ATAHQD-
mód	(327-332)	[2]	NH <sub>2</sub> [216]	NH <sub>2</sub> [217]
[3N <sup>-</sup> , N(Im)]	~557/70	~551/87	~561/52	~563/88

Savas oldatban nem mérhető jelentős CD-aktivitás, ami alátámasztja, hogy ebben a pH-tartományban a réz(II)ion kizárólag az oldalláncokon keresztül kötődik. A pH növelésével és az amidkoordinált részecskék kialakulásával párhuzamosan megjelenik ~ 250 nm-es hullámhossznál egy nagy intenzitású Cotton-effektus: az N<sup>-</sup>  $\rightarrow$  Cu(II) töltésátvitelre jellemző sáv. Az abszorpciós spektrumsorozathoz hasonlóan (*Függelék, A12. ábra*), 9-es pH fölött, a három peptidnitrogén által koordinált, 4N-es komplexek CD-spektrumának lefutása sem változik, csak intenzitásnövekedés tapasztalható, újabb bizonyítékául annak, hogy a lizin ammóniumcsoportjának deprotonálódása nem eredményez változást a fémion koordinációs szférájában. Az elsődleges horgonycsoport meghatározásához, valamint a kialakuló koor-

dinációs izomerek arányának megbecsüléséhez His32 [2] és His329-His330 kötőhelyeket tartalmazó, kisebb tagszámú natív fragmensek réz(II)komplexeinek különböző pH-értékeken rögzített CD-görbéit hasonlítottuk össze a tau(30-34)(327-332) ligandum megfelelő fémkomplexének

spektrumával. 36. А ábrán bemutatott összegspektrumok alapján a kiméra peptidben az Nterminális hisztidin jelenti az elsődleges kötőhelyet a réz(II)ionok számára semleges és bázikus oldatban is, habár megközelítőleg 20%-ban olyan részecskék is kialakulnak, amelyekben fémion а а szomszédos hisztidinek valamelyikéhez



koordinálódik. Mindezen eredmények fényében valószínűsíthető, hogy az amidnitrogének koordinációban való részvétele megváltoztatja a His32 és a His329-His330 imidazolilcsoportok körüli kötőhely fémionaffinitását és a preferencia a pH növelésével a His330 hisztidinről a –TMH– szekvenciára tevődik át.

A *tau*(30-34)(327-332) ligandum szekvenciája három hisztidil-oldalláncot tartalmaz, így a kiméra peptid komplexképződési folyamatait kétszeres és háromszoros fémionfelesleg alkalmazása mellett is vizsgáltam (ld. *17. táblázat*).



Savas közegben csak különféle protonáltsági fokú, egymagvú komplexek

vannak jelen, a többmagvú részecskék csak рH а növelésével mutathatók ki számottevő mennyiségben. Kétszeres réz(II)ion-felesleg alkalmazása esetén 6-os pH fölött a kétmagvú komplexek válnak a fő specieszekké  $(37/1. \$ *ábra*).Α dinukleáris komplexek egy pHviszonylag szűk tartományban (pH  $\sim$  5-6,5) háromszoros fémionfelesleget tartalmazó oldatban is jelen vannak, hárommagvú részecskéket csak semleges és bázikus oldatban mutattunk ki (37/2. *ábra*).

A kétmagvú komplexek esetén feltételezhető, hogy a peptidnitrogének deprotonálódása mind az N-terminális imidazolilcsoportról, mind a

szomszédos hisztidinekről az aminoterminus felé indul el. Ennek egyik oka, hogy az így létrejövő 6-, csatolt (6,5)-, illetve csatolt (6,5,5)-tagú gyűrűk kialakulása kedvezőbb, mint a karboxiterminus felé kialakuló feszültebb, 7tagú kelátgyűrűs szerkezetek képződése. Másrészt a C-terminális vég felé a prolin jelenléte miatt csak egy amidnitrogén deprotonálódása valósulhatna meg, ami nem felel meg a teljesen deprotonált komplex  $[Cu_2H_{-6}L]^{3-}$ sztöchiometriájának. A részecske feltételezett  $2\times[N^-, N^-, N^-, N(Im)]$ koordinációs módját (*38/1. ábra*) CD-spektroszkópiás vizsgálatok is alátámasztják. Az N-terminális hisztidinről induló koordinációt a *tau*(*26-33*)  $[CuH_{-3}L]^-$ összetételű részecskéjének spektrumával [2], míg a szomszédos hisztidinek fémionmegkötését a *tau*(*326-333*) azonos sztöchiometriájú komplexének CD-görbéjével modelleztük. Ahogy azt a *38/2. ábra* mutatja, a modellspektrumok 1:1 arányú összegzésével a kiméra peptid teljesen deprotonált kétmagvú komplexének CD-spektruma jó közelítéssel leírható.



Háromszoros fémionfelesleg alkalmazása során sem tapasztaltuk csapadék leválását, ami arra utal, hogy a ligandum bázikus közegben is képes oldatban tartani három ekvivalens réz(II)iont. A hárommagvú részecskékben egy-egy réz(II) koordinálódik valamennyi hisztidil-oldallánchoz: az N-terminális (His32), illetve a nyolcadik helyen található hisztidinről (His329) a koordináció az aminoterminus felé indul el, így a szekvencia kilencedik pozíciójában található imidazolilcsoportról (His330) a fémion koordinációja csak a C-terminális vég felé valósulhat meg. A hárommagvú komplexek esetén a teljesen deprotonált formát a  $[Cu_3H_{-7}L]^{2-}$  sztöchiometriájú,  $2\times[N^-, N^-, N^-, N(Im)] + [N^-, N(Im)]$  koordinációs módú részecskék jelentik.



Összehasonlítva a különböző fémion:ligandum arányú mintákban felvett CD-görbék alakját, látható, hogy 6-os pH-n a fémionfelesleget tartalmazó rendszerek spektrumainak lefutása hasonló, míg az ekvimoláris oldatban rögzített görbe alakja eltér ezektől (*39/1. ábra*). Ez azzal magyarázható, hogy réz(II)ion feleslegének jelenlétében ezen a pH-n mind a 2:1, mind pedig a 3:1 fémion:ligandum arányú rendszerben kétmagvú komplexek vannak jelen (ld.

*37/1,2. ábrák*). Ugyanakkor nagyobb pH-n, a hárommagvú részecskék kialakulásával ez a hasonlóság megszűnik (39/2. *ábra*), ami a réz(II)ionok körüli eltérő koordinációs környezetre – egyúttal a hárommagvú komplexek képződésére – utal.

## 5.3.2. A tau(30-34)(327-332) kiméra peptid cink(II)komplexei

Cink(II)ionok jelenlétében különböző protonáltsági fokú, egymagvú részecskék képződnek. A keletkező komplexek stabilitási állandóit, valamint a fémionmegkötés erősségét jellemző log K értékeket a 19. táblázatban foglaltam össze.

19. táblázat: A tau(30-34)(327-332) peptid cink(II)komplexeinek stabilitási állandói (log  $\beta$ ) (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

Részecske	tau(30-34)(327-332)	tau(326-333)
[ZnHL]	16,23(2)	12,77
[ZnL]	7,66(8)	5,43
$[ZnH_{-1}L]$	-0,77(3)	-2,35
$[ZnH_{-2}L]$	-10,52(4)	-11,81
$pK(amid_1)$	8,57	7,34
$pK(amid_2)$	8,42	7,78
$pK(amid_3)$	9,75	9,46
$\log K(Zn+2N_{Im})$	_	2,60
$\log K(Zn+3N_{Im})$	6,03	_

Az ekvimoláris cink(II)ion:ligandum arány alkalmazása mellett ábrázolt koncentrációeloszlási görbéről (40/1. *ábra*) leolvasható, hogy széles pH-tartományban a [ZnHL]<sup>2+</sup> összetételű komplex az uralkodó részecske.



A komplex kiemelkedő stabilitását (log  $\beta = 16,23$ ) és sztöchiometriáját figyelembe véve, a fémion koordinálásában feltehetően mindhárom imidazolil-oldallánc részt vesz makrokelát szerkezetet kialakítva (40/2. ábra). A szintén három hisztidint tartalmazó, cink(II)–Ac-HXHZH-NH<sub>2</sub> (X, Z = Ala, Pro vagy Val) rendszerekben a tridentát koordinációs módú komplexekre számított log  $K(Zn+3N_{Im})$  értékek ~ 5-5,2-nek adódtak [118], míg ugyanez az érték az általunk vizsgált ligandum esetén közel egy logaritmus egységgel nagyobb (log  $K(Zn+3N_{Im}) = 6,03$ ). Ez egyrészt alátámasztja, hogy a kiméra peptid esetén a fémion koordinálásában nem kettő, hanem három hisztidin vesz részt. Másrészt a nagyobb log K értékben

aszparaginsav az karboxilátcsoportjának extra stabilizáló hatása is tükröződ-Tömegspektrohet. vizsgálatok metriás arra utalnak, hogy – körülmények ESI között – a keletkező cink(II)komplexek dekarboxileződnek (41. *ábra*). Ez a jelenség olvan részecskékre jellemző, melyekben fémion а



koordinálásában terminális vagy oldalláncbeli karboxilátcsoport is részt vesz. Bár a kialakuló makrokelát szerkezet nagy stabilitású, a pH növelésével bekövetkezik az amidnitrogének deprotonálódása és koordinálódása, ugyanakkor a folyamat nagyobb pH-n játszódik le, mint a cink(II)–*tau*(326-333) rendszerben. A  $[ZnL]^+ \rightarrow [ZnH_2L]^-$  összetételű komplexekben a fémion megkötésében a hisztidin horgonycsoporton kívül valószínűleg amidnitrogén(ek) is részt vesz(nek). A *Kutatócsoportunkban* végzett korábbi vizsgálatok során megállapították, hogy a *tau*(26-33) fragmens bázikus közegben nem képes oldatban tartani a cink(II)-t és 7,5-es pH fölött bekövetkezik a fémion hidrolízise. Ezen tapasztalatok alapján valószínűsíthetjük, hogy a kiméra peptidben a két szomszédos hisztidin valamelyikéről indul el a peptidnitrogének koordinációja, ahogy azt a cink(II)–*tau*(326-333) rendszer vizsgálata során is tapasztaltuk.

# 5.3.3. A *tau*(30-34)(327-332) kiméra peptid vegyes réz(II)/cink(II)-komplexei

A két kötőhely fémion-preferenciájának igazolása érdekében a *tau*(30-34)(327-332) ligandum komplexképződési folyamatait réz(II)- és cink(II)ionok egyidejű jelenlétében is vizsgáltam (20. *táblázat*).

20. táblázat: A tau(30-34)(327-332) peptid réz(II)/cink(II) vegyes fémkomplexeinek termodinamikai és spektrális paraméterei (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

Részecske	$\log \beta$	$\lambda_{max}/\epsilon (nm/M^{-1} \cdot cm^{-1})$	$\lambda/\Delta\epsilon (nm/M^{-1} \cdot cm^{-1})$
$[CuZnH_{-1}L]^{2+}$	9,13(5)	~594/55	~615/-0,16
			~525/+0,12
			~325/+0,37
			~254/+3,41
$[CuZnH_{-2}L]^+$	1,69(7)	—	_
[CuZnH-3L]	-6,09(5)	~570/64	~568/-0,18
			~468,5/-0,05
			~323/+0,51
			~258,5/+3,93
$[CuZnH_{-4}L]^{-}$	-14,27(4)	~560/70	~638,5/+0,16
			~553/-0,40 (váll)
			~264/+3,09 (váll)
$[CuZnH_{-5}L]^{2-}$	-23,71(4)	~555/73	~643 (+0,27)
			~552/-0,55 (váll)
			~268,5/+2,89 (váll)

Savas közegben a vegyes rendszerek speciációja (42. ábra) nagyon hasonló

az ekvimoláris és kétszeres mennyiségű réz(II)iont tartalmazó rendszerekéhez (vö. 35. és 37/1. *ábrákat*), és csak különböző protonáltsági fokú, egymagvú réz(II)kompképződését lexek tudtuk kimutatni. Semleges oldatban (pH  $\geq$  6,5) megjelennek Cu(II)/Zn(II)vegyes а tartalmú részecskék, melyekben a fémionok egy-egy imidazolilcsoporton és 1-3



deprotonálódott peptidnitrogénen keresztül koordinálódnak. Az UV-Vis spektrofotometriás és CD-spektroszkópiás vizsgálatokból (ld. 20. táblázat) elsősorban a réz(II)ion körüli koordinációs környezetről kaphatunk

információt. A réz(II)- és cink(II)ionokat egyaránt tartalmazó oldatban rögzített spektrumok abszorpciós maximumaihoz tartozó hullámhosszértékek jó egyezést mutatnak az egymagvú réz(II)komplexek megfelelő  $\lambda_{max}$ értékeivel, ami a réz(II) körüli hasonló koordinációs környezetre utal. Hasonló következtetéseket vonhatunk le a CD-spektroszkópiás vizsgálatokból is. Összehasonlítva a vegyes rendszerben rögzített CD-spektrumok lefutását az ekvimoláris mennyiségű réz(II)iont tartalmazó mintában felvett görbék alakjával, azok az enyhén savas pH-tartományban gyakorlatilag megegyeznek (43/1. *ábra*). Ez a megfigyelés összhangban van a részecskeeloszlási diagramokkal (ld. 35. és 37/1. ábrák), hiszen 6-os pH alatt mindkét rendszerben csak egymagvú réz(II)komplexek vannak jelen. A hasonlóság fiziológiás pH-n is megfigyelhető (43/2. ábra). Ezen a pH-n a két fémiont tartalmazó oldatban már kialakulnak a vegyes fémkomplexek és a spektrumok hasonlóságából arra következtethetünk, hogy a réz(II) azonos koordinációs környezetben található mind a réz(II)-törzskomplexekben, mind pedig a Cu(II)/Zn(II)-részecskékben. Az abszorpciós és a CD-spektroszkópiás eredmények alapján tehát valószínűsíthetjük, hogy fiziológiás pH-n a két fémiont tartalmazó rendszerben is az N-terminális hisztidil-oldallánc jelenti az elsődleges horgonycsoportot a réz(II) számára, míg a cink(II)ionok a karboxiterminus két szomszédos hisztidinjének valamelyikéhez kötődnek. Ezek az eredmények alátámasztják az egyedi kötőhelyeket tartalmazó ligandumok vizsgálatából levont következtetéseinket, illetve igazolják a modellszámítások alapján feltételezett kötőhely-preferenciát is (33. ábra).



# 5.4. A két különböző kötőhelyet tartalmazó modellpeptid, a HAVAHHH-NH2 komplexképződési folyamatai

A HAVAHHH-NH<sub>2</sub> heptapeptid két nagy affinitású kötőhelyet tartalmaz. Az N-terminális aminocsoporton és hisztidil-oldalláncon keresztül a fémionok "hisztaminszerű" koordinációval kötődhetnek, de a karboxiterminus három szomszédos imidazolilcsoportja is horgonydonorként szolgálhat a vizsgált 3d átmenetifémionok számára. Ez lehetőséget teremt arra, hogy egy molekulán belül tanulmányozzuk a réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionoknak az említett kötőhelyek felé mutatott affinitását. A komplexképződés során mind az aminoterminus, mind pedig a C-terminális hisztidil-oldalláncok független kötőhelyekké válhatnak, ezáltal fémionfelesleget tartalmazó rendszerben többmagvú komplexek is kialakulhatnak.

A heptapeptid protonálódási és deprotonálódási állandóit, valamint a különböző fémkomplexek stabilitási állandóit a 21. táblázatban tüntettem fel.

21. táblázat: A HAVAHHH-NH<sub>2</sub> heptapeptid protonálódási (log  $\beta$ ) és deprotonálódási (pK) állandói, valamint a keletkező fémkomplexek stabilitási állandói (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

Részecske	$\log \beta$	p <i>K</i>	_
[HL] <sup>+</sup>	7,59(1)	7,59	
$[H_2L]^{2+}$	14,43(1)	6,84	
$[H_3L]^{3+}$	20,74(1)	6,31	
$[H_4L]^{4+}$	26,50(1)	5,76	
$[H_5L]^{5+}$	31,66(1)	5,16	
	Cu(II)	Ni(II)	Zn(II)
$[MH_2L_2]^{4+}$	29,23(15)	_	_
$[MHL_2]^{3+}$	22,52(10)	_	_
$[ML_2]^{2+}$	14,85(14)	_	_
$[MH_{3}L]^{5+}$	27,58(6)	25,31(5)	_
$[MH_2L]^{4+}$	23,24(1)	20,31(4)	_
[MHL] <sup>3+</sup>	18,54(1)	14,95(4)	13,24(3)
$[ML]^{2+}$	12,05(2)	8,72(4)	7,01(2)
$[MH_{-1}L]^+$	3,88(2)	-0,18(6)	_
$[MH_{-2}L]$	-4,98(3)	_	_
$[MH_{-3}L]^{-}$	-15,22(2)	-20,27(6)	_
$[M_2HL]^{5+}$	21,64(3)	_	_
$[M_2L]^{4+}$	16,83(2)	_	_
$[M_2H_{-1}L]^{3+}$	11,23(2)	_	_
$[M_2H_{-2}L]^{2+}$	5,05(2)	-4,61(12)	_
$[M_2H_{-3}L]^+$	-2,37(2)	_	_
$[M_2H_4L]$	-11,85(3)	-22,38(11)	_
$[M_2H_{-5}L]^-$	-21,14(2)	_	_
$[M_2H_{-6}L]^{2-}$	-32,56(2)	-44,03(12)	_
$pK(amid_1)$	8,17	8,90	_
pK (amid <sub>2</sub> )	8,86	_	_
$pK(amid_3)$	10,24	_	_
$pK_{\text{átl}} \text{ (amid}_{2,3})$	_	10,05	_

A ligandum öt protonfelvételre és -leadásra képes funkciós csoportot tartalmaz. Egyéb multihisztidin peptidekhez hasonlóan [72,97] az

5.4. A két különböző kötőhelyet tartalmazó modellpeptid, a HAVAHHH-NH<sub>2</sub> komplexképződési folyamatai

imidazóliumcsoportok deprotonálódása egymással átfedő lépésekben megy végbe; a legnagyobb pK érték feltehetően a terminális aminonitrogén protonvesztéséhez rendelhető.

#### 5.4.1. A HAVAHHH-NH2 ligandum réz(II)komplexei

A réz(II)–HAVAHHH-NH<sub>2</sub> rendszer ligandumfelesleg alkalmazása mellett és ekvimoláris oldatban rögzített koncentrációeloszlási görbéit a 44. *ábra* mutatja be.



A komplexképződés már savas közegben, pH ~ 2,5 körül megindul, vagyis a réz(II)ionok gyakorlatilag a teljes vizsgált pH-tartományban fémkomplex A kis pH-n kialakuló, [CuH<sub>3</sub>L]<sup>5+</sup> összetételű formájában vannak jelen. részecskében a fémion feltehetően a terminális aminocsoporton és a szomszédos hisztidin-imidazolgyűrű nitrogénatomján keresztül kötődik "hisztaminszerű" koordinációval. A sztöchiometriából adódóan ebben a komplexben a C-terminális imidazolilcsoportok protonáltak. A részecske feltételezett [NH2, N(Im)] típusú kötésmódját támasztja alá, hogy a [CuH<sub>3</sub>L]<sup>5+</sup> stabilitási állandójából kivonva a nem koordinálódó hisztidiloldalláncok átlagos pK értékét (:  $27,58 - 3 \times 6,02$ ), a log K = 9,52 állandóhoz jutunk, ami jó egyezésben van a réz(II)-hisztamin rendszerre számolt, 9,58os értékkel [218]. Az egyensúlyi állandó a kétszeresen protonált formára 11.20-nak, míg a [CuHL]<sup>3+</sup> komplexre 12,52-nak adódott. Ezek az értékek lényegesen nagyobbak, mint az egyszerű "hisztaminszerű" kötésmódú komplexekre meghatározott származtatott állandók, ami arra enged következtetni, hogy a réz(II) megkötésében egyéb donorcsoportok is részt vesznek. A Cterminális hisztidil-oldalláncok koordinálódását támasztja alá, hogy a pH növelésével az abszorpciós maximum kismértékű hipszokróm eltolódása (45/1. ábra) ellenére a CD-spektrumsorozatban csak envhén bázikus közegben észlelhető jelentősebb változás (45/2. ábra). Semleges és bázikus oldatban (pH ~ 7-10) az abszorpciós maximum hullámhossza megközelítőleg 560-580 nm, ami arra utal, hogy legalább három nitrogénatom vesz részt

5.4. A két különböző kötőhelyet tartalmazó modellpeptid, a HAVAHHH-NH<sub>2</sub> komplexképződési folyamatai

a réz(II)ion megkötésében. Ebben a pH-tartományban, a  $[CuL]^{2+} \rightarrow$  $[CuH_{-x}L]^{(2-x)+}$  összetételű formák (ahol x = 1-3) képződésével párhuzamosan, a CD-spektrumok 140 11,00 10.09 lefutása is megváltozik: egy (1) 120 új, negatív Cotton-effektus 100 figvelhető meg megközelí-7.40 8.68 08 <mark>(1</mark>-1 5,88 tőleg 560 nm-nél, továbbá két pozitív csúcs jelenik 5 5 60 meg körülbelül 650 és 496 40 nm-es hullámhosszaknál. A 3.67 20 spektrális változásokat a 0 fémion körüli koordinációs 350 450 550 650 750 850 **λ (nm)** szféra átrendeződésével magyarázhatjuk: megjelennek 0,7 (2)az amidnitrogének lépcső-0,5 8,58 deprotonálódásával 0,3 7.32 zetes 4,62 0,1 képződő,  $[CuH_{-1}L]^+$ , Δε (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) -0,1<sub>300</sub> 400 500 600 700 800  $[CuH_{-2}L]$  $[CuH_{-3}L]^{-}$ és -0,3 sztöchiometriájú részecskék, -0,5 10,04 melyekben az amino--0,7 és/vagy az imidazolilcsoport -0,9 10,81 mellett 1-3 deprotonálódott 11,17 -1,1 -1.3 λ (nm) peptidnitrogén is részt vesz a réz(II)ion koordinálásában. 45. ábra: A Cu(II)–HAVAHHH-NH<sub>2</sub> = 1:1 Említést érdemel, hogy míg arányú rendszer pH-függő abszorpciós (1) és a HisGly és egyéb, N-CD-spektrumsorozata (2) hisztidil-oldalterminális láncot tartalmazó peptidek, valamint a terminálisan védett, láncközi

láncot tartalmazó peptidek, valamint a terminálisan védett, láncközi imidazolilcsoportot tartalmazó ligandumok esetén az amidkoordinált részecskék már enyhén savas közegben (pH ~ 6) kialakulnak, addig a peptidnitrogének deprotonálódása az általunk vizsgált Cu(II)–HAVAHHH-NH<sub>2</sub> rendszerben csak 7,5-es pH felett veszi kezdetét. Ez a megfigyelés szintén alátámasztja, hogy habár a savas-semleges oldatban képződő, különböző protonáltsági fokú részecskékben a fémion fő kötőhelye a terminális aminocsoport és a szomszédos hisztidin imidazol-nitrogénatomja, a C-terminális hisztidil-oldalláncok is részt vesznek a réz(II) koordinálásában. Ezáltal az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja kis mértékben visszaszorul és a nagyobb pH-tartományba tolódik. A 11-es pH körül fő speciesszé váló, [CuH<sub>-3</sub>L]<sup>-</sup> összetételű komplex az abszorpciós maximumának hullámhossza (~ 514 nm) alapján egy 4N-koordinált részecske. A sztöchiometriából adódóan a fémion megkötésében három amidnitrogén vesz részt, de a negyedik donorcsoport a terminális

5.4. A két különböző kötőhelyet tartalmazó modellpeptid, a HAVAHHH-NH<sub>2</sub> komplexképződési folyamatai

aminonitrogén vagy az egyik láncközi hisztidil-lánc is lehet, így izomerszerkezetek kialakulásával kell számolnunk. Megvalósulhat az oligoglicinekre jellemző [NH<sub>2</sub>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>] típusú koordináció, illetve a réz(II) kötődhet az [N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] donoratomokon keresztül is, mint az Nterminálisan védett, egy vagy két hisztidil horgonycsoportot tartalmazó pep-

tidek fémkomplexeire jellemző. A tetraalanin [CuH<sub>-3</sub>L]<sup>-</sup> összetételű részecskéjét [219] az előbbi, míg a *tau*(326-333) oktapeptid megfelelő komplexét az utóbbi koordinációs mód modellezésére használhatjuk. Ezen formák CDspektrumainak összehasonlítása (46. *ábra*) alapján a fémiont a C-, illetve Nterminális részen kötő koordinációs izomerek aránva megközelítőleg 1:1, vagyis bázikus közegben a C-termi-



nális imidazolilcsoportok is nagy affinitással kötik a réz(II)ionokat még a terminális aminocsoport jelenlétében is.

Kétszeres ligandumfelesleg alkalmazása esetén az 5,5-8,5 pH-tartományban az egymagvú részecskék mellett biszkomplexek is képződnek (ld. 44/1. ábra), melyek kialakulását a "hisztaminszerű" koordinációs mód teszi lehetővé. A biszkomplexek képződését jellemző log  $K_1/K_2$  érték (log  $K_1/K_2$  =  $\log K_1 - \log K_2 = 2 \cdot \log \beta [MH_xL] - \log \beta [MH_{2x}L_2], \text{ abol } x = 0 \text{ vagy } 1)$ meglehetősen nagy: a kétszeresen protonált forma esetén 7,85-nak, míg a  $[CuL]^{2+}/[CuL_2]^{2+}$  részecskékre 9,25-nak adódott (összehasonlításként: a réz(II)-biszhisztamin komplex kialakulására számított érték 3,10 [218]). Ez arra utal, hogy a biszkomplexben a két koordinálódó ligandum eltérő kötésmódot alakít ki a réz(II)ionnal. Az egyik peptid feltehetően az 1:1 sztöchiometriájú komplexeknél ismertetett polidentát koordinációval kötődik, míg a másik ligandum és a fémion között egyfogú vagy pedig "hisztaminszerű" kötésmód alakul ki az axiális-ekvatoriális síkban. A kötésmód pontosabb meghatározásában az UV-Vis spektrofotometriás vizsgálatok jelentettek segítséget: a pH ~ 6-8 tartományban megfigyelhető az abszorpciós maximum hullámhosszának kis mértékű batokróm eltolódása (Függelék, A13. ábra), amit valószínűleg a második ligandum axiális hatása eredményez. Azonban a biszkomplexek képződése sem tudja megakadályozni a peptidnitrogének deprotonálódását és 8-as pH fölött az egymagvú, amidkoordinált komplexek válnak az uralkodó részecskékké ligandumfelesleget tartalmazó oldatban is.

# 5.4. A két különböző kötőhelyet tartalmazó modellpeptid, a HAVAHHH-NH<sub>2</sub> komplexképződési folyamatai

Fémionfelesleget tartalmazó rendszerben a kétmagvú komplexek már pH > 4,5 felett kialakulnak (47/1. *ábra*). Ilyen savas közegben kizárhatjuk a deprotonálódott peptidnitrogének részvételét a fémionok megkötésében, vagyis a két réz(II)ion egymástól elkülönülten koordinálódik az aminoterminushoz, illetve a C-terminális hisztidinekhez, majd semleges és bázikus oldatban kialakulnak az amidkoordinációjú részecskék. A kétmagvú komplexek képződését a pH-potenciometriás, UV-Vis spektrofotometriás és CD-spektroszkópiás méréseken kívül tömegspektroszkópiás vizsgálatok is megerősítik. A 47/2. *ábrán* bemutatott, mért és számított m/z-értékek, valamint a mért és a szimulált izotópeloszlás egyezése alátámasztja a [Cu<sub>2</sub>H<sub>-5</sub>L]<sup>–</sup> összetételű dinukleáris részecske kialakulására.



#### 5.4.2. A HAVAHHH-NH2 ligandum nikkel(II)komplexei

Réz(II)és nikkel(II)ionok jelenlétében hasonló komplexképződési folvamatok játszódnak le, de a nikkel(II)komplexek valamivel kisebb stabilitásúak, mint réz(II)ionokat tartalmazó analógiaik (ld. 21. táblázat). A komplexképződés 4-es pH körül kezdődik: a terminális aminocsoport és a szomszédos hisztidin imidazolnitrogén részvételével a fémion "hisztaminszerű" koordinációja valósul meg, de a protonált részecskékben a nikkel(II) megkötésében feltehetően legalább két láncközi imidazolilcsoport is részt vesz. Ezt támasztia alá, hogy a [NiH<sub>3</sub>L]<sup>5+</sup> komplex log K = 7.25-os értéke nem tér el jelentősen a nikkel(II)-hisztamin rendszerben kialakuló [NH<sub>2</sub>, N(Im)] koordinációs módú, egymagvú részecske képződésére számított 6,82os értéktől [218]. Ugyanakkor a kétszeresen és egyszeresen protonált formákra kapott egyensúlyi állandók – log K  $[NiH_2L]^{2+} = 8.27$  és  $\log K [\text{NiHL}]^+ = 8,93 - \text{lényegesen nagyobbak, ami egyéb donorcsoportok}$ stabilizáló hatására utal. A pH ~ 4-6,5 tartományban felvett kis intenzitású abszorpciós spektrumok (Függelék, A14. ábra) egyértelműen bizonyítják, hogy a nikkel(II) valamennyi protonált részecskében oktaéderes koordinációs környezetben található. А fiziológiás pH-tartományban az 1:1

sztöchiometriájú,  $[NiL]^{2+}$  összetételű komplex a fő részecske. A pH további növelésével kialakul a  $[NiH_{-1}L]^+$  összetételű komplex, majd 10-es pH fölött egy újabb extra lúgfogyasztó folyamat eredményeként két peptidnitrogén kooperatív deprotonálódásával és koordinálódásával keletkezik a  $[NiH_{-3}L]^$ sztöchiometriájú részecske. Természetesen, mind a terminális aminocsoport, mind pedig a C-terminális imidazolil-oldalláncok horgonydonorként szolgálhatnak a fémion-indukált amiddeprotonálódáshoz. A lehetséges kötésmódokat tartalmazó modellpeptideket [218,220] felhasználva, a koordinációs izomerek aránya és a fémionkötés preferenciája megállapítható. A 48. ábrán bemutatott hipotetikus eloszlási görbe egyrészt szemlélteti, hogy a



~ 6-8.5 tartományban рH elsősorban "hisztaminszerű" kötésmódot tartalmazó komplexek képződésével kell számolnunk. Másrészt bemutatja, hogy 10,5-es pH fölött a 'C'vel jelölt tetraalanin nikkel(II)komplexe az uralkodó részecske, hiszen a fémion mintegy 80%-ban ehhez a ligandumhoz kötődik. Ez arra utal, hogy erősen bázikus oldatban a HAVAHHH-NH2 ligandumban a fémion [NH2, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>] típusú koordiná-

ciója preferált, vagyis ilyen körülmények között az aminonitrogén egyértelműen jobb kötőhelyet jelent a nikkel(II) számára, mint a C-terminális

hisztidinek. A nikkel(II)ion nagy pH-jú kötőhely-preferenciáját а megfelelő CD-spektrumok összevetése is alátámasztja. A bázikus oldatban kialakuló  $[NiH_{-3}L]^{-}$ sztöchiometriájú komplexek [NH2, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>] típusú koordinációját a terminálisan szabad tetraalanin [220] megfelelő részecskéjének CDspektrumával, míg a C-terminális rész fémionmegkötő-képességét az Ac-HHH-NH<sub>2</sub> teljesen deprotonált nikkel(II)komplexének spektrumával modellezhetjük. A mért és a modellpeptidek fémkomplexeinek



5.4. A két különböző kötőhelyet tartalmazó modellpeptid, a HAVAHHH-NH<sub>2</sub> komplexképződési folyamatai

CD-görbéit összehasonlítva jól látszik, hogy az Ac-HHH-NH<sub>2</sub> peptid [NiH<sub>-3</sub>L]<sup>-</sup> részecskéjének spektruma egyértelműen eltér a tetraalanin és a vizsgált HAVAHHH-NH<sub>2</sub> ligandum fémkomplexének spektrumától, míg utóbbi két CD-görbe jó egyezést mutat (49. *ábra*). Hasonló preferenciát a réz(II)ionok esetén nem figyeltünk meg, a [CuH<sub>-3</sub>L]<sup>-</sup> komplex koordinációs izomerszerkezetei összemérhető arányban jelennek meg.

A HAVAHHH-NH<sub>2</sub> peptid – a várakozásoknak megfelelően – képes két nikkel(II)ion megkötésére. A dinukleáris komplexek képződésének pHtartománya egy újabb különbség a réz(II)ionokat tartalmazó rendszerhez képest, ahol a kétmagvú részecskék jelenlétét már a savas pH-tartományban ki tudtuk mutatni, míg nikkeltartalmú analógjaik csak bázikus oldatban képződnek. Fémionfelesleg alkalmazása mellett [Ni<sub>2</sub>H<sub>-2</sub>L]<sup>2+</sup>, [Ni<sub>2</sub>H<sub>-4</sub>L] és [Ni<sub>2</sub>H<sub>-6</sub>L]<sup>2–</sup> összetételű részecskék keletkeznek (50/1. ábra); a teljesen deprotonált komplex képződését tömegspektruma is alátámasztja (50/2. ábra).



görbéje ( $c_{lig} = 2,00 \cdot 10^{-3} M$ ) (1); valamint a [Ni<sub>2</sub>H<sub>-6</sub>L]<sup>2-</sup> (M<sub>rel</sub> = 916,230) összetételű nikkel(II)komplex mért (a) és szimulált (b) tömegspektruma (pH ~ 11,0) (2)

#### 5.4.3. A HAVAHHH-NH2 ligandum cink(II)komplexei

A cink(II)–HAVAHHH-NH<sub>2</sub> rendszer pH-potenciometriás titrálása során valamennyi vizsgált fémion:ligandum aránynál 7,5-es pH felett csapadék leválását tapasztaltuk. A savas-semleges pH-n kialakuló komplexekben a fémion kötődhet az aminocsoporton és az N-terminális hisztidin imidazolnitrogénatomján keresztül "hisztaminszerű" koordinációval, de akár a Cterminális imidazolgyűrűk is kötőhelyként szolgálhatnak a cink(II) számára. A pH-potenciometriás adatokból csak két részecske stabilitási állandóját tudtuk meghatározni (ld. 21. táblázat). A [ZnL]<sup>2+</sup> összetételű komplexre kapott értéket (log  $\beta$  = 7,01) összevettettük más, terminális aminocsoportot (hisztamin: log K = 5,56 [221]) vagy több hisztidil-oldalláncot tartalmazó ligandumok (Ac-HVHAH-NH<sub>2</sub>: log K = 5,09 [72]; Ac-TMHQDNIHHKP- NH<sub>2</sub>: log K = 6,03) cink(II)komplexeinek megfelelő állandóival. Szembeötlő, hogy a HAVAHHH-NH<sub>2</sub> ligandum mintegy 1-2 nagyságrenddel nagyobb stabilitású fémkomplexet képez, mind a "hisztamiszerű" kötésmódot, mind pedig a három imidazolilcsoporton keresztüli koordinációt modellező peptideknél. A [ZnL]<sup>2+</sup> komplex kiemelkedő stabilitása alapján valószínűsíthetjük, hogy a fémion megkötésében négy vagy akár öt donorcsoport is részt vesz, ugyanakkor még ez a nagy stabilitású makrokelát szerkezet sem képes megakadályozni a fémion bázikus oldatban bekövetkező hidrolízisét.

## 5.4.4. A HAVAHHH-NH2 ligandum vegyes réz(II)/nikkel(II)-komplexei

Az 5.4.3. alfejezetből kitűnik, hogy a cink(II)ionok számára kevésbé kedvezőek a HAVAHHH-NH<sub>2</sub> ligandum által kínált koordinációs lehetőségek. Azonban a heptapeptid mind réz(II)-, mind pedig nikkel(II)ionokkal képez kétmagvú részecskéket, így figyelembe kell vennünk annak lehetőségét, hogy egy háromkomponensű rendszerben a két különböző fémion koordinációjával akár vegyes Cu(II)/Ni(II)-komplexek is kialakulhatnak. Ki kell emelnünk,

hogy akár a C-, akár az Nterminális vég kötőhelyül szolgálhat bármelyik fémion számára, illetve természetesen a vegyes rendszerben is kialakulhatnak olyan komplexek, amelyekben azonos fémionok koordinációja valósul meg. Habár a keletkező részecskék nagy száma miatt nem tudtuk meghatározni a különböző fémionok koordinációjával képződő komplexek stabilitási állandóit, a CD-spektroszkópiás



vizsgálatok igazolják a vegyes részecskék megjelenését. Az ekvimoláris Cu(II)–Ni(II)–HAVAHHH-NH<sub>2</sub> rendszerben képződő [CuNiH<sub>-5</sub>L]<sup>-</sup> sztöchiometriájú komplex CD-görbéje a tetraalanin 3N- és 4N-koordinált nikkel(II)komplexei [219,220], az Ac-HVH-NH<sub>2</sub> (3N) [222], illetve az Ac-SKPKTNAKHA-NH<sub>2</sub> (4N) réz(II)komplexe spektrumának [223] összegzésével jó közelítéssel leírható (*51. ábra*). Az összegspektrum számításánál mindkét kötőhely mindkét fémion megkötésében való részvételét azonosnak tekintettük (25%), és a CD-görbék lefutásának összehasonlítása alapján valószínűsíthetjük, hogy oldatfázisban mind a nyolc lehetséges koordinációs izomer összemérhető koncentrációban van jelen. A [CuNiH<sub>-5</sub>L]<sup>-</sup> komplex keletkezését nemcsak CD-spektroszkópiás vizsgálatok, de tömegspektruma (ld. *Függelék, A15/1. ábra*) is megerősíti.

# 5.5. A különböző kötőhelyek fémionkötő-affinitása

Általánosan elmondható, hogy az általunk vizsgált hisztidintartalmú ligandumok legnagyobb affinitással a réz(II)ionokat koordinálják, de termodinamikailag stabil nikkel(II)- és cink(II)komplexek is kialakulnak. Az értekezés egyik célkitűzése a különböző kémiai környezetben található horgonycsoportok fémionmegkötő-képességének összehasonlítása, melv eredményeket ebben a fejezetben mutatom be. A könnyebb áttekinthetőség kedvéért a tanulmányozott peptidek lehetséges horgonycsoportjait a 22. táblázatban foglaltam össze. A vizsgált származékok a szomszédos imidazolgyűrűkön kívül egy másik nagy affinitású kötőhelyet is tartalmaznak: a -TMH- szekvencia hisztidinjét, a cisztein tiolátcsoportját, vagy a terminális aminocsoport és szomszédos hisztidin imidazol-nitrogénatomját, mely donorcsoportokon keresztül "hisztaminszerű" kötésmódot tartalmazó fémkomplexek alakulhatnak ki.

Ligandum	Horgonycsoport	
Ac-KGGYTMHK-NH <sub>2</sub>		
tau(26-33)m [2]	HIS52 N(IIII)	
Ac-GNIHHKPG-NH <sub>2</sub>	Hig220 Hig220 N(Im)	
tau(326-333)	HIS329-HIS330 IN(IIII)	
Ac-TMHQDNIHHKP-NH <sub>2</sub>	His32 N(Im)	
tau(30-34)(327-332)	His329-His330 N(Im)	
Ac-SKCGSLGNIHHKPG-NH <sub>2</sub>	Cys322 S <sup>-</sup>	
tau(320-333)	His329-His330 N(Im)	
Ac-SKCGSLGNIHHHKPG-NH <sub>2</sub>	Cys322 S <sup>-</sup>	
tau(320-333)mH	–HHH– szekvencia	
HAVAHHH NH.	$NH_2$ , $N(Im)$	
	C-terminális –HHH– szekvencia	

22. táblázat: A vizsgált ligandumok potenciális kötőhelyei

A különböző ligandumok **réz(II)ionkötő** képességének összehasonlítására jól használható a pCu(II) értékek<sup>11</sup> összevetése. A *Kutatócsoportunkban* végzett korábbi vizsgálatok során megállapították, hogy a tau fehérje 32. pozíciójú hisztidinjének kémiai környezetét modellező oktapeptid (*tau*(26-33)) és mutánsai különösen hatékonyak a réz(II)ionok megkötésében mind semleges, mind pedig bázikus oldatban [2], így összehasonlításként az Ac-KGGYTMHK-NH<sub>2</sub> peptidre számított pCu(II) érték is szerepel a 23. *táblázatban*.

 $<sup>^{11}</sup>$  A pCu(II) érték a peptidhez nem kötött fémion egyensúlyi koncentrációjának tízes alapú negatív logaritmusa (c<sub>lig</sub> = 1 · 10<sup>-5</sup> M, c<sub>Cu(II)</sub> = 1 · 10<sup>-6</sup> M).

23. táblázat: Az ekvimoláris réz(II)–ligandum rendszerekben számolt pCu(II) értékek pH = 7,4-en (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

	tau(26-33)m	tau(326-333)	tau(30-34)(327-332)	HAVAHHH-NH <sub>2</sub>
pCu(II)	9,59	8,19	10,50	12,64

A 23. táblázat adatai és az 52/1. ábrán bemutatott oszlopdiagram jól szemlélteti, hogy fiziológiás pH-n a HAVAHHH-NH<sub>2</sub> ligandum még a kiméra peptidnél is erősebben köti a réz(II)ionokat. A vizsgált ligandumok fémionkötő-képességében pH = 7,4-en a következő sorrend állítható fel: HAVAHHH-NH<sub>2</sub> > tau(30-34)(327-332) > tau(26-33)m > tau(326-333). A koordinálódó donorcsoportok tekintetében tehát megállapítható, hogy a legnagyobb stabilitásúak a "hisztaminszerű" kötésmódot tartalmazó Cu(II)– HAVAHHH-NH<sub>2</sub> komplexek. A peptid kiemelkedő fémionkötő-képességét azzal magyarázhatjuk, hogy a réz(II)komplexek szerkezetét ezen a pH-n feltehetően a C-terminális hisztidil-oldalláncok kiegészítő koordinációja is stabilizálja. Összehasonlításként: a réz(II)–hisztamin rendszerben képződő, [NH<sub>2</sub>, N(Im)] koordinációs módú részecskék esetén számított pCu(II) érték mintegy 0,8 logaritmus egységgel kisebbnek, 11,85-nak adódott [218], ami arra utal, hogy a –HHH– rész szerkezetstabilizáló hatása nem elhanyagolható.



Azt is megállapíthatjuk, hogy habár a két szomszédos hisztidil-oldalláncon keresztüli koordináció is termodinamikailag stabil komplexek kialakulását eredményezi, a -TMH- szekvencia egyértelműen kedvezőbb koordinációs környezetet jelent a réz(II)ionok számára (vö.: a tau(26-33)m és tau(326-333) ligandumok pCu(II) értékeit – 23. táblázat). Ezt feltételezhetően a hisztidin környezetében található treonilközvetlen és/vagy metionil-oldallánc hatásának tulajdoníthatjuk. A -TMH- rész nagy rézionkötő-affinitását támasztja alá, hogy bázikus oldatban kialakuló amidkoordinált а részecskékben ez a kötőhely erősebb horgonycsoportnak bizonyul mind a

terminális aminonitrogénnél, mind pedig a szomszédos imidazoliloldalláncoknál (52/2. ábra).

Összevetve a különböző tau fragmensek nikkel(II)ionok megkötésére mutatott affinitását (53/1. *ábra*), látható, hogy széles pH-tartományban (pH ~ 5,5-9,5) gyakorlatilag csak a HAVAHHH-NH<sub>2</sub> ligandum fémkomplexei vannak jelen. Ez arra enged következtetni, hogy a fiziológiás pH-tartományban a fémion "hisztaminszerű" koordinációja preferált. A nikkel(II)komplexek kiugró stabilitásához – a réz(II)komplexekhez hasonlóan – feltehetően a C-terminális imidazolgyűrűk koordinálódásának stabilizáló hatása is hozzájárul. A predominancia görbe alapján erősen bázikus oldatban (pH > 9,5) a fent említett preferencia már nem figyelhető meg. A HAVAHHH-NH2 ligandum esetén a pH növelésével a deprotonálódott peptidnitrogének kiszorítják az N-terminális imidazolnitrogént a fémion koordinációs szférájából és többségében [NH<sub>2</sub>, (N<sup>-</sup>)<sub>x</sub>] kötésmódot tartalmazó részecskék képződnek. Ugyanakkor, az amidkoordinációjú komplexekben a fémion számára a tiolátkénatom erősebb horgonydonor a terminális aminonitrogénnél, melynek eredményeként a tau(320-333) ligandum nikkel(II)komplexei kerülnek túlsúlyba.



Az 53/2. ábra jól szemlélteti, hogy a fiziológiás pH-tartományban a **cink(II)ionok** számára a legkedvezőbb kötésmódot a vegyes S,Ndonoratomok által biztosított tetraéderes koordinációs környezet – vagyis a cisztein mellett három szomszédos hisztidil-oldalláncot tartalmazó tau(320-333)mH peptid – jelenti, de a tau(320-333), valamint a HAVAHHH-NH<sub>2</sub> ligandum is igen hatékony a fémion megkötésében. Ez arra utal, hogy a cink(II)ionok számára mind a cisztein tiolátkénatomján keresztüli, mind pedig a "hisztaminszerű" kötésmód kedvező, különösen, ha azt egyéb donorcsoportok – jelen esetben hisztidin imidazol-nitrogénatomok – kiegészítő koordinációja is támogatja. Bázikus oldatban az amidnitrogének 5.6. A *tau*(326-333) KL ligandum komplexképződési és potenciális inhibíciós sajátságai

deprotonálódásával képződő,  $[(N^{-})_x, N(Im)]$  koordinációs módú cink(II)komplexek válnak a fő részecskékké.

# 5.6. A *tau*(326-333) KL ligandum komplexképződési és potenciális inhibíciós sajátságai

Az AK egyik jellegzetes tünete az  $A\beta$ -ból álló szenilis plakkok megjelenése az agyban. Az aggregációs folyamat lejátszódásában kulcsfontosságú szerepet tulajdonítanak a fehérje egy rövid pentapeptid fragmensének, a -KLVFF- szekvenciának ( $A\beta(16-20)$ ). 1996-ban Lars O. Tjernberg és munkatársai felfedezték, hogy a -KLVFF- szekvenciát tartalmazó kisméretű peptidek képesek lehetnek a teljes hosszúságú  $A\beta$  fehérjéhez kötődve megakadályozni annak szálakká történő összekapcsolódását [224]. A pentapeptid alaninnal szubsztituált származékainak vizsgálata bebizonyította, hogy az első (Lys16), második (Leu17) és ötödik aminosavak (Phe20) kulcsfontosságú szerepet játszanak a ligandum amiloid β-hoz való kötődésében és az amiloidszálak kialakulásának gátlásában. Egy 2005-ös közleményben a szerző az inhibíciót egyrészt az aromás oldalláncok közötti molekuláris felismeréssel, másrészt a lizin pozitív töltésű ammóniumcsoportjának elektrosztatikus taszító hatásával magyarázta [225]. Az AK kezelésének egyik irányvonalát az  $A\beta$  és a tau proteinek aggregációját gátló szerek kifejlesztése jelenti [226,227]. Mára elfogadottá vált, hogy az olyan létfontosságú fémionok mint a réz(II) vagy cink(II) hozzájárulhatnak a fehérjelerakódások kialakulásához, így gyógyszerekként ígéretesek lehetnek az olyan többfunkciós, peptid alapú ligandumok, melyek a fémionok megkötésén kívül képesek a szálképződést is gátolni [228]. Az általunk vizsgált tau(326-333) KL ligandum (Ac-GNIHHKPGKLVFF-NH2) Cterminális –KLVFF– szekvenciája alkalmas lehet az  $A\beta$  szálképzési folyamatainak gátlására, míg a -GNIHHKPG- rész a korábbi vizsgálataink alapján termodinamikailag stabil komplexeket képez mind a réz(II)-, mind pedig a cink(II)ionokkal, így potenciálisan alkalmas lehet arra, hogy az említett fémionok megkötése révén, gátolja az  $A\beta$  aggregációs folyamatait. Az inhibíciós vizsgálatokkal párhuzamosan azt is tanulmányoztuk, hogy a -KLVFF- peptidrészlet kapcsolása miként befolyásolja az tau(326-333) ligandum korábban megismert komplexképződési folyamatait.

A hidrofób –KLVFF– láncot tartalmazó fragmens vízoldékonysága kicsi, így oldatfázisban lejátszódó komplexképződési folyamatai csak oldószerelegyben tanulmányozhatók. Oldékonysági vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a peptid 70% (V/V) DMSO-víz elegyében oldódik. Az Ac-GNIHHKPGKLVFF-NH<sub>2</sub> ligandum mellett a natív *tau*(326-333) fragmens oldószerelegyben lejátszódó komplexképződési folyamatait is vizsgáltuk, ily módon az oldószercsere hatását is tanulmányozhattuk. 5.6. A *tau*(326-333) KL ligandum komplexképződési és potenciális inhibíciós sajátságai

A vizsgált ligandumok három, illetve négy protonfelvételre és -leadásra képes donorcsoportot tartalmaznak: két hisztidin imidazólium- és egy, illetve kettő lizin ammóniumcsoportot. A peptidek protonálódási és deprotonálódási állandóit a 24. táblázat tartalmazza. Összehasonlításként különböző tau fragmensek vizes közegben, valamint oldószerelegyben meghatározott megfelelő értékeit is feltüntettem. A tau(26-33) és tau(326-333) peptidfragmensek esetén a hisztidin imidazóliumgyűrűjének deprotonálódásához rendelhető állandók az oldószerelegyben megközelítőleg 0,5-1 logaritmus egységgel kisebbnek adódtak a vizes közegben meghatározott pK értékeknél. Hasonló tendenciát vehetünk észre, ha a lizil-oldalláncok deprotonálódásához tartozó állandókat hasonlítjuk össze. Ugyanakkor az is megfigyelhető, hogy a hidrofób –KLVFF– egység kapcsolása nem okoz jelentős változást a pK értékekben, így ezt a jelenséget az oldószercsere hatásának tulajdoníthatjuk. Összevetve a 24. táblázat adatait láthatjuk, hogy ha a protonvesztés negatív töltésű részecske kialakulását eredményezi, a deprotonálódási folyamatok a nagyobb pH-tartományba tolódnak el és jelentős növekedés tapasztalható a pK értékben a vizes rendszerben meghatározott deprotonálódási állandóhoz képest. Ezzel szemben, ha pozitív töltésű részecske deprotonálódik, akkor a kisebb dielektromos állandójú dimetil-szulfoxid jelenlétében a pK érték csökkenése figyelhető meg. Feltételezhetjük, hogy mivel a DMSO a töltés nélküli részecskéket erősebben képes szolvatálni a töltötteknél, az első esetben kedvezőtlenebbé válik a deprotonálódási folyamat és az oldószer relatív permittivitásának csökkenésével a semleges formák pK értéke megnő. míg a pozitív töltésű részecskék protonvesztése könnyebben megy végbe és a kationos formák deprotonálódási állandója csökken [229]. Szembeötlő lehet, hogy az Ac-EVMEDHAGKLVFF-NH2 (tau(9-16) KL) ligandum hisztidiloldalláncának deprotonálódására az oldószerelegyben meghatározott érték közel egy logaritmus egységgel nagyobb a vizes rendszerben számítotthoz képest. Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy ezen peptid esetén a semleges rész deprotonálódása a második glutaminsav karboxilcsoportjának protonvesztéséhez rendelhető (H<sub>3</sub>L  $\rightarrow$  H<sub>2</sub>L<sup>-</sup>), így – az előbb ismertetett jelenségnek megfelelően – jelentősen megnő az ehhez a lépéshez tartozó pK érték, ami a további deprotonálódási folyamatokat a nagyobb pH-tartományba tolja.
24. táblázat: A –KLVFF– szekvenciát tartalmazó és a natív tau(326-333) fragmens protonálódási (log  $\beta$ ) és deprotonálódási (pK) állandói (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

Részecske	tau(326 -333) (H <sub>2</sub> O)	tau(326- 333)	tau(326- 333) KL	tau(9-16) (H <sub>2</sub> O) [2]	tau(9-16) KL	tau(26-33) (H <sub>2</sub> O) [2]	tau(26-33)	tau(26-33) KL
[HL]	10,17	9,60(10)	10,38(3)	6,70	10,46	9,48	12,03	12,34
$[H_2L]$	16,88	15,50(10)	19,94(4)	11,38	18,10	15,50	17,63	22,03
$[H_3L]$	22,69	20,30(10)	26,05(5)	15,52	24,54	_	_	37,42
$[H_4L]$	_	—	30,90(7)	18,93	30,32	-	-	—
$[H_5L]$	—	—	_	_	35,06	_	—	_
p <i>K</i> (Asp– COOH)	_	_	_	3,41	3,41	_	_	_
p <i>K</i> (Glu <sub>1</sub> – COOH)	_	_	_	4,14	5,78	-	-	_
p <i>K</i> (Glu <sub>2</sub> – COOH)	-	_	_	4,68	6,44	_	_	_
$pK(N_{Im(1)}-NH^{+})$	5,81	4,80	4,85	6,70	7,64	6,02	5,60	5,39
$pK(N_{Im(2)}-NH^+)$	6,71	5,90	6,11	_	_	_	_	—
pK (Lys <sub>1</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	10,17	9,60	9,56	_	10,46	_	_	9,69
pK (Lys <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	_	_	10,38	_	_	_	_	_
pK (Tyr-OH)	_	_	_	_	_	9,48	12,03	12,34

5.6. A *tau*(326-333) KL ligandum komplexképződési és potenciális inhibíciós sajátságai

#### 5.6.1. A tau(326-333) KL ligandum réz(II)komplexei

A natív *tau*(326-333) és az Ac-GNIHHKPGKLVFF-NH<sub>2</sub> szekvenciájú ligandumok komplexképződési folyamatait ekvimoláris oldatban vizsgáltam. A képződő 1:1 sztöchiometriájú réz(II)komplexek stabilitási állandóit a 25. *táblázatban* foglaltam össze. A táblázat összehasonlításként a natív fragmens egymagvú komplexeinek vizes közegben meghatározott állandóit is tartalmazza.

25. táblázat: A –KLVFF– szekvenciát tartalmazó és a natív tau(326-333) fragmens réz(II)komplexeinek stabilitási állandói (log  $\beta$ ) (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

Részecske	tau(326-333) (H <sub>2</sub> O)	tau(326-333)	tau(326-333) KL
[CuH <sub>3</sub> L]	—	_	29,60(8)
[CuH <sub>2</sub> L]	20,22	19,06(9)	25,63(2)
[CuHL]	15,81	14,23(6)	19,37(4)
[CuL]	9,49	7,32(7)	11,87(4)
[CuH <sub>-1</sub> L]	2,66	-0,93(8)	2,89(5)
[CuH <sub>-2</sub> L]	-5,50	-10,67(8)	-6,84(5)
[CuH <sub>-3</sub> L]	-15,12	-21,35(9)	-17,43(4)
$pK(amid_1)$	6,32	6,91	6,26
$pK(amid_2)$	6,83	8,25	7,50
$pK(amid_3)$	8,16	9,74	8,98
$pK(Lys_1-NH_3^+)$	9,62	10,68	9,73
$pK(Lys_2-NH_3^+)$	—	—	10,59
$\log K(Cu+N_{Im})$	3,34	3,56	3,55
$\log K(Cu+2N_{Im})$	5,64	4,63	5,69

A natív *tau*(326-333) ligandum esetén DMSO-víz oldószerelegyben lejátszódó komplexképződés és a vizes rendszerben végbemenő folyamatok hasonló képet mutatnak (vö. 12. és 54/1. ábrákat). Savas közegben a réz(II)ion az oldalláncbeli imidazolilcsoporto(ko)n keresztül koordinálódik, majd a pH növelésével deprotonálódó peptidnitrogének telítik a fémion koordinációs szféráját és erősen bázikus oldatban kialakulnak az [N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] kötésmódot tartalmazó teljesen deprotonálódásának pH-tartományára az oldószercsere nincs jelentős hatással, addig a második és harmadik peptid-NH csoport protonvesztése a nagyobb pH-tartományba tolódik el a vizes rendszerben számított értékekhez képest. Ezt feltehetően a szolvatációs viszonyok megváltozása okozza.

5.6. A *tau*(326-333) KL ligandum komplexképződési és potenciális inhibíciós sajátságai



A 25. táblázat adataiból és a részecskeeloszlási diagramokból (54/1,2. ábrák) kitűnik, hogy az amidnitrogének deprotonálódása mind a natív, mind a –KLVFF– peptidrészletet tartalmazó ligandumok réz(II)komplexeiben különálló lépésekben játszódik le, habár a peptidnitrogének protonvesztésének pH-ja eltér. A Cu(II)–tau(326-333) = 1:1 rendszer oldószerelegyben meghatározott pK(amid) értékei ~ 0,4-1 logaritmus egységgel nagyobbak a –KLVFF– végződést tartalmazó ligandum esetén számítottaktól. A tau(326-333) KL peptid egy extra lizil-oldalláncot tartalmaz a natív szekvenciához képest, aminek következtében az azonos koordinációs módú komplexeknek különböző a töltése, ami hozzájárulhat a pK értékekben tapasztalt eltéréshez. A teljesen deprotonált komplexekhez rendelhető, ~ 525-530 nm-es



hullámhossz négy nitrogén donoratom kötődéséutal, alátámasztva, re hogy bázikus oldatban mindkét ligandummal  $[N^{-}, N^{-}, N^{-},$ N⁻. N(Im)] koordinációs módú részecskék keletkeznek, és megerősíti, hogy a liziloldallánc(ok) ammóniumcsoportja az oldószerelegyben képződő komplexekben sem vesz részt a fémion megkötésében. Az azonos kötésmódot

tartalmazó részecskék vizes közegben és oldószerelegyben rögzített CDspektrumainak alakja és spektrális paraméterei hasonlók (ld. *Függelék, T2. táblázat*). A hasonlóság különösen szembeötlő az erősen bázikus közegben 5.6. A *tau*(326-333) KL ligandum komplexképződési és potenciális inhibíciós sajátságai

képződő, három amid- és egy hisztidin imidazol-nitrogénatom által koordinált 4N-es komplexek esetén (55. ábra), hiszen nemcsak a görbék lefutása, de gyakorlatilag a Cotton-effektusok helyzete is megegyezik. Ebből arra következtethetünk, hogy – legalábbis az általunk vizsgált koncentráció-tartományban – a komplexek képződésében mindkét vizsgált peptid esetén ugyanazok a donorcsoportok vesznek részt mind vizes oldatban, mind pedig DMSO-víz oldószerelegyben. Azonos koordinációs módú részecskék alakulnak ki, melyek kötésmódjára sem az eltérő oldószer, sem pedig a hidrofób –KLVFF– peptidrészlet jelenléte nincs jelentős hatással.

#### 5.6.2. A *tau*(326-333) KL peptid potenciális aggregációt gátló tulajdonságának vizsgálata

A koordinációs kémiai viselkedés mellett a -KLVFF- szekvenciát tartal-

mazó peptid aggregációs, illetve potenciális aggregációt gátló sajátságait is vizsgáltam. Ahogy az 56. *ábra* szemlélteti, a *tau(326-333) KL* ligandum még 24 óra elteltével sem képez fehérjeaggregátumokat, amiből arra kö-



vetkeztethetünk, hogy a peptid nem hajlamos szálképzésre.

Az  $A\beta$  és tau származékokat különböző arányban tartalmazó minták ( $A\beta$ :tau = 1:1, 2:1 és 4:1) vizsgálata lehetővé tette a *tau*(326-333) KL ligandum  $A\beta(1-42)$  szálképződési folyamataira gyakorolt hatásának tanulmányozását. Az 57. *ábrán* bemutatott kinetikai görbékből látható, hogy a tau származék

jelenléte gyakorlatilag semmilyen hatást nem gyakorol a négyszeres feleslegben alkalmazott  $A\beta(1-42)$  aggregációs folyamataira. Ugyanakkor, abban az esetben, ha a tau(326-333) KL szár-

mazék nagyobb koncentrációban van jelen  $(A\beta:tau = 2:1 \text{ és } 1:1),$ a fluoreszcencia –



még ha csekély mértékben is, de – csökken, ami az amiloid-aggregátumok mennyiségének kismértékű csökkenésére utal.

# 5.7. A –TMH– szekvenciát tartalmazó peptidek mint potenciális réz(II)kelátorok

A többfunkciós peptidszármazékok mellett azok a gyógyszerek is érdeklődésre tarthatnak számot, melyek képesek a fehérjeaggregátumokban felhalmozódott fémionok (pl. Cu(II)) megkötésére és eltávolítására. A különböző tau peptidfragmensek vizsgálata során megállapítottuk, hogy a -TMH- szekvencia különösen hatékony a réz(II)ionok megkötésében. A klinikai gyakorlatban alkalmazott kelátorok általában kisméretű molekulák. melyek nagy affinitással képesek bizonyos fémionok megkötésére. Ideális esetben ezek a készítmények meglehetősen szelektívek, így alkalmazásuk nem okoz zavart a szervezet fémionhomeosztázisában. Előkísérletek segítségével, in vitro körülmények között vizsgáltam az említett peptidrészlet fémionkötő-képességét modellező Ac-ATMHQD-NH2 peptid potenciális kelációs képességeit a szintén jó fémionkötő-affinitással rendelkező tau(326-333)mA ligandum jelenlétében. A tau(326-333)mA és az Ac-ATMHQD-NH2 oligopeptidek fiziológiás pH-tartományban kialakuló réz(II)komplexeinek CD-spektruma jól megkülönböztethető. Ezt kihasználva megállapíthatjuk, hogy a két peptidet és a réz(II)iont egyaránt tartalmazó rendszerben melyik ligandum fémkomplexei alakulnak ki. Emellett azt is vizsgáltam, hogy a réz(II)-tau(326-333)mA rendszerhez (pH ~ 7) adva az Ac-ATMHQD-NH<sub>2</sub> ~ 7-es pH-jú oldatát, az képes-e elvonni a réz(II)iont a másik peptiddel alkotott komplexből.



Az 58/1. ábra jól szemlélteti, hogy ha mindkét származék jelen van, akkor elsősorban a –TMH– szekvenciájú hexapeptid réz(II)komplexei alakulnak ki,

és a CD-spektrumok alakja 60 perc elteltével sem változik. Ez arra utal, hogy a másik ligandum nem képes elvonni a réz(II)iont az Ac-ATMHQD-NH2 peptid fémkomplexéből. Ahogy az 58/2. ábra bemutatja, a réz(II)-tau(326-333)mA rendszerhez adva a másik ligandum oldatát, a CD-görbe alakja megváltozik és lefutása a Cu(II)-Ac-ATMHQD-NH $_2$  = 1:1 rendszerben spektrum alakjához válik hasonlóvá. Ebből egyrészt rögzített arra következtethetünk, hogy a hexapeptid képes a két hisztidil-oldalláncot tartalmazó származékot kiszorítani a réz(II)-tau(326-333)mA részecskéből és helyettesíteni azt. Továbbá az, hogy a spektrum lefutása az idő múlásával sem változik, arra utal, hogy a –TMH– szekvenciát tartalmazó ligandum nagy stabilitású komplex formájában, szelektíven köti a fémiont. A két peptid réz(II)ionkötő képessége közötti különbség jól tükröződik azok több mint 1 logaritmus egységbeli pCu(II) értékének eltérésében is: pCu(II)<sub>Ac-ATMHOD-NH2</sub> = 9,72; illetve pCu(II)<sub>tau(326-333)mA</sub> = 8,48.

## 6. Összefoglalás

Doktori értekezésemben az Alzheimer-kórban és egyéb taupátiákban szerepet játszó tau fehérje peptidfragmenseinek fémionmegkötő sajátságait tanulmányoztam réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionok jelenlétében. A protein számos potenciális horgonycsoporttal rendelkezik – többek között tizenkét hisztidil- és két ciszteinil-oldalláncot tartalmaz –, ugyanakkor az egyes fémionok molekulán belüli elsődleges kötőhelyét a mai napig nem ismerjük, ahogy a betegségek kialakulásának molekuláris háttere is tisztázásra vár.

Kutatómunkám egyik célkitűzése az R3 régió két szomszédos hisztidiloldallánca (His329-His330) fémionmegkötő képességét modellező tau(326-333) ligandum és származékai vizsgálata volt. A natív oktapeptid glicint (tau(326-333)mG) és egy hisztidint tartalmazó pontmutánsainak (tau(326-333)mGH, tau(326-333)mGA) tanulmányozása lehetővé tette, hogy az azonos összetételű, de eltérő hisztidil-oldalláncokról kiinduló amidkoordinációval kialakuló komplexeket CD-spektrumaik alapján megkülönböztessük. Ezáltal a képződő koordinációs izomerszerkeztek aránvát is megbecsülhettük. Megállapítottuk, hogy a két hisztidint tartalmazó származékok réz(II)komplexei közel 1:1 arányban képződnek a 329-es és 330-as pozíciójú imidazolilcsoportról induló amidkoordinációval, míg nikkel(II)ionok esetén mintegy 95%-ban a His330 az elsődleges horgonycsoport nagy pH-n. Az alanint tartalmazó tau(326-333)mA peptid lehetővé tette a "lánctörő" szerepéről ismert prolin komplexképződési folyamatokra gyakorolt hatásának tanulmányozását. Valamennyi két hisztidil-oldalláncot tartalmazó származék esetén képződnek kétmagvú,  $[(N^{-})_x, N(Im)] + [N(Im), (N^{-})_x]$  kötésmódot tartalmazó réz(II)komplexek. Ez arra utal, hogy a prolin jelenléte nem akadályozza meg a peptidnitrogének deprotonálódását, habár a keletkező komplexek sztöchiometriájára hatással van. A prolil-oldalláncot tartalmazó ligandumok esetén legfeljebb négy, míg az alanint tartalmazó származék esetén maximálisan hat amidnitrogén deprotonálódhat és koordinálódhat a fémionokhoz. Nikkel(II)ionok jelenlétében mind az egy, mind pedig a két imidazolilcsoportot tartalmazó peptidekkel csak egymagvú részecskék alakulnak ki. Dinukleáris komplexek képződésével cink(II)ionok jelenlétében sem kell számolnunk. Az egy hisztidint tartalmazó származékok esetén semleges oldatban bekövetkezik a fémion hidrolízise, míg a szomszédos imidazolilcsoportokat tartalmazó ligandumokkal hidrolitikus folyamatok lejátszódását nem tapasztaltuk: a tömegspektrometriás vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a pH növelésével amidkoordinációjú, egymagvú cink(II)komplexek alakulnak ki.

További célom volt a szomszédos imidazolil-oldalláncokat és tiolátcsoportot is tartalmazó **tau(320-333)** és származéka (tau(320-333)mH) oldategyensúlyi viselkedésének tanulmányozása, elsősorban cink(II)ionok jelenlétében. A

hosszabb fragmens vizsgálatán keresztül egyrészt a valóshoz közelebbi képet kaptunk a cink(II)ion (valamint nikkel(II)) és a tau fehérje között kialakuló kölcsönhatásokról, másrészt a ligandumok lehetővé tették a hisztidin kötőhelyek, valamint a cisztein tiolátcsoport fémionaffinitásának összehasonlítását. Savas-semleges oldatban a nikkel(II)ion a peptidek oldalláncain keresztül koordinálódik a tau(320-333) származékokhoz. A pH növelésével koordinációs izomerszerkezetek alakulnak ki: ~ 70%-ban olyan komplexek keletkeznek, melyekben a fémion a cisztein tiolátcsoportján és a deprotonálódott amidnitrogéneken keresztül kötődik. Ebből arra következtethetünk, hogy a ciszteinil-oldallánc mind két, mind pedig három imidazolilcsoport jelenlétében kedvezőbb kötőhelyet jelent a nikkel(II)ion számára a szomszédos hisztidineknél. Fémionfelesleg alkalmazása mellett kétmagvú részecskék képződnek: egy nikkel(II) az N-terminális -SKCG- szekvencia tiolátkénatomjához kötődik, míg a másik fémion a hisztidil-oldalláncok valamelvikén keresztül koordinálódik. Cink(II)ionokat tartalmazó oldatban a nagy stabilitású, [ZnH<sub>2</sub>L]<sup>4+</sup> összetételű komplex az uralkodó részecske a fiziológiás pH-tartományban: a fémion megkötésében feltehetően valamennyi oldallánc részt vesz, vagyis a cink(II) vegyes S,N-donoratomok által kialakított koordinációs környezetben található. Az amidnitrogének valószínűleg nem képesek kiszorítani a cisztein tiolátkénatomot a fémion koordinációs szférájából, és bázikus oldatban a peptidnitrogének deprotonálódása helyett hidrolitikus folyamatok játszódnak le. A két fémiont egvüttesen tartalmazó rendszerben vegyes Ni(II)/Zn(II)-komplexek képződnek, melyekben a nikkel(II) a cisztein tiolátkénatomján, míg a cink(II) a szomszédos imidazolil-oldalláncok egyikén keresztül koordinálódik.

Az értekezés további célkitűzése volt a különböző kémiai környezetben található horgonycsoportok fémionmegkötő-képességének összehasonlítása, illetve az egyes kötőhelyek szelektivitásának tanulmányozása. Ennek érdekében vizsgáltam a His329-His330 hisztidinek mellett, a korábbi eredmények alapján kitűnő réz(II)kötő képességgel rendelkező –TMH– szekvenciát tartalmazó tau(30-34)(327-332) ligandum komplexképződési folyamatait. A kiméra peptiden kívül a "hisztaminszerű" kötésmódra lehetőséget biztosító HAVAHHH-NH<sub>2</sub> heptapeptid oldategyensúlyi viselkedését is tanulmányoztam.

Savas oldatban a *tau(30-34)(327-332)* ligandum három hisztidinje közül a 330-as pozíciójú imidazolilcsoport mutatja a legnagyobb affinitást a réz(II)ion megkötésére. Az amidnitrogének koordinációban való részvételével feltehetően megváltozik a His32 és a His329-His330 imidazolil-oldalláncok körüli kötőhely fémionaffinitása és a preferencia a pH növelésével a –TMH– szekvenciára tevődik át. Fiziológiás és bázikus oldatban a His32 kémiai környezetét modellező hisztidil-oldallánc jelenti az elsődleges horgonycsoportot (~ 80%) a réz(II) számára. Fémionfelesleg alkalmazása esetén vala-

mennyi hisztidin elkülönült kötőhellyé válik: az imidazolés а deprotonálódott peptidnitrogének részvételével kétés hárommagvú komplexek alakulnak ki, bizonvítva a kiméra peptid réz(II)ionok megkötésére mutatott nagy affinitását. Cink(II) jelenlétében a fiziológiás pH-tartományban uralkodó, nagy stabilitású [ZnHL]<sup>2+</sup> komplexben a fémion feltehetően mindhárom imidazolilcsoporton keresztül kötődik makrokelát szerkezetet kialakítva, de nem zárható ki az aszparaginsav karboxilátcsoportjának koordinációban való részvétele sem. A pH növelésével bekövetkezik a peptidnitrogének deprotonálódása és koordinálódása, melyhez – a cink(II)– tau(326-333) rendszerhez hasonlóan – vélhetően a szomszédos hisztidinek valamelyike szolgál horgonycsoportként. Az egy fémiont tartalmazó törzsrendszerek eredményeivel összhangban, a vegyes Cu(II)/Zn(II)-tartalmú mintákban is az N-terminális hisztidil-oldallánc jelenti az elsődleges horgonycsoportot a réz(II) számára a fiziológiás pH-tartományban, a cink(II)ionok pedig a karboxiterminus két szomszédos hisztidinjének valamelyikéhez kötődnek. Ezen eredmények összhangban vannak azzal az irodalomból ismert feltételezéssel, miszerint a cink(II)ionok mikrotubuluskötő régióhoz való koordinációja elősegítheti a tau fehérje aggregációs folyamatainak lejátszódását [176,179,230,231].

A savas oldatban kialakuló komplexekben a HAVAHHH-NH<sub>2</sub> ligandum aminocsoportja és a szomszédos hisztidin imidazol-N-terminális nitrogénatomja jelenti az elsődleges kötőhelyet mindhárom vizsgált átmenetifémion számára. A "hisztaminszerű" kötésmódot feltehetően a Cterminális imidazolil-oldalláncok koordinációja egészíti ki, növelve a képződő részecskék termodinamikai stabilitását. Cink(II)ionok esetén még a négy vagy öt donorcsoport részvételével kialakuló nagy stabilitású makrokelát szerkezet sem képes megakadályozni a fémion bázikus oldatban bekövetkező hidrolízisét. Ezzel szemben a réz(II)- és nikkel(II)ionokat tartalmazó mintákban az oldat pH-jának növelése az amidnitrogének fémionindukált deprotonálódását eredményezi. A képződő komplexekben a terminális amino- és szomszédos imidazolilcsoport mellett a közbenső hisztidinek is betölthetik a horgonycsoport szerepét, melynek eredményeként koordinációs izomerszerkezetek alakulnak ki. Erősen bázikus közegben a réz(II)iont az N-, illetve a C-terminális részen kötő izomerek aránya megközelítőleg 1:1, míg a nikkel(II) számára az aminonitrogén egyértelműen jobb kötőhelyet jelent a -HHH- szekvenciánál. A -HH(H)- peptidrész mellett egy másik nagy affinitású kötőhelyet tartalmazó, tau(320-333) peptidszármazékok vizsgálata során is hasonló preferenciát tapasztaltunk. Ezen eredmények arra utalnak, hogy ha a szomszédos hisztidinek mellett egy másik horgonydonor is elérhető a fémion számára, akkor többségében olyan koordinációs izomerek alakulnak ki, melyekben a nikkel(II)ion ezen másik oldalláncon keresztül koordinálódik. A preferenciához - legalább részben - hozzájárulhat, hogy a koordinációban nem érintett, nagy térkitöltésű imidazolgyűrűk meglehetősen zsúfolt koordinációs környezetet alakítanak ki a fémion körül, így a másik horgonycsoporton keresztüli kötődés sztérikusan kedvezőbb a nikkel(II) számára. Fémionfelesleg alkalmazása mellett kétmagvú réz(II)- és nikkel(II)komplexek is kialakulnak, habár képződésük pH-tartománya eltér. Ha a két fémion egyaránt jelen van, a képződő részecskékben mind az N-, mind a C-terminális vég kötőhelyül szolgálhat mindkét fémion számára, továbbá az azonos fémionok koordinációja is megvalósulhat, így a háromkomponensű rendszerben a vegyes Cu(II)/Ni(II)-komplexek mellett nagyszámú koordinációs izomerszerkezet kialakulásával kell számolnunk.

A **ligandumok fémionkötő affinitását összehasonlítva** megállapítható, hogy a vizsgált fémionok közül réz(II)ionokkal alakulnak ki a legnagyobb stabilitású fémkomplexek. Az N-terminálisan szabad, illetve védett aminoterminusú peptidek komplexeit összehasonlítva, a fiziológiás pHtartományban egyértelműen a fémion "hisztaminszerű" koordinációja a kedvezményezett kötésmód mind réz(II)-, mind pedig nikkel(II)ionok esetén.

	Preferált kötőhely		
	fiziológiás pH	bázikus oldat	
Cu(II)	[NH <sub>2</sub> , N(Im)] (-HHH- szekvencia kiegészítő koordinációja)	–TMH– szekvencia: [3N <sup>–</sup> , N(Im)]	
Ni(II)	[NH <sub>2</sub> , N(Im)] (-HHH- szekvencia kiegészítő koordinációja)	Cys S: [3N⁻, S⁻]	
Zn(II)	vegyes S,N-donorok: [3N(Im), S <sup>-</sup> ]	His N(Im): [3N <sup>-</sup> , N(Im)]	

26. táblázat: A vizsgált ligandumok legkedvezőbb kötőhelye fiziológiás pH-n és bázikus oldatban

Ugyanakkor mind a vizsgált terminálisan szabad, mind a védett aminoterminusú peptidekben a C-terminális, illetve láncközi hisztidinek imidazolgyűrűi horgonycsoportként viselkedve lehetővé teszik  $[(N^-)_x, N(Im)]$ -koordinált komplexek kialakulását. Ezekben a részecskékben a réz(II) számára a –TMH– szekvencia, míg a nikkel(II) számára a cisztein tiolátcsoportja biztosítja a legkedvezőbb koordinációs környezetet. Cink(II)ionok jelenlétében a "hisztaminszerű" kötésmód mellett a cisztein tiolátcsoportján keresztüli koordináció is kedvező, de a legnagyobb stabilitású komplexek a *tau(320-333)mH* ligandummal alakulnak ki, melyben a fémion vegyes S,Ndonoratomok által meghatározott tetraéderes koordinációs környezetben található (26. táblázat). Bázikus oldatban a peptidnitrogének deprotonálódásával képződő, amidkoordinált cink(II)komplexek válnak a fő részecskékké.

Mára elfogadottá vált, hogy az esszenciális fémionok homeosztázisának zavara hozzájárulhat a neurodegeneratív betegségek kialakulásához. A kezelések egyik irányvonalát olyan gyógyszerkészítmények kifejlesztése jelenti, melyek a fémionok megkötésén kívül képesek gátolni az aggregációban érintett fehérjék (pl.  $A\beta$ , tau) szálképzési folyamatait. *Ennek szellemében vizsgáltam a tau*(326-333) KL ligandum  $A\beta(1-42)$  aggregációjára gyakorolt hatását, valamint a peptid DMSO-víz oldószerelegyben, réz(II)ionok jelenlétében lejátszódó komplexképződési folyamatait. Megállapítottuk, hogy – az általunk vizsgált koncentrációtartományban – mind vizes oldatban, mind pedig oldószerelegyben – azonos koordinációs módú komplexek alakulnak ki, a részecskék kötésmódjára sem az oldószercsere, sem pedig a hidrofób –KLVFF– peptidrészlet jelenléte nincs jelentős hatással. Megfigyeltük, hogy habár a *tau*(326-333) KL ligandum nem hajlamos szálképzésre, ugyanakkor az inhibíciós vizsgálatok alapján az  $A\beta(1-42)$  aggregációs folyamatait csak kismértékben gátolja.

Az előbb említett többfunkciós peptidszármazékok mellett azok a gyógyszerek is érdeklődésre tarthatnak számot, melyek képesek а fehérjeaggregátumokban felhalmozódott fémionok megkötésére és eltávolítására. A különböző tau peptidfragmensek vizsgálata a -TMH- szekvencia kitűnő réz(II)ionkötő képességére utal. Előkísérletek segítségével, in vitro körülmények között vizsgáltam az említett peptidrészletet modellező Ac-ATMHQD-NH<sub>2</sub> peptid potenciális kelációs képességeit a szintén jó fémionkötő affinitással rendelkező tau(326-333)mA származék jelenlétében. Megállapítottuk, hogy ha a két ligandum egyidejűleg van jelen, akkor a -TMH- szekvenciájú hexapeptid réz(II)komplexei alakulnak ki, és a tau(326-333)mA nem képes elvonni a fémiont az Ac-ATMHQD-NH<sub>2</sub> peptid fémkomplexéből. Ezzel szemben a hexapeptid képes a két hisztidiloldalláncot tartalmazó származékot kiszorítani a réz(II)-tau(326-333)mA részecskéből és azt helyettesítve, nagy stabilitású komplex formájában szelektíven kötni a fémiont. Említést érdemel, hogy a tau(26-33) ligandum és mutánsai lényegesen kisebb stabilitású komplexeket képeznek a - szintén esszenciális – cink(II)ionokkal, vagyis a –TMH– részletet tartalmazó kis tagszámú peptidek megfelelhetnek a kelátorokkal szemben támasztott szelektivitási követelményeknek is. Ugyanakkor ennek igazolására további, elsősorban biológiai és biokémiai vizsgálatok szükségesek.

#### 7. Summary

The aim of my work during the years of PhD was the study of copper(II), nickel(II) and zinc(II) binding ability of various tau peptide fragments. The role of tau in Alzheimer's disease and other tauopathies has been unambiguously proved by numerous research groups and publications. The protein contains several potential anchoring sites, such as twelve histidyl and two cysteinyl groups, however, the main binding site of the aforementioned metal ions of the molecule has not been clarified, yet. The molecular background of the neurodegenerative disorders also has to be elucidated.

The complex formation processes of the tau(326-333) fragment and its mutants were studied in order to gain information about the metal binding affinity of the neighbouring histidines derived from the R3 domain of the protein. Based on the CD spectroscopic properties of the glycine residue, the tau(326-333)mG derivative and its one-histidine mutants (tau(326-333)mGA and tau(326-333)mGH can be used to estimate the ratio of the coordination isomer species formed in equimolar solution. Studies of the glycil mutated ligands revealed that both histidyl residues can be anchoring sites for copper(II) binding and the two isomers are present in an almost equal ratio, while in the case of nickel(II) the His330 imidazole nitrogen is the main donor group at high pH. The secondary amine proline is a well-known "breakpoint" for amide coordination, thus the tau(326-333)mA mutated peptide that contains an alanine instead of proline was used to study the effect of the prolyl residue on the complex formation processes. The two histidines are independent copper(II) binding sites in the dinuclear complexes in which the metal ions are bound by imidazole and amide nitrogen donor atoms ( $[(N_x, N(Im)] + [N(Im), (N_x]]$  coordination mode). Our studies suggest that the proline in the peptide chain does not prevent the amide coordination toward the C-termini, although it affects the stoichiometry of the complexes. The presence of the prolyl residue results in the deprotonation of only one amide group toward the C-termini as a maximum, while the absence of proline enables the coordination of three peptide nitrogen atoms to both copper(II) ions. All tau(326-333) derivatives can bind only one nickel(II) ion resulting in the formation of mononuclear species at all studied metal to ligand ratios. The exclusive binding of the sole imidazole nitrogen of the one-histidine peptides cannot prevent the hydrolysis of zinc(II) in neutral solution but ESI-MS studies suggest that the adjacent histidine moieties of the R3 domain might promote the formation of amide coordinated mononuclear zinc(II) complexes.

The solution equilibrium properties of the tau(320-333) and its mutant (tau(320-333)mH) were also investigated in the presence of nickel(II) and zinc(II) ions. Studies of the longer peptide fragments containing one cysteinyl

and two (or three) histidyl residues provided a more realistic picture of the interaction of tau with the metal ions. The ligands also enabled us to compare the metal binding affinity of the thiolate and the neighbouring imidazole groups. Nickel(II) ions are coordinated by the side chain donor groups of the tau(326-333) derivatives in acidic and neutral samples. The increase of pH results in the formation of coordination isomers in which the metal ion is predominantly bound to the thiolate moiety and deprotonated amide nitrogens (~ 70%). It suggests that the cysteinyl residue is the preferred binding site for nickel(II) even in the presence of two or three neighbouring histidines. At twofold metal ion excess one nickel(II) is bound to the -SKCG- part of the peptide and the other metal ion is coordinated by imidazole nitrogen(s) of the -HH(H)- moieties. In the presence of zinc(II) ions the protonated  $[ZnH_2L]^{4+}$  is the dominant species in the physiological pH range. The enhanced stability of the complex indicates that all side chains are involved in the coordination of the metal ion. Amide nitrogens presumably cannot displace the thiolate function and with increasing pH hydrolytic processes take place instead of the deprotonation of peptide NH groups. The presence of nickel(II) and zinc(II) ions results in the formation of mixed metal complexes, in which the nickel(II) is bound by the thiolate group, while the zinc(II) is coordinated by the histidyl residues.

Comparing the metal binding ability of anchoring groups derived from different chemical environments was also an aim of my work. In order to study the potential selectivity of the different metal binding sites the complex formation processes of the *tau*(30-34)(327-332) chimeric peptide were investigated. This ligand contains two adjacent histidyl residues as well as the –TMH– sequence that proved to be a very efficient copper(II) binding moiety. The solution equilibrium studies of the HAVAHHH-NH<sub>2</sub> peptide were also carried out. Besides the three neighbouring imidazole rings, the ligand contains a terminal amino group and an N-terminal histidyl residue; and with the involvement of these donor groups stable "histamine-like" coordinated complexes can be formed.

In acidic samples of the equimolar copper(II)–tau(30-34)(327-332) system the His330 histidine seems to have the highest affinity for copper(II) binding. The involvement of the peptide NH functions in the coordination of the metal ion probably changes the metal ion affinity of the binding sites around the histidyl moieties. Thus, the His32 imidazole nitrogen becomes the main (~ 80%), albeit not exclusive, anchoring group for copper(II) coordination at physiological pH as well as in alkaline solution. In the presence of metal ion excess all imidazolyl groups become independent metal binding sites, resulting in the formation of di- and even trinuclear species. Their coordination modes can be described with the involvement of imidazole-N donor atoms and deprotonated amide functions. In the presence of zinc(II) ions only mononuclear complexes are formed. In the physiological pH range presumably a tridentate imidazole-N coordinated complex ([ZnHL]<sup>2+</sup>) is formed. The involvement of the aspartate carboxylate group in the coordination of the metal ion might also contribute to the outstanding stability of this species. In alkaline solution the formation of amide coordinated zinc(II) complexes is assumed with one of the adjacent histidyl residues being the main anchoring site, in agreement with our previous findings. The results obtained for the mixed copper(II)/zinc(II) complexes support that the N-terminal imidazole nitrogen is the main anchoring group for copper(II) while zinc(II) ions are accumulated at one of the adjacent histidyl residues if both metal ions are present in the solution. These findings are in agreement with the hypothesis that zinc(II) coordination to the microtubule binding domains of tau contributes to the aggregation processes of the protein [176,179,230,231].

The N-terminal part of the HAVAHHH-NH<sub>2</sub> peptide proved to be the primary binding site for all three studied transition metal ions in slightly acidic samples. The "histamine-like" binding mode is probably supported by the coordination of the C-terminal histidyl residues, enhancing the thermodynamic stability of the copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes. Not even the combined binding of four or five donor groups can prevent the hydrolysis of zinc(II) in alkaline solution and precipitation is observed above pH > 7.5. In the presence of copper(II) and nickel(II) ions the increase of pH is accompanied by the metal ion induced deprotonation and coordination of amide functions. The amino terminus of the molecule as well as the Cterminal histidyl residues can be anchoring sites for the deprotonation processes, resulting in the formation of coordination isomers. In the case of copper(II) the [NH<sub>2</sub>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>] and [N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N(Im)] coordinated species are formed in an almost equal ratio, while the amino nitrogen is the preferred binding site for nickel(II). We observed similar preference in the case of the nickel(II) complexes of tau(320-333) derivatives that contain a cysteinyl side chain and a -HH(H)- sequence as potential metal binding sites. These findings suggest that if another donor group with high metal binding affinity is available for nickel(II), the metal ion is primarily bound by this other residue. Sterical reasons might contribute to this preference. In the presence of metal ion excess dinuclear copper(II) and nickel(II) complexes are formed, however the pH range of their formation differs. In the copper(II)-nickel(II)-HAVAHHH-NH<sub>2</sub> ternary system both the amino terminus and the C-terminal histidyl residues can serve as binding sites for the metal ions, resulting in the coexistence of numerous coordination isomers. Dinuclear copper(II) and nickel(II) species, as well as mixed metal complexes are formed.

**Comparing the metal binding affinity of the studied ligands**, we found that the most stable complexes are formed with copper(II) ions. The

112

"histamine-like" coordination of the metal ion is the most preferred binding mode for copper(II) and nickel(II) in the physiological pH range. With increasing pH, the C-terminal or internal imidazole rings of the peptides can also serve as anchoring sites for the metal ion induced amide deprotonation, resulting in the formation of  $[(N^{-})_x, N(Im)]$  coordinated species. We need to note that the amino acid environment of the histidyl residues has a great impact on the metal binding affinity of the ligands at high pH: the -TMHsequence proved to be the preferred binding site for copper(II), while the thiolate function of the cysteine provides the most favourable coordination environment for nickel(II) in alkaline solution. Both the "histamine-like" binding mode and the coordination via cysteine side chain are preferred for zinc(II) at physiological pH but the most stable complexes are formed with the tau(320-333)mH ligand. In these species the metal ion is bound by S,N donor atoms in a tetrahedral coordination environment. In alkaline samples the  $[(N^{-})_x, N(Im)]$  coordinated zinc(II) complexes are the dominant species (*Table 1*).

	Preferred binding site			
	physiological pH	alkaline solution		
Cu(II)	[NH <sub>2</sub> , N(Im)] (supported by the coordination of the -HHH- sequence)	−TMH− sequence: [3N <sup>-</sup> , N(Im)]		
Ni(II)	[NH <sub>2</sub> , N(Im)] (supported by the coordination of the -HHH- sequence)	Cys S: [3N⁻, S⁻]		
Zn(II)	mixed S,N donors: [3N(Im), S <sup>-</sup> ]	His N(Im): [3N <sup>-</sup> , N(Im)]		

Table 1: The most preferred binding site of the studied ligands at physiological pH and in basic solution

It is known that the disturbed homeostasis of essential metal ions may contribute to the development of neurodegenerative disorders. One course of potential treatments is represented by drugs that can bind metal ions and are also able to inhibit the aggregation processes of proteins (e.g.,  $A\beta$ , tau). Thus, the effect of the tau(326-333) KL derivative on the aggregation of the  $A\beta(1-42)$  was studied. The complex formation processes of the ligand in the presence of copper(II) ions in DMSO-water mixture were also investigated. We concluded that the same donor groups are involved in the complex formation regardless of the solvent and the presence of the hydrophobic -KLVFF- residue, and the metal ion is bound by histidine imidazole and amide nitrogen atoms. The *tau*(326-333) KL ligand does not form amyloid aggregates in the explored 24 hours' time range but it also shows only limited anti-aggregation properties.

Drugs that are able to remove metal ions from protein deposits can also be interesting from a medical point of view. Studies of different tau peptide fragments confirmed the outstanding copper(II) binding ability of the -TMH- sequence, suggesting that small molecules containing this motif might be sufficient copper(II) chelators. Thus, the potential chelating properties of the Ac-ATMHQD-NH<sub>2</sub> hexapeptide, modelling the metal binding affinity of the aforementioned sequence, were studied in the presence of *tau*(326-333)mA. In the presence of both ligands, the copper(II) complexes of the hexapeptide are formed and the tau(326-333)mA cannot remove the metal ion from the copper(II)-Ac-ATMHQD-NH<sub>2</sub> species. However, the hexapeptide is able to displace the tau(326-333)mA from its metal complex to form stable copper(II) species. It is interesting to note that the tau(26-33)derivatives form significantly less stable zinc(II) complexes, indicating that small molecules containing the -TMH- sequence could meet the selectivity requirements of the chelators. This can be confirmed by other, mainly biological, and biochemical studies.

### 8. Irodalomjegyzék

- [1] "2022 Alzheimer's disease facts and figures" *Alzheimer's & Dementia, The Journal of the Alzheimer's Association*, **2022**.
- [2] M. Lukács, G. Szunyog, Á. J. Grenács, N. Lihi, C. Kállay, G. Di Natale, T. Campagna, V. Lanza, G. Tabbi, G. Pappalardo, I. Sóvágó és K. Várnagy, "Copper(II) coordination abilities of the Tau protein's N-terminus peptide fragments: A combined potentiometric, spectroscopic and mass spectrometric study" *ChemPlusChem*, 84, 1697–1708, 2019.
- [3] T. Gajda, B. Gyurcsik és T. Kiss, Bevezetés a bioszervetlen kémiába, Budapest: Nemzeti Tankönyvkiadó, 2007.
- [4] M. C. Linder, Biochemistry of Copper (ed.: E. Frieden), New York: Plenum Press, 1991.
- [5] W. Kaim, B. Schwederski és A. Klein, "Copper-containing proteins: An alternative to biological iron" in *Bioinorganic chemistry: Inorganic elements in the chemistry of life* – An introduction and guide, Chichester, John Wiley & Sons, Ltd., 2013, 183–209.
- [6] K. D. Karlin és Z. Tyeklár (eds.), Bioinorganic chemistry of copper, New York, London: Chapman & Hall, Inc., 1993.
- [7] R. M. Llanos és J. F. B. Mercer, "The molecular basis of copper homeostasis and copper-related disorders" DNA and Cell Biology, 21, 259–270, 2002.
- [8] J. H. Menkes, M. Alte, G. K. Steigleder, D. R. Weakley és J. H. Sung, "A sex-linked reccessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration" *Pediatrics*, 29, 764–769, **1962**.
- [9] S. A. K. Wilson, "Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver" *Brain*, 34, 295–509, 1912.
- [10] H. Kozlowski, M. Łuczkowski, M. Remelli és D. Valensin, "Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases)" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 2129–2141, 2012.
- [11] E. T. Adman, "Copper protein structures" Advances in Protein Chemistry, 42, 145–197, **1991**.
- [12] N. Kitajima, "Synthetic approach to the structure and function of copper proteins" Advances in Inorganic Chemistry, 39, 1–77, 1992.
- [13] J. A. Tainer, E. D. Getzoff, J. S. Richardson és D. C. Richardson, "Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase" *Nature*, 306, 284–287, **1983.**
- [14] N. Kitajima és Y. Moro-oka, "μ-η<sup>2</sup>:η<sup>2</sup>-peroxide in biological systems" Journal of the Chemical Society, *Dalton Transactions*, 18, 2665–2671, **1993.**
- [15] G. C. M. Steffens, T. Soulimane, G. Wolff és G. Buse, "Stoichiometry and redox behaviour of metals in cytochrome-c oxidase" *European Journal of Biochemistry*, 213, 1149–1157, 1993.
- [16] K. Brown, K. Djinovic-Carugo, T. Haltia, I. Cabrito, M. Saraste, J. J. G. Moura, I. Moura, M. Tegoni és C. Cambillau, "Revisiting the catalytic Cu<sub>Z</sub> cluster of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) reductase. Evidence of a bridging inorganic sulphur" *Journal of Biological Chemistry*, 275, 41133–41136, **2000**.
- [17] D. Zemble, M. Rowińska-Żyrek és H. Kozlowski (eds.), The biological chemistry of nickel, Croydon: The Royal Society of Chemistry, CPI Group Ltd., 2017.
- [18] W. Kaim, B. Schwederski és A. Klein, "Nickel-containing enzymes: The remarkable career of a long-overlooked biometal" in *Bioinorganic chemistry: Inorganic elements in the chemistry of life An introduction and guide*, Chichester, John Wiley & Sons, Ltd., **2013**, 163–181.
- [19] S. Ciurli és S. Mangani, "Nickel-containing enzymes" in Handbook on

*metalloproteins* (eds.: I. Bertini, A. Sigel, H. Sigel), New York, USA, Marcel Dekker, **2001**, 669–708.

- [20] R. Cammack, "Nickel in metalloproteins" in *Advances in inorganic chemistry* (ed.: A. G. Sykes), San Diego, Academic Press, Inc., **1988**, 297–333.
- [21] L. R. Furenlid, M. W. Renner és J. Fajer, "EXAFS studies of nickel(II) and nickel(I) factor 430M. Conformational flexibility of the F430 skeleton" *Journal of the American Chemical Society*, 112, 8987–8989, 1990.
- [22] R. K. Thauer, "Enzymology. Nickel to the fore" Science, 293, 1264–1265, 2001.
- [23] R. K. Thauer, "Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson" *Microbiology*, 144, 2377–2406, 1998.
- [24] B. Jaun és R. K. Thauer, "Nickel-alkyl bond formation in the active site of methylcoenzyme M reductase" in *Metal ions in life science* (eds.: A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel), Cambridge, RSC Publishing, **2009**, 115–132.
- [25] P. A. Lindahl, "Nickel-carbon bonds in acetyl-coenzyme A synthases/carbon monoxide dehydrogenases" in *Metal ions in life science* (eds.: A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel), Cambridge, RSC Publishing, **2009**, 133–150.
- [26] J. C. Fontecilla-Camps, "Structure and function of [NiFe]-hydrogenases" in *Metal ions in life science* (eds.: A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel), Cambridge, RSC Publishing, 2009, 151–178.
- [27] J. C. Fontecilla-Camps és S. W. Ragsdale, "Nickel-iron-sulfur active sites: hydrogenase and CO dehydrogenase" in *Advances in inorganic chemistry* (ed.: A. G. Sykes), San Diego, Academic Press, Inc., **1999**, 283–333.
- [28] N. E. Dixon, C. Gazzola, R. L. Blakeley és B. Zerner, "Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel" *Journal of the American Chemical Society*, 4131–4133, **1975**.
- [29] E. Jabri, M. B. Carr, R. P. Hausinger és P. A. Karplus, "The crystal structure of urease from Klebsiella aerogenes" *Science*, 268, 998–1004, **1995**.
- [30] D. R. Scott, E. A. Marcus, D. L. Weeks és G. Sachs, "Mechanisms of acid resistance due to the urease system of Helicobacter pylori" *Gastroenterology*, 123, 187–193, 2002.
- [31] J. W. Olson és R. J. Maier, "Molecular hydrogen as an energy source for Helicobacter pylori" *Science*, 298, 1788–1790, 2002.
- [32] E. L. Hegg, "Unraveling the structure and mechanism of acetyl-coenzyme A synthase" *Accounts of Chemical Research*, 37, 775–783, **2004**.
- [33] S. Shima és R. K. Thauer, "Methyl-coenzyme M reductase and the anaerobic oxidation of methane in methanotrophic archaea" *Current Opinion in Microbiology*, 8, 643–648, 2005.
- [34] A. Pfaltz, B. Jaun, A. Fassler, A. Eschenmoser, R. Jaenchen, H. H. Gilles, G. Diekert és R. K. Thauer, "Zur kenntnis des faktors F430 aus methanogenen bakterien: Struktur des porphinoiden ligandsystems" *Helvetica Chimica Acta*, 65, 828–865, **1982**.
- [35] W. Grabarse, F. Mahlert, E. C. Duin, M. Goubeaud, S. Shima, R. K. Thauer, V. Lamzin és U. Ermler, "On the mechanism of biological methane formation: Structural evidence for conformational changes in methyl-coenzyme M reductase upon substrate binding" *Journal of Molecular Biology*, 309, 315–330, 2001.
- [36] J. Shearer, "Insight into the structure and mechanism of nickel-containing superoxide dismutase derived from peptide-based mimics" Accounts of Chemical Research, 47, 2332–2341, 2014.
- [37] D. Tietze, J. Sartorius, B. Koley Seth, K. Herr, P. Heimer, D. Imhof, D. Mollenhauer és G. Buntkowsky, "New insights into the mechanism of nickel superoxide degradation from studies of model peptides" *Scientific Reports*, 7, 17194:1–15, 2017.

- [38] A. T. Fiedler, P. A. Bryngelson, M. J. Maroney és T. C. Brunold, "Spectroscopic and computational studies of Ni superoxide dismutase: electronic structure contributions to enzymatic function" *Journal of the American Chemical Society*, 127, 5449–5462, 2005.
- [39] W. Kaim, B. Schwederski és A. Klein, "Zinc: Structural and gene-regulatory functions and the enzymatic catalysis of hydrolysis and condensation reactions" in *Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life – An introduction and guide*, Chichester, John Wiley & Sons, Ltd., 2013, pp. 235–256.
- [40] B. L. Vallee és D. S. Auld, "Zinc biological functional coordination motifs" Accounts of Chemical Research, 26, 543–551, 1993.
- [41] J. E. Coleman, "Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins" *Annual Review of Biochemistry*, 61, 897–946, **1992**.
- [42] S. J. Dodgson, R. E. Tashian, G. Gros és N. D. Carter (eds.), The carbonic anhydrase, New York: Plenum Press, 1991.
- [43] D. W. Christianson és W. N. Lipscomb, "Carboxypeptidase A" Accounts of Chemical Research, 22, 62–69, 1989.
- [44] B. V. Plapp, B. R. Savarimuthu, D. J. Ferraro, J. K. Rubach, E. N. Brown és S. Ramaswamy, "Horse liver alcohol dehydrogenase: Zinc coordination and catalysis" *Biochemistry*, 56, 3632–3646, 2017.
- [45] D. Rhodes és A. Klug, "Zinc fingers" Scientific American, 268, 56–63, 1993.
- [46] N. P. Pavletich és C. O. Pabo, "Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers" *Science*, 261, 1701–1707, 1993.
- [47] H. Sigel és R. B. Martin, "Coordinating properties of the amide bond stability and structure of metal-ion complexes of peptides and related ligands" *Chemical Reviews*, 82, 385–426, **1982**.
- [48] L. D. Pettit, J. E. Gregor és H. Kozlowski, "Complex formation between metal ions and peptides" in *Perspectives in bioinorganic chemistry* (eds.: R. W. Hay, J. R. Dilworth, K. B. Nolan), London, Jai Press Ltd., **1991**.
- [49] L. D. Pettit és R. A. Robbins, "Metal-peptide complex formation" in *Handbook of metal-ligand interaction in biological fluids* (ed. G. Berthon), New York, Marcel Dekker Inc., 1995, 636–647.
- [50] I. Sóvágó és K. Ösz, "Metal ion selectivity of oligopeptides" *Dalton Transactions*, 28, 3841–3854, 2006.
- [51] I. Sóvágó, C. Kállay és K. Várnagy, "Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 2225–2233, 2012.
- [52] R. B. Martin, "Peptide bond characteristics" in *Metal ions in biological systems* (ed.: A. Sigel), New York, Marcel Dekker, 2001.
- [53] C. G. Ágoston, T. Kowalik-Jankowska és I. Sóvágó, "Potentiometric and NMR studies on palladium(II) complexes of oligoglycines and related ligands with non-coordinating side chains" *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 18, 3295–3302, **1999**.
- [54] T. Kiss, "Coordination equilibria in biologically active systems" in *Biocoordination chemistry* (ed.: K. Burger), Chichester, Ellis Horwood, **1990**, 56–134.
- [55] S. H. Laurie, "Bioinorganic chemistry" in *Handbook of metal-ligand interactions in biological fluids* (ed.: G. Berthon), New York, Marcel Dekker Inc., **1995**, 603–619.
- [56] T. Kowalik-Jankowska, H. Kozlowski, E. Farkas és I. Sóvágó, "Nickel ion complexes of amino acids and peptides" in *Nickel and its surprising impact in nature* (eds.: A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel), John Wiley & Sons, Ltd., **2007**, 63–107.
- [57] H. Kozlowski, A. Janicka-Klos, P. Stanczak, D. Valensin, G. Valensin és K. Kulon,

"Specificity in the Cu<sup>2+</sup> interactions with prion protein fragments and related His-rich peptides from mammals to fishes" *Coordination Chemistry Reviews*, 252, 1069–1078, **2008**.

- [58] G. Brookes és L. D. Pettit, "Thermodynamics of formation of complexes of copper(II) and nickel(II) ions with glycylhistidine, β-alanylhistidine, and histidylglycine" *Journal* of the Chemical Society, Dalton Transactions, 20, 2112–2117, **1975.**
- [59] I. Sóvágó, E. Farkas és A. Gergely, "Studies on transition-metal-peptide complexes. 7. Copper(II) complexes of dipeptides containing L-histidine" *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 11, 2159–2163, 1982.
- [60] P. J. Morris és R. B. Martin, "Tetramer formation in tetragonal transition metal ion complexes of glycyl-L-histidine" *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 33, 2913–2918, **1971**.
- [61] E. Farkas, I. Sóvágó és A. Gergely, "Studies on transition-metal peptide complexes. 8. Parent and mixed-ligand complexes of histidine-containing dipeptides" *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 8, 1545–1551, **1983**.
- [62] D. L. Rabenstein, S. A. Daignault, A. A. Isab, A. P. Arnold és M. M. Shoukry, "Nuclear magnetic-resonance studies of the solution chemistry of metal-complexes. 21. The complexation of zinc by glycylhistidine and alanylhistidine peptides" *Journal* of the American Chemical Society, 107, 6435–6439, **1985**.
- [63] N. Camerman, A. Camerman és B. Sarkar, "Molecular design to mimic copper(II) transport site of human-albumin crystal and molecular-structure of copper(II)-glycylglycyl-L-histidine-N-methyl amide monoaqua complex" *Canadian Journal of Chemistry Revue Canadienne De Chimie*, 54, 1309–1316, **1976**.
- [64] E. Farkas, I. Sóvágó, T. Kiss és A. Gergely, "Studies on transition-metal peptide complexes. 9. Copper(II) complexes of tripeptides containing histidine" *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 4, 611–614, **1984.**
- [65] S. L. Best, T. K. Chattopadhyay, M. I. Djurnan, R. A. Palmer, P. J. Sadler, I. Sóvágó és K. Várnagy, "Gold(III) and palladium(II) complexes of glycylglycyl-L-histidine: Crystal structures of [Au<sup>III</sup>(Gly-Gly-L-His-H-2)]Cl·H<sub>2</sub>O and [Pd<sup>II</sup>(Gly-Gly-L-His-H-2)]·1.5H<sub>2</sub>O and His ɛNH deprotonation" *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 2587–2596, **1997**.
- [66] I. Turi, D. Sanna, E. Garribba, G. Pappalardo és I. Sóvágó, "The effect of noncoordinating side chains on the metal binding affinities of peptides of histidine" *Polyhedron*, 62, 7–17, 2013.
- [67] L. D. Pettit, S. Pyburn, W. Bal, H. Kozlowski és M. Bataille, "A study of the comparative donor properties to Cu(II) of the terminal amino and imidazole nitrogens in peptides" *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 12, 3565–3570, 1990.
- [68] K. Várnagy, J. Szabó, I. Sóvágó, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna és G. Micera, "Equilibrium and structural studies on copper(II) complexes of tetra-, pentaand hexa-peptides containing histidyl residues at the C-termini" *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 4, 467–472, 2000.
- [69] W. Bal, H. Kozlowski, R. Robbins és L. D. Pettit, "Competition between the terminal amino and imidazole nitrogen donors for coordination to Ni(II) ions in oligopeptides" *Inorganica Chimica Acta*, 231, 7–2, **1995**.
- [70] Á. J. Grenács és I. Sóvágó, "Copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of the Nterminal nonapeptide fragment of amyloid-β and its derivatives" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 139, 49–56, **2014**.
- [71] D. Sanna, G. Micera, C. Kállay, V. Rigó és I. Sóvágó, "Copper(II) complexes of Nterminal protected tri- and tetra-peptides containing histidine residues" *Dalton*

Transactions, 17, 2702-2707, 2004.

- [72] C. Kállay, K. Ősz, Á. Dávid, Z. Valastyán, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis és I. Sóvágó, "Zinc(II) binding ability of tri-, tetra- and penta-peptides containing two or three histidyl residues" *Dalton Transactions*, 36, 4040–4047, 2007.
- [73] S. Rajkovic, C. Kállay, R. Serényi, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna és I. Sóvágó, "Complex formation processes of terminally protected peptides containing two or three histidyl residues. Characterization of the mixed metal complexes of peptides" *Dalton Transactions*, 37, 5059–5071, 2008.
- [74] C. Kállay, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna és I. Sóvágó, "Thermodynamic and structural characterization of the macrochelates formed in the reactions of copper(II) and zinc(II) ions with peptides of histidine" *Inorganic Chimica Acta*, 362, 935–945, **2009**.
- [75] S. Timári, C. Kállay, K. Ősz, I. Sóvágó és K. Várnagy, "Transition metal complexes of short multihistidine peptides" *Dalton Transactions*, 11, 1962–1971, 2009.
- [76] C. Kállay, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna és I. Sóvágó, "Copper(II) complexes of terminally protected pentapeptides containing three histidyl residues in alternating positions, Ac-His-Xaa-His-Yaa-His-NH<sub>2</sub>" *Dalton Transactions*, 38, 4545–4552, 2006.
- [77] A. Matera-Witkiewicz, J. Brasuń, J. Świątek-Kozłowska, A. Pratesi, M. Ginanneschi és L. Messori, "Short-chain oligopeptides with copper(II) binding properties: The impact of specific structural modifications on the copper(II) coordination abilities" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103, 678–688, 2009.
- [78] E. Székely, G. Csire, B. D. Balogh, J. Z. Erdei, J. M. Király, J. Pinkóczy és K. Várnagy, "The role of side chains in the fine-tuning of the metal-binding ability of multihistidine peptides" *Molecules*, 27, 3435:1–29, 2022.
- [79] L. D. Pettit, I. Steel, G. Formicka-Kozlowska, T. Tatarowski és M. Bataille, "The Lproline residue as a 'break-point' in metal-peptide systems" *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 3, 535–539, 1985.
- [80] S. Timári, R. Cerea és K. Várnagy, "Characterization of CuZnSOD model complexes from a redox point of view: Redox properties of copper(II) complexes of imidazole containing ligands" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105, 1009–1017, 2001.
- [81] G. Csire, S. Timári, J. Asztalos, J. M. Király, M. Kiss és K. Várnagy, "Coordination, redox properties and SOD activity of Cu(II) complexes of multihistidine peptides" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 177, 198–210, 2017.
- [82] C. Damante, K. Ősz, Z. Nagy, G. Pappalardo, G. Grasso, G. Impellizzeri, E. Rizzarelli és I. Sóvágó, "Metal ion interactions within the 1-16 N-terminal region of β-amyloid" *Journal of Peptide Science*, 14, 87–87, 2008.
- [83] D. R. Brown és H. Kozlowski, "Biological inorganic and bioinorganic chemistry of neurodegeneration based on prion and Alzheimer diseases" *Dalton Transactions*, 13, 1907–1917, 2004.
- [84] P. Stanczak, D. Valensin, P. Juszczyk, Z. Grzonka, C. Migliorini, E. Molteni, G. Valensin, E. Gaggelli és H. Kozlowski, "Structure and stability of the Cu<sup>II</sup> complexes with tandem repeats of the chicken prion" *Biochemistry*, 44, 12940–12954, **2005**.
- [85] C. Conato, W. Kamysz, H. Kozłowski, M. Łuczkowski, Z. Mackiewicz, F. Mancini, P. Młynarz, M. Remelli, D. Valensin és G. Valensin, "Cu<sup>II</sup> ion coordination to an unprotected pentadecapeptide containing two His residues: Competition between the terminal amino and the side-chain imidazole nitrogen donors" *European Journal of Inorganic Chemistry*, 9, 1694–1702, **2003.**
- [86] G. Pappalardo, G. Impellizzeri, R. P. Bonomo, T. Campagna, G. Grasso és M. G. Saita, "Copper(II) and nickel(II) binding modes in a histidine-containing model

dodecapeptide" New Journal of Chemistry, 26, 593-600, 2006.

- [87] L. E. Valenti, C. P. De Pauli és C. E. Giacomelli, "The binding of Ni(II) ions to hexahistidine as a model system of the interaction between nickel and His-tagged proteins" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 192–200, 2006.
- [88] R. P. Bonomo, L. Casella, L. De Gioia, H. Molinari, G. Impellizzeri, T. Jordan, G. Pappalardo, R. Purrello és E. Rizzarelli, "Metal ion and proton stabilisation of turn motif in the synthetic octapeptide histidyltris(glycylhistidyl)glycine" *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 14, 2387–2390, **1997.**
- [89] A. Myari, G. Malandrinos, Y. Deligiannakis, J. C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, Z. Nagy és I. Sóvágó, "Interaction of Cu<sup>2+</sup> with His-Val-His and of Zn<sup>2+</sup> with His-Val-Gly-Asp, two peptides surrounding metal ions in Cu,Zn-superoxide dismutase enzyme" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 85, 253–261, 2001.
- [90] M. Casolaro, M. Chelli, M. Ginanneschi, F. Laschi, M. Muniz-Miranda, A. M. Papini és G. Sbrana, "Spectroscopic and potentiometric study of copper(II) complexes with L-histidyl-glycyl-L-histidyl-glycine in aqueous solution" *Spectrochimica Acta Part A -Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 55, 1675–1689, **1999.**
- [91] Á. J. Grenács, A. Kaluha, C. Kállay, V. Jószai, D. Sanna és I. Sóvágó, "Binary and ternary mixed metal complexes of terminally free peptides containing two different histidyl binding sites" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 128, 17–25, 2013.
- [92] D. La Mendola, R. P. Bonomo, G. Impellizzeri, G. Maccarrone, G. Pappalardo, A. Pietropaolo, E. Rizzarelli és V. Zito, "Copper(II) complexes with chicken prion repeats: influence of proline and tyrosine residues on the coordination features" *Journal of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 10, 463–475, 2005.
- [93] D. Valensin, Ł. Szyrwiel, F. Camponeschi, M. Rowińska-Żyrek, E. Molteni, E. Jankowska, A. Szymanska, E. Gaggelli, G. Valensin és H. Kozłowski, "Heteronuclear and homonuclear Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> complexes with multihistidine peptides based on zebrafish prion-like protein" *Inorganic Chemistry*, 48, 7330–7340, 2009.
- [94] V. Jószai, I. Turi, C. Kállay, G. Pappalardo, G. Di Natale, E. Rizzarelli és I. Sóvágó, "Mixed metal copper(II)-nickel(II) and copper(II)-zinc(II) complexes of multihistidine peptide fragments of human prion protein" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 112, 17–24, 2012.
- [95] K. Ösz, Z. Nagy, G. Pappalardo, G. Di Natale, D. Sanna, G. Micera, E. Rizzarelli és I. Sóvágó, "Copper(II) interaction with prion peptide fragments encompassing histidine residues within and outside the octarepeat domain: speciation, stability constants and binding details" *Chemistry a European Journal*, 13, 7129–7143, 2007.
- [96] G. Di Natale, K. Ősz, Z. Nagy, D. Sanna, G. Micera, G. Pappalardo, I. Sóvágó és E. Rizzarelli, "Interaction of copper(II) with the prion peptide fragment HuPrP(76-114) encompassing four histidyl residues within and outside the octarepeat domain" *Inorganic Chemistry*, 48, 4239–4250, **2009**.
- [97] I. Turi, C. Kállay, D. Szikszai, G. Pappalardo, G. Di Natale, P. De Bona, E. Rizzarelli és I. Sóvágó, "Nickel(II) complexes of the multihistidine peptide fragments of human prion protein" *Journak of Inorganic Biochemistry*, 104, 885–891, 2010.
- [98] Á. J. Grenács, Egyetemi doktori (PhD) értekezés, Az amiloid-β peptid származékainak komplexképződési folyamatai réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionokkal, Debrecen: Debreceni Egyetem, 2015.
- [99] Á. J. Grenács, D. Sanna és I. Sóvágó, "Copper(II) and nickel(II) binding sites of peptide containing adjacent histidyl residues" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 151, 87–93, 2015
- [100] N. M. Giles, G. I. Giles és C. Jacob, "Multiple roles of cysteine in biocatalysis" Biochemical and Biophysical Research Communications, 300, 1–4, 2003.

- [101] N. M. Giles, A. B. Watts, G. I. Giles, F. H. Fry, J. A. Littlechild és C. Jacob, "Metal and redox modulation of cysteine protein function" *Chemistry & Biology*, 10, 677– 693, 2003.
- [102] M. Prudent és H. H. Girault, "The role of copper in cysteine oxidation: study of intraand inter-molecular reactions in mass spectrometry" *Metallomics*, 1, 117–176, 2008.
- [103] P. Gockel, R. Vogler és H. Vahrenkamp, "Zinc complexes of amino acids and peptides, 7. Solution behavior and zinc complexation of dipeptides made up solely from histidine and cysteine" *Chemische Berichte*, 129, 887–895, **1996.**
- [104] P. Gockel, R. Vogler, M. Gelinsky, A. Meißner, H. Albrich és H. Vahrenkamp, "Zinc complexation of cyclic dipeptides containing cysteine and/or histidine" *Inorganica Chimica Acta*, 323, 16–22, 2001.
- [105] P. Gockel, M. Gelinsky, R. Vogler és H. Vahrenkamp, "Solution behaviour and zinc complexation of tripeptides with cysteine and/or histidine at both termini" *Inorganica Chimica Acta*, 272, 115–124, **1998.**
- [106] D. Árus, Á. Dancs, N. V. Nagy és T. Gajda, "A comparative study on the possible zinc binding sites of the human ZnT3 zinc transporter protein" *Dalton Transactions*, 42, 12031–12040, **2013.**
- [107] H. Kaluarachchi, K. C. C. Chung és D. B. Zamble, "Microbial nickelproteins" *Natural Product Reports*, 27, 681–694, 2010.
- [108] D. Witkowska, M. Rowińska-Żyrek, G. Valensin és H. Kozłowski, "Specific polyhistidyl and poly-cysteil protein sites involved in Ni<sup>2+</sup> homeostasis in Helicobacter pylori. Impact of Bi<sup>3+</sup> ions on Ni<sup>2+</sup> binding to proteins. Structural and thermodynamic aspects" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 133–148, **2012**.
- [109] M. Rowińska-Żyrek, J. Zakrzewska-Czerwinska, A. Zawilak-Pawlik és H. Kozłowski, "Ni<sup>2+</sup> chemistry in pathogens – a possible target for eradication" *Dalton Transactions*, 43, 8976–8989, **2014.**
- [110] N. Mehta, J. W. Olson és R. J. Maier, "Characterization of Helicobacter pylori nickel metabolism accessory proteins needed for maturation of both urease and hydrogenase" *Journal of Bacteriology*, 185, 726–732, 2003.
- [111] W. Xia, H. Li, K. H. Sze és H. Sun, "Structure of a nickel chaperone, HypA, from Helicobacter pylori reveals two distinct metal binding sites" *Journal of the American Chemical Society*, 131, 10031–10040, 2009.
- [112] M. Rowińska-Żyrek, D. Witkowska, D. Valensin, W. Kamysz és H. Kozłowski, "The C terminus of HspA – a potential target for native Ni(II) and Bi(III) anti-ulcer drugs" *Dalton Transactions*, 39, 5814–5826, **2010.**
- [113] M. Rowińska-Żyrek, D. Witkowska, S. Bielinska, W. Kamysz és H. Kozłowski, "The -Cys-Cys- motif in Helicobacter pylori's Hpn and HspA proteins is an essential anchoring site for metal ions" *Dalton Transactions*, 40, 5604–5610, 2011.
- [114] C. A. Ross és M. A. Poirier, "Protein aggregation and neurodegenerative disease" *Nature Medicine*, Suppl:S10–17, 2004.
- [115] T. Guo, W. Noble és D. P. Hanger, "Roles of tau protein in health and disease" Acta Neuropathologica, 133, 665–704, 2017.
- [116] A. Sigel, H. Sigel és R. K. O. Sigel (eds.), Neurodegenerative diseases and metal ions (Metal ions in life sciences), Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- [117] M. Barbagallo, L. Dominguez, A. Prima és M. Belvedere, "Oxidative stress and Alzheimer disease" *European Geriatric Medicine*, 3, S78, **2012.**
- [118] A. Alzheimer, R. A. Stelzmann, H. N. Schnitzlein és F. R. Murtagh, "An English translation of Alzheimer's 1907 paper, 'Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde' "*Clinical Anatomy*, 8, 429–431, 1995.
- [119] N. Ertekin-Taner, "Genetics of Alzheimer's disease: a centennial review" Neurologic

Clinics, 25, 611-667, 2007.

- [120] P. P. Liu, Y. Xie, X. Y. Meng és J. S. Kang, "History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease" *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4, 1–22, 2019.
- [121] R. Sala-Llonch, A. V. Idland, T. Borza, L. O. Watne, T. B. Wyller, A. Brækhus, H. Zetterberg, K. Blennow, K. B. Walhovd és A. M. Fjell, "Inflammation, amyloid, and atrophy in the aging brain: relationships with longitudinal changes in cognition" *Journal of Alzheimer's Disease*, 58, 829–840, **2017.**
- [122] P. T. Nelson, H. Braak és W. R. Markesbery, "Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship" *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 68, 1–14, 2009.
- [123] H. A. Fink, E. Jutkowitz, J. R. McCarten, L. S. Hemmy, M. Butler, H. Davila, E. Ratner, C. Calvert, T. R. Barclay, M. Brasure, V. A. Nelson és R. L. Kane, "Pharmacologic interventions to prevent cognitive decline, mild cognitive impairment, and clinical Alzheimer-type dementia: a systematic review" *Annals of Internal Medicine*, 168, 39–51, **2018**.
- [124] E. Nichols et al., "The estimation of the global prevalence of dementia from 1990-2019 and forecasted prevalence through 2050: An analysis for the Global Burden of Disease (GBD) study 2019" *The Lancet Public Health*, 7, e105–125, **2022.**
- [125] P. Davies és A. J. Maloney, "Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease" *Lancet*, 2, 1403, **1976.**
- [126] J. A. Hardy és G. A. Higgins, "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis" Science, 256, 184–185, 1992.
- [127] B. Frost, R. L. Jacks és M. A. Diamond, "Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell" *Journal of Biological Chemistry*, 284, 12845–12852, 2009.
- [128] A. Bush, "The metallobiology of Alzheimer's disease" Trends in Neurosciences Cell Press, 26, 207–214, 2003.
- [129] C. Cheignon, M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, C. Hureau és F. Collin, "Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease" *Redox Biology*, 14, 450–464, **2018.**
- [130] V. Wilquet és B. De Strooper, "Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration" Current Opinion in Neurobiology, 14, 582–588, 2004.
- [131] J. Hardy és A. Allsop, "Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease" *Trends in Pharmacological Sciences*, 12, 383–388, **1991.**
- [132] H. Braak és E. Braak, "Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes" Acta Neuropathologica, 82, 239–259, 1991.
- [133] D. W. Sanders, S. K. Kaufman, S. L. DeVos, A. M. Sharma, H. Mirbaha, A. Li, S. J. Barker, A. C. Foley, J. R. Thorpe, L. C. Serpell, T. M. Miller, L. T. Grinberg, W. W. Seeley és M. I. Diamond, "Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies" *Neuron*, 82, 1271–1288, 2014.
- [134] G. S. Bloom, "Amyloid-β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis" JAMA Neurology, 71, 505–508, 2014.
- [135] S. Makin, "The amyloid hypothesis on trial" Nature, S4:559, 1-4, 2018.
- [136] K. J. Barnham és A. I. Bush, "Biological metals and metaltargeting compounds in major neurodegenerative diseases" *Chemical Society Reviews*, 43, 6727–6749, 2014.
- [137] M. D. Weingarten, A. H. Lockwood, S. Y. Hwo és M. W. Kirschner, "A protein factor essential for microtubule assembly" *Proceedings of the National Academy of Sciences* of the United States of America, 72, 1858–1862, **1975.**
- [138] D. G. Drubin és M. W. Kirschner, "Tau protein function in living cells" Journal of

Cell Biology, 103, 2739-2746, 1986.

- [139] R. L. Neve, P. Harris, K. S. Kosik, D. M. Kurnit és T. A. Donlon, "Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2" *Molecular Brain Research*, 1, 271–280, **1986**.
- [140] M. Goedert, M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford és R. A. Crowther, "Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease" *Neuron*, 3, 519–526, **1989**.
- [141] J. Chen, Y. Kanai, N. J. Cowan és N. Hirokawa, "Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons" *Nature*, 360, 674–677, 1992.
- [142] G. Lee, S. T. Newman, D. L. Gard, H. Band és G. Panchamoorthy, "Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases" *Journal of Cell Science*, 111, 3167–3177, 1998.
- [143] B. L. Goode, P. E. Denis, D. Panda, M. J. Radeke, H. P. Miller, L. Wilson és S. C. Feinstein, "Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly" *Molecular Biology of the Cell*, 8, 353–365, 1997.
- [144] H. J. He, X. S. Wang, R. Pan, D. L. Wang, M. N. Liu és R. Q. He, "The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin" *BMC Molecular and Cell Biology*, 10, 81:1–12, 2009.
- [145] M. Kolarova, F. García-Sierra, A. Bartos, J. Ricny és D. Ripova, "Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease" *International Journal of Alzheimer's Disease*, 1, 731526:1–13, 2012.
- [146] E. M. Mandelkow és E. Mandelkow, "Tau in Alzheimer's disease" Trends in Cell Biology, 8, 425–427, 1998.
- [147] J. Z. Wang, I. Grundke-Iqbal és K. Iqbal, "Glycosylation of microtubule–associated protein tau: An abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease" *Nature Medicine*, 2, 871–875, **1996.**
- [148] O. Schweers, E. M. Mandelkow, J. Biernat és E. Mandelkow, "Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 8463–8467, **1995.**
- [149] M. D. Ledesma, P. Bonay és J. Avila, "Tau protein from Alzheimer's disease patients is glycated at its tubulin-binding domain" *Journal of Neurochemistry*, 65, 1658–1664, 1995.
- [150] F. Liu, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, G. W. Hart és C. X. Gong, "O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: A mechanism involved in Alzheimer's disease" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 10804–10809, 2004.
- [151] M. R. Reynolds, R. W. Berry és L. I. Binder, "Nitration in neurodegeneration: deciphering the "Hows" "nYs", *Biochemistry*, 46, 7325–7336, 2007.
- [152] Y. L. Gao, N. Wang, F. R. Sun, X. P. Cao, W. Zhang és J. T. Yu, "Tau in neurodegenerative disease" Annals of Translational Medicine, 6, 175:1–13, 2018.
- [153] E. Köpke, Y. H. Chen, S. Shaikh, A. Alonso, K. Iqbal és I. Grundke-Iqbal, "Microtubule-associated protein tau: Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease" *Journal of Biological Chemistry*, 268, 24374–24384, 1993.
- [154] D. P. Hanger, H. L. Byers, S. Wray, K. Y. Leung, M. J. Saxton, A. Seereeram, C. H. Reynolds, M. A. Ward és B. H. Anderton, "Novel phosphorylation sites in tau from

Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis" *Journal of Biological Chemistry*, 282, 23645–23654, **2007.** 

- [155] S. Sarkar, "Neurofibrillary tangles mediated human neuronal tauopathies: insights from fly models" *Journal of Genetics*, 97, 783–793, 2018.
- [156] P. Friedhoff, M. von Bergen, E. M. Mandelkow és E. Mandelkow, "Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments" *Biochimica et Biophysica Acta*, 1502, 122–132, **2000.**
- [157] C. A. De Benedictis, A. Vilella és A. M. Grabrucker, "The role of trace metals in Alzheimer's disease" in Alzheimer's disease (ed.: T. Wisniewski), Brisbane, Codon Publications, 2019, 85–106.
- [158] C. Sarell, S. Wilkinson és J. Viles, "Substoichiometric levels of Cu<sup>2+</sup> ions accelerate the kinetics of fiber formation and promote cell toxicity of amyloid- from Alzheimer disease" *Journal of Biological Chemistry*, 285, 41533–41540, **2010**.
- [159] B. Liu, A. Moloney, S. Meehan, K. Morris, S. Thomas, L. Serpell, R. Hider, S. Marciniak, D. Lomas és D. Crowther, "Iron promotes the toxicity of amyloid peptide by impeding its ordered aggregation" *Journal of Biological Chemistry*, 286, 4248–4256, 2011.
- [160] S. S. Leal, H. M. Botelho és C. M. Gomes, "Metal ions as modulators of protein conformation and misfolding in neurodegeneration" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 2253–2270, 2012.
- [161] A. Spinello, R. Bonsignore, G. Barone, B. K. Keppler és A. Terenzi, "Metal ions and metal complexes in Alzheimer's disease" *Current Pharmaceutical Design*, 22, 3996– 4010, 2016.
- [162] H. Basun, L. G. Forssell, L. Wetterberg és B. Winblad, "Metals and trace elements in plasma and cerebrospinal fluid in normal aging and Alzheimer's disease" *Journal of Neural Transmission - Parkinson's Disease and Dementia Section*, 3, 231–258, **1991.**
- [163] D. Religa, D. Strozyk, R. A. Cherny, I. Volitakis, V. Haroutunian, B. Winblad, J. Naslund és A. I. Bush, "Elevated cortical zinc in Alzheimer disease" *Neurology*, 67, 69–75, 2006.
- [164] G. M. Bishop, S. R. Robinson, Q. Liu, G. Perry, C. S. Atwood és M. A. Smith, "Iron: a pathological mediator of Alzheimer disease?" *Developmental Neuroscience*, 24, 184–187, 2002.
- [165] M. von Bergen, P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E. M. Mandelkow és E. Mandelkow, "Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 5129–5134, 2000.
- [166] A. Soragni, B. Zambelli, M. D. Mukrasch, J. Biernat, S. Jeganathan, C. Griesinger, S. Ciurli, E. Mandelkow és M. Zweckstetter, "Structural characterization of binding of Cu(II) to tau protein" *Biochemistry*, 47, 10841–10851, **2008.**
- [167] M. Kitazawa, D. Cheng és F. M. Laferla, "Chronic copper exposure exacerbates both amyloid and tau pathology and selectively dysregulates cdk5 in a mouse model of AD" *Journal of Neurochemistry*, 108, 1550–1560, 2009.
- [168] L. M. Sayre, G. Perry, P. L. Harris, Y. Liu, K. A. Schubert és M. A. Smith, "In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals" *Journal of Neurochemistry*, 74, 270–279, 2000.
- [169] L. X. Zhou, J. T. Du, X. Y. Zeng, W. H. Wu, Y. F. Zhao, K. Kanazawa, Y. Ishizuka, T. Nemoto, H. Nakanishi és Y. M. Li, "Copper (II) modulates in vitro aggregation of tau peptide" *Peptides*, 28, 2229–2234, **2007.**

- [170] P. Crouch, L. Hung, P. Adlard, M. Cortes, V. Lal, G. Filiz, K. Pérez, M. Nurjono, A. Caragounis, T. Du, K. Laughton, I. Volitakis, A. Bush, Q. X. Li, C. Masters, R. Cappai, R. Cherny, P. Donnelly, A. White és K. Barnham, "Increasing Cu bioavailability inhibits A oligomers and tau phosphorylation" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 381–386, 2009.
- [171] B. K. Shin és S. Saxena, "Insight into potential Cu(II)-binding motifs in the four pseudorepeats of tau protein" *The Journal of Physical Chemistry B*, 115, 15067– 15078, 2011.
- [172] C. Bacchella, S. Gentili, D. Bellotti, E. Quartieri, S. Draghi, M. Remelli, D. Valensin, E. Monzani, S. Nicolis, L. Caselle, M. Tegoni és S. Dell'Acqua, "Binding and reactivity of copper to R1 and R3 fragments of tau protein" *Inorganic Chemistry*, 59, 274–286, 2020.
- [173] M. P. Cuajungco és G. J. Lees, "Zinc and Alzheimer's disease: is there a direct link?" Brain Research Reviews, 23, 219–236, 1997.
- [174] I. Kim, E. J. Park, J. Seo, S. J. Ko, J. Lee és C. H. Kim, "Zinc stimulates tau S214 phosphorylation by the activation of Raf/mitogen-activated protein kinase-kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway" *NeuroReport*, 22, 839–844, 2011.
- [175] Y. Xiong, X. P. Jing, X. W. Zhou, X. L. Wang, Y. Yang, X. Y. Sun és J. Z. Wang, "Zinc induces protein phosphatase 2A inactivation and tau hyperphosphorylation through Src dependent PP2A (tyrosine 307) phosphorylation" *Neurobiology of Aging*, 34, 745–756, 2013.
- [176] Z. Y. Mo, Y. Z. Zhu, H. L. Zhu, J. B. Fan, J. Chen és Y. Liang, "Low micromolar zinc accelerates the fibrillization of human tau via bridging of Cys-291 and Cys-322" *Journal of Biological Chemistry*, 284, 34648–34657, 2009.
- [177] S. Walker, O. Ullman és C. M. Stultz, "Using intramolecular disulfide bonds in tau protein to deduce structural features of aggregation-resistant conformations" *Journal* of Biological Chemistry, 287, 9591–9600, 2012.
- [178] G. G. Moreira, J. S. Cristóvão, V. M. Torres, A. P. Carapeto, M. S. Rodrigues, I. Landrieu, C. Cordeiro és C. M. Gomes, "Zinc binding to tau influences aggregation kinetics and oligomer distribution" *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 5979:1–13, 2019.
- [179] A. C. Jiji, A. Arshad, S. R. Dhanya, P. S. Shabana, C. K. Mehjubin és V. Vijayan, "Zn<sup>2+</sup> interrupts R4-R3 association leading to accelerated aggregation of tau protein" *PubMed*, 23, 16976–16979, 2017.
- [180] N. V. Gorantla, R. Das, E. Balaraman és S. Chinnathambi, "Transition metal nickel prevents Tau aggregation in Alzheimer's disease" *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 1359–1365, 2019.
- [181] R. B. Merrifield, "Solid phase peptide synthesis I: Synthesis of a tetrapeptide" *Journal* of the American Chemical Society, 85, 2149–2154, **1963.**
- [182] S. L. Pedersen és K. J. Jensen, "Instruments for automated peptide synthesis" in *Peptide synthesis and applications* (eds.: K. Jensen, P. Tofteng Shelton, S. Pedersen) (Methods in molecular biology), Totowa, Humana Press, **2013**, 544–615.
- [183] G. Barany, N. Kneib-Cordonier és D. G. Mullen, "Solid-phase peptide synthesis: a silver anniversary report" *International Journal of Peptide and Protein Research*, 30, 705–739, **1987**.
- [184] H. Rink, "Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxydiphenyl-methylester resin" *Tetrahedron Letters*, 28, 3787–3790, **1987.**
- [185] P. Gans, A. Sabatini és A. Vacca, "SUPERQUAD an improved general program for computation of formation-constants from potentiometric data" *Journal of the*

Chemical Society, Dalton Transactions, 6, 1195–1200, 1985.

- [186] L. Zékány és I. Nagypál, "PSEQUAD: A comprehensive program for the evaluation of potentiometric and/or spectrophotometric equilibrium data using analytical derivatives" in *Computational methods for the determination of formation constants* (ed.: D. Legett), New York, Plenum Press, **1985**, 291–353.
- [187] H. M. Irving, M. C. Miles és L. D. Pettit, "A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titration using a glass electrode" *Analytica Chimica Acta*, 38, 475–488, **1967**.
- [188] G. Eriksson, "Algorithm for the computation of aqueous multicomponent, multiphase equilibria" *Analytica Chimica Acta Computer Techniques and Optimization*, 3, 375–383, **1979.**
- [189] G. Gran, "Determination of the equivalent point in potentiometric titrations" *Acta Chemica Scandinavica*, 4, 559–577, **1950.**
- [190] H. Kozlowski és G. Micera, "Biological fluids in bioinorganic chemistry" in Handbook of metal-ligand interactions (ed.: G. Berthon), New York, Marcel Dekker, 1995, 566–582.
- [191] E. J. Billo, "Copper(II)-polyamine-cyanide complexes in aqueous solution" *Inorganic and Nuclear Chemistry Letters*, 12, 673–677, 1977.
- [192] M. Vasak, J. H. R. Kaegi és H. A. O. Hill, "Zinc(II), cadmium(II), and mercury(II) thiolate transitions in metallothionein" *Biochemistry*, 20, 2852–2856, 1981.
- [193] R. Cantor és P. R. Schimmel, "Other optical techniques" in *Biophysical chemistry*, part 2: Techniques for the study of biological structure and function, United States, W.H. Freeman and Company, **1980**, 409–480.
- [194] A. Cotton, "Absorption inégale des rayons circulaires droit et gauche dans certains corps actifs" *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences*, 120, 989–991, 1895.
- [195] R. B. Martin, "Optical properties of transition metal ion complexes of amino acids and peptides" in *Metal ions in biological systems* (ed.: H. Sigel), New York, Marcel Dekker, **1974**, 129–156.
- [196] J. W. Chang és R. B. Martin, "Visible circular dichroism of planar nickel ion complexes of peptides and cysteine and derivatives," *The Journal of Physical Chemistry*, 73, 4277–4283, **1969.**
- [197] J. M. Tsangaris és R. B. Martin, "Visible circular dichroism of copper(II) complexes of amino acids and peptides" *Journal of the American Chemical Society*, 92, 4255–4260, **1970.**
- [198] J. M. Tsangaris, J. W. Chang és R. B. Martin, "Ultraviolet circular dichroism of cupric and nickel ion complexes of amino acids and peptides" *Journal of the American Chemical Society*, 91, 726–731, **1969**.
- [199] T. Szabó-Plánka, A. Rockenbauer, L. Korecz és D. Nagy, "An electron spin resonance study of coordination modes in the copper(II)-histamine and copper(II)-(L)-histidine systems in fluid aqueous solution" *Polyhedron*, 19, 1123–1131, 2000.
- [200] S. Bruni, F. Cariati, P. G. Daniele és E. Prenesti, "Speciation and structure of copper(II) complexes with histidine-containing peptides in aqueous medium: a combined potentiometric and spectroscopic study" Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 56, 815–827, 2000.
- [201] I. Sóvágó, D. Sanna, A. Dessi, K. Várnagy és G. Micera, "EPR and potenciometric reinvestigation of copper(II) complexation with simple oligopeptides and related compounds" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 63, 99–117, **1996.**
- [202] V. H. Wysocki, K. A. Resing, Q. Zhang és G. Cheng, "Mass spectrometry of peptides and proteins" *Methods*, 35, 211–222, 2005.

- [203] P. S. Vassar és C. F. Culling, "Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues" Archives of Pathology, 68, 487–498, 1959.
- [204] H. Naiki, K. Higuchi, K. Nakakuki és T. Takeda, "Kinetic analysis of amyloid fibril polymerization in vitro" *Laboratory Investigation: A Journal of Technical Methods and Pathology*, 65, 104–110, **1991.**
- [205] I. Sóvágó, K. Várnagy, N. Lihi és Á. J. Grenács, "Coordinating properties of peptides containing histidyl residues" *Coordination Chemistry Reviews*, 327-328, 43–54, 2016.
- [206] T. G. Fawcett, E. E. Bernarducci, K. Krough-Jespersen és H. J. Schugar, "Chargetransfer absorptions of copper(II)-imidazole and copper(II)-imidazolate chromophores" *Journal of the American Chemical Society*, 102, 2598–2604, **1980**.
- [207] M. Klewpatinond és J. H. Viles, "Empirical rules for rationalising visible circular dichroism of Cu<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> histidine complexes: Applications to the prion protein" *FEBS Letters*, 581, 1430–1434, **2007**.
- [208] G. Csire, I. Turi, I. Sóvágó, E. Kárpáti és C. Kállay, "Complex formation processes and metal ion catalyzed oxidation of model peptides related to the metal binding site of the human prion protein" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 203, 110927:1–9, 2020.
- [209] B. D. Balogh, G. Szunyog, M. Lukács, B. Szakács, I. Sóvágó és K. Várnagy, "Thermodynamics and structural characterization of the nickel(II) and zinc(II) complexes of various peptide fragments of tau protein" *Dalton Transactions*, 50, 14411–14420, 2021.
- [210] V. Kovács, A Tau proteinek szerepe az Alzheimer-kór kialakulásában, Szakdolgozat, Debrecen: Debreceni Egyetem, 2021.
- [211] C. K. Török, Cisztein és hisztidin tartalmú peptidek fémkomplexei, Diplomamunka, Debrecen: Debreceni Egyetem, **2021.**
- [212] N. Piskolti, A tau fehérje két kötőhelyét modellező peptid nikkel(II)-komplexeinek vizsgálata, Szakdolgozat, Debrecen: Debreceni Egyetem, **2022.**
- [213] J. Heyda, P. E. Mason és P. Jungwirth, "Attractive interactions betweem side chains of histidine-histidine and histidine-arginine-based cationic dipeptides in water" *The Journal of Physical Chemistry B*, 114, 8744–8749, **2010.**
- [214] M. Wang, L. Jiang, E. J. Kim és S. H. Hahnc, "Electronic structure and optical properties of Zn(OH)<sub>2</sub>: LDA+U calculations and intense yellow luminescence" *RSC Advances*, 5, 87496–87503, 2015.
- [215] S. J. Shields, B. K. Bluhm és D. H. Russell, "Fragmentation chemistry of [M + Cu]<sup>+</sup> peptide ions containing an N-terminal arginine" *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11, 626–638, 2000.
- [216] P. A. Keczán, A Tau fehérje His32 kötőhelyét modellező peptid Cu(II) komplexei, Szakdolgozat, Debrecen: Debreceni Egyetem, 2022.
- [217] P. Bozsó, Hisztidin tartalmú hexapeptid Cu(II)-komplexei, Szakdolgozat, Debrecen: Debreceni Egyetem, **2022.**
- [218] A. Gergely és I. Sóvágó, "Thermodynamic and structural study of the parent and some mixed ligand complexes of histamine and 1,3-diaminopropane with copper(II) and nickel(II) ions" *Inorganica Chimica Acta*, 20, 19–25, **1976.**
- [219] Á. Dávid, Cs. Kállay, D. Sanna, N. Lihi, I. Sóvágó és K. Várnagy, "Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) complexes of rat amylin fragments. The anchoring ability of specific non-cordinating side chains" *Dalton Transactions*, 44, 17091–17099, 2015.
- [220] Á. Dávid, É. T. Hartman, N. Lihi, I. Sóvágó és K. Várnagy, "Complex formation of nickel(II) and zinc(II) ions with peptide fragments of rat amylin" *New Journal of Chemistry*, 42, 8131–8136, **2018.**

- [221] I. Sóvágó, T. Kiss és A. Gergely, "Effect of mixed-ligand complexes formation on the ionization of the pyrrole hydrogens of histamine and histidine" *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 8, 964–968, **1978.**
- [222] B. Bóka, A. Myari, I. Sóvágó és N. Hadjiliadis, "Copper(II) and zinc(II) complexes of the peptides Ac-HisValHis-NH<sub>2</sub> and Ac-HisValGlyAsp-NH<sub>2</sub> related to the active site of the enzyme CuZnSOD" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98, 113–122, 2004.
- [223] G. Csire, L. Nagy, K. Várnagy és C. Kállay, "Copper(II) interaction with the human prion 103-112 fragment – Coordination and oxidation" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 170, 195–201, 2017.
- [224] L. O. Tjernberg, J. Naslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A. R. Karlstrom, J. Thyberg, L. Terenius és C. Nordstedt, "Arrest of β-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand" *Journal of Biological Chemistry*, 271, 8545–8548, **1996.**
- [225] E. Gazit, "Mechanisms of amyloid fibril self-assembly and inhibition. Model short peptides as a key research tool" *The FEBS Journal*, 272, 5971–5978, **2005**.
- [226] S. A. Sievers, J. Karanicolas, H. W. Chang, A. Zhao, J. Liang, O. Zirafi, J. T. Stevens, J. Münch, D. Baker és D. Eisenberg, "Structure-based design of non-natural amino acid inhibitors of amyloid fibril formation" *Nature*, 475, 96–100, **2011.**
- [227] P. Ryan, B. Patel, V. Makwana, H. R. Jadhav, M. Kiefel, A. Davey, T. A. Reekie, S. Rudrawar és M. Kassiou, "Peptides, peptidomimetics, and carbohydrate-peptide conjugates as amyloidogenic aggregation inhibitors for Alzheimer's disease" ACS Chemical Neuroscience, 9, 1530–1551, 2018.
- [228] M. Asadbegi és A. Shamloo, "Identification of a novel multifunctional ligand for simultaneous inhibition of amyloid-beta ( $A\beta_{42}$ ) and chelation of zinc metal ion" *ACS Chemical Neuroscience*, 10, 4619–4632, **2019**.
- [229] M. Born, "Volumen und Hydratationswärme der Ionen" Zeitschrift für Physik, 1, 45– 48, 1920.
- [230] Y. P. Huang, Z. H. Wu, Y. Cao, M. L. Lang, B. W. Lu és B. Zhou, "Zinc binding directly regulates tau toxicity independent of tau hyperphosphorylation" *Cell Reports*, 8, 831–842, **2014.**
- [231] A. Y. Roman, F. Devred, D. Byrne, R. La Rocca, N. N. Ninkina, V. Peyrot és P. O. Tsvetkov, "Zinc induces temperature-dependent reversible self-assembly of tau" *Journal of Molecular Biology*, 431, 687–695, 2019.

## 9. Függelék

Az értekezés alapját képező közlemények:

 <u>B. D. Balogh</u>, G. Szunyog, M. Lukács, B. Szakács, I. Sóvágó, and K. Várnagy, "Thermodynamics and structural characterization of the nickel(II) and zinc(II) complexes of various peptide fragments of tau protein" *Dalton Transactions*, 50, 14411–14420, **2021**.

**IF:** 4.569

- <u>B. D. Balogh</u>, B. Szakács, G. Di Natale, G. Tabbì, G. Pappalardo, I. Sóvágó, and K. Várnagy, "Copper (II) binding properties of an octapeptide fragment from the R3 region of tau protein: A combined potentiometric, spectroscopic and mass spectrometric study" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 217, 111358:1–13, 2021. IF: 3,387
- <u>B. D. Balogh</u>, Z. Bihari, P. Buglyó, G. Csire, Z. Kerekes, M. Lukács, I. Sóvágó, and K. Várnagy, "Metal binding selectivity of an Nterminally free multihistidine peptide HAVAHHH-NH<sub>2</sub>" *New Journal of Chemistry*, 43, 907–916, 2019. IF: 3,925

#### Az értekezés anyagához szorosan nem kapcsolódó közlemény(ek):

 E. Székely, G. Csire, <u>B. D. Balogh</u>, J. Z. Erdei, J. M. Király, J. Kocsi, J. Pinkóczy, and K. Várnagy, "The role of side chains in the finetuning of the metal-binding ability of multihistidine peptides" *Molecules*, 27, 3435:1–29, 2022. IF: 4,927

Az értekezés anyagából készült előadások:

- <u>Balogh Bettina Diána</u>, Várnagy Katalin: A tau fehérje két kötőhelye (His32 és His329-330) fémionkötő képességének összehasonlítása 55. Komplexkémiai Kollokvium, Debrecen, 2022. május 25-27.
- <u>Balogh Bettina Diána</u>: A Tau (326-333) mutánsok réz(II)komplexeinek összehasonlítása Kárpát-medencei Fiatal Magyar Kutatók Konferenciája, 2021. március 30-31.
- <u>Balogh Bettina Diána</u>, Szakács Bence, Várnagy Katalin: A Tau (326-333) mutánsok réz(II)komplexeinek összehasonlítása XXIII. Tavaszi Szél Konferencia, Budapest, 2020. október 16.

 Balogh Bettina Diána, Csire Gizella, Kerekes Zsuzsanna, Lukács Márton, Várnagy Katalin: Az N-és C-terminális rész fémion megkötő képességének összehasonlítása a HAVAHHH-NH<sub>2</sub> peptidben
Komplexkémiai Kollokvium, Velence, 2019. május 21-23.

#### Az értekezés anyagából készült poszterek:

- Zsuzsa Kastal, <u>Bettina D. Balogh</u>, Adrien Balabán, Szilvia Vida, Petra A. Keczán, Katalin Várnagy: Effect of the amino acid environment of histidine on the copper(II) binding selectivity of Tau fragments **3rd European NECTAR Conference**, Ljubljana, Szlovénia, 2022. augusztus 24-26.
- Katalin Várnagy, <u>Bettina D. Balogh</u>, Cintia K. Török, Noémi Piskolti: Nickel(II) and zinc(II) complexes of Tau(320-333) fragment **3rd Europen NECTAR Conference**, Ljubljana, Szlovénia, 2022. augusztus 24-26.
- Bettina Diána Balogh, Katalin Várnagy: Comparison of the metal binding affinity of the His32 and His329-330 sites of tau protein 49th International Symposium on Metal Complexes, Valencia, Spanyolország, 2022. június 05-08.
- Bettina Diána Balogh, Bence Szakács, Imre Sóvágó, Katalin Várnagy: Comparison of transition metal complexes of Tau (326-333) mutants
  48th International Symposium on Metal Complexes, Bialystok, Lengyelország, 2021. június 16-18.
- <u>Balogh Bettina Diána</u>, Csire Gizella, Kerekes Zsuzsanna, Lukács Márton, Várnagy Katalin: Az N-és C-terminális rész fémion megkötő képességének összehasonlítása a HAVAHHH-NH<sub>2</sub> peptidben I. Fiatal Kémikusok Fóruma, Debrecen, 2019. április 03-05.
- 6. Gizella Csire, <u>Bettina Diána Balogh</u>, Zsuzsanna Kerekes, Márton Lukács, Katalin Várnagy: Competition of transition metal ions between the trihistidyl and N-terminal histamine binding sites in HAVAHHH peptide

**45th International Symposium on Metal Complexes**, Firenze, Olaszolország, 2018. június 03-07.
































## <u>Táblázatok:</u>

T1. táblázat: A tau(320-333) peptid nikkel(II)-cink(II) vegyes fémkomplexeinek termodinamikai és spektrális paraméterei (T = 298 K, I = 0,20 M KCl)

Részecske	$\log \beta$	$\lambda_{max}/\epsilon (nm/M^{-1} \cdot cm^{-1})$	$\lambda/\Delta\epsilon (nm/M^{-1} \cdot cm^{-1})$
$[NiZnH_{-2}L]^{2+}$	-3,33(9)	—	—
$[NiZnH_{-3}L]^+$	-12,19(9)	-	—
[NiZnH <sub>-4</sub> L]	-21,22(5)	~450/217	~518,5/+0,36
			~435/-2,29
			~314,5/+0,54
			~265/-3,46 (váll)
			~234,5/+3,98
$[NiZnH_{-6}L]^{2-}$	-42,05(5)	~450/226	~518,5/+0,42
			~433,5/-2,37
			~312,5/+0,57
			~269/-3,77 (váll)
			~235,5/+2,60

			tau(326-333)	tau(326-333)	tau(326-333)
Részecske	Koordinációs	Átmenet	$(H_2O)$	$\lambda/\Delta\epsilon$	KL
TCOZCOBICO	mód	7 tunienet	$\lambda/\Delta\epsilon$	$(nm/M^{-1} \cdot cm^{-1})$	λ/Δε
			$(nm/M^{-1} \cdot cm^{-1})$		$(nm/M^{-1} \cdot cm^{-1})$
	[N(Im), N <sup>-</sup> ,				
	N(Im) + LysH	d–d	~774/+0,19	~691/+0,09	~741,5/+0,19
[CuLH]*	(+LysH*)]		,	,	, ,
			~620,5/-0,09	~587 /0,07	~652/+0,02
			~526,5/+0,09	~523,5/+0,17	~528,5/+0,17
		N(Im)–Cu(II)	~346,5/-0,15	~329,5/-0,27	
		N <sup>-</sup> –Cu(II)	~251/+2.25	~255/+4.90	~257.5/+4.34
[CuLH_1] és	$[N^{-}, N^{-}, N(Im) +$	· · · · ·			
[CuL]*	$LvsH(+LvsH^*)$	d-d	~725,5/+0,17	~656/+0,63	~644/+0,23
[Cull]		1	~581/-0.37	~497,5/-1,05	~493,5/-0,32
			~484.5/-0.14	, ,	
		N(Im)-Cu(II)	~360/-0.86	~365 5/-0 42	~372 5/-0 09
			2007 0,00	$\sim 3265,5/-0,12$	$\sim 326/\pm 0.33$
		N <sup>−</sup> –Cu(II)	~245/+8 91	~253/+4.56	~254/+5.62
	[N- N- N-	1, 0, 0, (11)		2007 11,00	
[CuLH <sub>-2</sub> ] és	N(Im) + I vsH	d-d	~625 5/+0 58	~653/+0.80	~642 5/+0 71
$[CuLH_{-1}]*$	$(+LvsH^*)$ ]	uu	023,5710,50	055/10,00	042,5710,71
	(+Eysti )]		~198/_1.06	~500 5/_1 47	~500 5/_1 47
		N(Im) Cu(II)	265/ 0.24	265/ 0.20	280/ 0.12
		N(IIII)–Cu(II)	~303/-0,34	~303/-0,39	~380/-0,13
			~319/+0,91	~328/+0,33	~329,5/+1,15
		$N^Cu(II)$	~251+8,45	~265,5/+4,75	~262/+4,65
[CuLH <sub>-3</sub> ]	[N <sup>-</sup> , N <sup>-</sup> , N <sup>-</sup> , N(Im)]	d–d	~655,5/+1,04	~654/+1,08	~652/+0,96
	1((111))]		~502/-1.83	~498/-2.10	~502/-1.99
		N(Im)-Cu(II)	~327.5/+1.17	~365.7/-0.25	~369.5/-0.23
		- (,	02,0,11,17	$\sim 325 5/\pm 0.70$	$\sim 329/\pm 0.69$
		N <sup>_</sup> _Cu(II)	~250 5/+8 33	$\sim 267/\pm 6/11$	~266/+5.48
A osillar	ral (*) jelëlt	sztöchiometriálz		VOCKI VEE NIL	$-200/\pm 3,40$
[CuLH.1] és [CuL]* [CuLH.2] és [CuLH_1]* [CuLH_3]	[N <sup>-</sup> , N <sup>-</sup> , N(Im)+ LysH (+LysH*)] [N <sup>-</sup> , N <sup>-</sup> , N <sup>-</sup> , N(Im) + LysH (+LysH*)] [N <sup>-</sup> , N <sup>-</sup> , N <sup>-</sup> , N(Im)]	N(Im)–Cu(II) N <sup>–</sup> -Cu(II) $N^{-}$ Cu(II) N <sup>–</sup> -Cu(II) d-d N(Im)–Cu(II) $N^{-}$ Cu(II) d-d N(Im)–Cu(II) d-d N(Im)–Cu(II) d-d	~346,5/-0,15 ~251/+2,25 ~725,5/+0,17 ~581/-0,37 ~484,5/-0,14 ~360/-0,86 ~245/+8,91 ~625,5/+0,58 ~498/-1,06 ~365/-0,34 ~319/+0,91 ~251+8,45 ~655,5/+1,04 ~502/-1,83 ~327,5/+1,17 ~259,5/+8,33 az Ac-GNIHHI	~329,5/-0,27 ~255/+4,90 ~656/+0,63 ~497,5/-1,05 ~365,5/-0,42 ~326,5/+0,21 ~253/+4,56 ~653/+0,80 ~500,5/-1,47 ~365/-0,39 ~328/+0,33 ~265,5/+4,75 ~654/+1,08 ~498/-2,10 ~365,7/-0,25 ~325,5/+0,70 ~267/+6,41 KPGKLVFF-NE	~257,5/+4,34 ~644/+0,23 ~493,5/-0,32 ~372,5/-0,09 ~326/+0,33 ~254/+5,62 ~642,5/+0,71 ~500,5/-1,47 ~380/-0,13 ~329,5/+1,15 ~262/+4,65 ~652/+0,96 ~502/-1,99 ~369,5/-0,23 ~329/+0,69 ~266/+5,48 buligandum

*T2. táblázat:* A Cu(II)–tau(326-333) és a Cu(II)–tau(326-333) KL = 1:1 rendszerben képződő egymagvú réz(II)komplexek CD-spektroszkópiás paraméterei vizes közegben és 70% (V/V) DMSO-víz oldószerelegyben

A csillaggal (\*) jelölt sztöchiometriák az Ac-GNIHHKPGKLVFF-NH<sub>2</sub> ligandum réz(II)komplexeire vonatkoznak.